

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 211**

51 Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)

B01D 39/08 (2006.01)

B01D 29/01 (2006.01)

B01D 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/US2012/044806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13009491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12811005 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2732021**

54 Título: **Filtros de profundidad mejorados para procesos biotecnológicos desechables**

30 Prioridad:

08.07.2011 US 201161571994 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SINGH, NRIPEN y
CHENG, KWOK-SHUN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 809 211 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Filtros de profundidad mejorados para procesos biotecnológicos desechables

5 Descripción detallada de la invención

Campo de la invención

10 En general, la presente invención se refiere a la clarificación primaria de alimentos. En ciertas modalidades específicas, la invención proporciona un proceso de filtración en profundidad de clarificación primaria de los alimentos, corrientes de alimento, materias primas de alimento, caldos de cultivo celular y similares, que usa un dispositivo de filtración en profundidad de clarificación primaria sin el uso de una etapa de centrifugación de clarificación primaria o de una etapa de microfiltración por flujo tangencial de clarificación primaria. En otras modalidades, la invención proporciona un proceso de filtración en profundidad de clarificación primaria de alimentos tratados químicamente en los que la masa celular se ha floculado en agregados más grandes.

Antecedentes de la invención

20 La fabricación de biomoléculas de grado farmacéutico, incluidas proteínas como los anticuerpos monoclonales (mAb), es un proceso de fabricación complejo que consta de múltiples técnicas de filtración, centrifugación y cromatografía diseñadas para producir productos de alta calidad para pacientes. La clarificación de las cosechas de cultivos celulares y las materias primas de alimento con alto contenido de sólidos puede ser una tarea desalentadora debido a los grandes volúmenes de cosecha de los biorreactores modernos de producción por lotes ($\leq 25\,000$ L) y las altas densidades de células que a menudo requieren una clarificación primaria y secundaria antes de las operaciones posteriores de cromatografía. Y como tal, los esquemas de cosecha y clarificación para los procesos de producción de cultivos celulares y materias primas de alimento con alto contenido de sólidos, tales como las células de mamíferos y los mAb, son el producto de mucha evolución y evaluación llevada a cabo en los últimos 20 años más o menos.

30 Ahora se espera que las técnicas de cosecha para el cultivo de células de mamíferos y los mAb funcionen de manera rutinaria con altas producciones ($> 95\%$) y una mínima alteración celular. A medida que han aumentado los títulos de las moléculas del producto, la mayor masa celular y las mayores cantidades de producto crean desafíos para las etapas de purificación posteriores. Las densidades celulares más altas dan como resultado dificultades durante la clarificación y la filtración estéril. Las concentraciones de producto más altas generalmente dan como resultado una mayor carga de impurezas y la necesidad de instalaciones de cromatografía más grandes. Como tal, las mejoras en forma de ganancias en eficiencia y rendimiento se buscan mucho.

40 El aumento de la demanda y el crecimiento de los mAb terapéuticos han impulsado los esfuerzos para aumentar la producción del producto, la calidad, la eficiencia del proceso y la rentabilidad para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos industriales. La última década ha sido testigo de un crecimiento considerable en la producción, aumento de títulos de productos de cultivo celular y avances técnicos en la caracterización de impurezas y contaminantes.

45 La clarificación primaria de alimentos, corrientes de alimento, materias primas de alimento, caldos de cultivo celular y similares, incluidos los alimentos con alto contenido de sólidos, tales como los que contienen mAb y materia prima de cultivo de células de mamíferos, eliminan grandes cantidades de biomasa, particularmente células enteras y otros restos celulares más grandes, seguidos de una clarificación secundaria que elimina las partículas coloidales más pequeñas y otras partículas que perjudican la capacidad de los filtros aguas abajo. La centrifugación es típicamente la primera etapa de clarificación en los procesos de producción de mAb y caldos de cultivo de células de mamíferos y materias primas de alimento.

50 Los fabricantes de mAb han invertido una gran cantidad de tiempo y esfuerzo en aumentar el título del producto de una materia prima de alimentos. Sin embargo, mientras que los títulos más altos aumentan la productividad del cultivo celular, además produce materias primas de alimentos con mayores cantidades de biomasa y contenido de desechos celulares. Los alimentos que contienen cantidades tan grandes de biomasa y desechos celulares pueden producir un concentrado de alta turbidez después de la centrifugación. Los concentrados de alta turbidez a menudo reducen el rendimiento del filtro secundario de profundidad de clarificación y el filtro estéril posterior que se usa aguas abajo de la centrifuga. El rendimiento reducido causa una variedad de problemas, desde aumento del costo del proceso hasta desviaciones en los procedimientos del proceso debido a taponamiento de los filtros y largos retrasos en el procesamiento. Finalmente, la necesidad de clarificación primaria mediante el uso de una centrífuga requiere procedimientos de limpieza extensos y validados entre corridas para intentar reducir el riesgo de contaminación cruzada entre lotes y especies moleculares terapéuticas.

60 Esto es particularmente problemático en la producción bioterapéutica a escala piloto o clínica donde es deseable procesar múltiples productos en un tiempo relativamente corto. Los procedimientos de limpieza de centrífuga disminuyen la capacidad de la planta piloto para cambiar a la producción de una biomolécula diferente y aumentan en gran medida el riesgo de contaminación cruzada entre las corridas de producción. Además, la centrifugación no puede

eliminar eficientemente todas las partículas y restos celulares de estas materias primas de alimentos en la etapa de clarificación primaria, de ahí la necesidad de la etapa de clarificación secundaria que usa filtración en profundidad después de la etapa de centrifugación, pero antes de las etapas cromatográficas posteriores.

- 5 Alternativamente, las sucesivas corridas de filtración han demostrado ser útiles para eliminar células de diferentes tamaños y restos celulares de las materias primas de alimentos, pero generalmente los rendimientos volumétricos limitan la aplicación a volúmenes más pequeños (<1000L) donde la instalación del filtro tiene un tamaño razonable. El uso de filtración reduce en gran medida el riesgo de contaminación cruzada y elimina la necesidad de limpieza y validación de limpieza entre corridas debido a la naturaleza desechable de los dispositivos de filtración.
- 10 Desafortunadamente, el bajo rendimiento requiere una gran cantidad de unidades de filtro que pueden reducir los productos de filtración porque cada etapa sucesiva resulta en la pérdida de una porción de la solución de alimento a través de los volúmenes de retención del dispositivo y equipo de filtro.

- 15 Para mejorar aún más el desempeño de la clarificación, el rendimiento y las operaciones de filtración aguas abajo, se ha usado la floculación de las cosechas de un cultivo celular. Los floculantes son una clase de materiales que pueden agregar y aglutinar partículas finas a partir de una solución, lo que resulta en su sedimentación a partir de la fase líquida y una reducción en la turbidez de la solución.

- 20 La floculación puede lograrse de varias maneras, incluido el tratamiento con polímeros, el tratamiento químico (cambios en el pH) o la adición de un tensioactivo. La precipitación mediante el uso de floculantes puede usarse para eliminar selectivamente las impurezas mientras deja el producto proteico en la solución. Sin embargo, los floculantes no se han utilizado ampliamente en la clarificación de mAb, células de mamíferos y otros materiales celulares bimoleculares de materias primas de alimentos de interés.

- 25 La floculación de las cosechas de cultivos celulares por productos químicos requiere el uso de ácidos, como el ácido acético, o polímeros como el quitosano, polisacáridos, poliaminas o poliácridamidas. La floculación se ha utilizado como una tecnología de separación alternativa para mejorar el rendimiento de clarificación de la centrifuga y la calidad del concentrado, mejorando así las operaciones de filtración aguas abajo. Si bien la floculación química es bastante efectiva en la aglomeración de restos celulares y contaminantes celulares (proteínas de la célula huésped y ADN), la suspensión floculada resultante generalmente no es fácilmente separable por métodos de filtración ordinarios sin el uso de una centrifuga antes de la filtración.
- 30

- Los floculantes precipitan células, desechos celulares y proteínas debido a la interacción entre las cargas en las proteínas y las cargas en el polímero (por ejemplo, polielectrolitos), al crear complejos insolubles y el puente subsiguiente de los complejos insolubles, ya sea por interacción de carga residual o por parches hidrófobos en los complejos para formar agrupaciones más grandes. Para eliminar estas grandes agrupaciones, el modo primario de clarificación es una etapa de centrifugación o microfiltración de flujo tangencial, seguido por la etapa secundaria de clarificación, mediante el cual la filtración en profundidad se usa ampliamente en la clarificación del caldo de cultivo celular antes de la etapa de cromatografía de captura. Como la centrifugación no puede suministrar un concentrado libre de partículas, el filtro de profundidad (filtración secundaria en profundidad) y el filtro estéril deben instalarse aguas abajo.
- 35
- 40

- La microfiltración de flujo tangencial (llamada, además, microfiltración de flujo cruzado) compite con la centrifugación para la cosecha y clarificación de los mAb y productos terapéuticos a partir del cultivo de células de mamíferos. Una ventaja que ofrece esta técnica es la creación de una corriente de cosecha libre de partículas que requiere una filtración adicional mínima. Sin embargo, las membranas de microfiltración de flujo tangencial usadas para las cosechas de cultivos celulares a menudo están plagadas del problema de la suciedad de la membrana (es decir, disminuciones irreversibles en el flujo de la membrana) y generalmente requieren una condición de operación compleja estricta seguida de un régimen de limpieza exhaustivo (como, además, es el caso con una centrifuga) para las membranas después de cada uso. El uso de una química de membrana optimizada, con más membranas hidrofílicas de microfiltración de flujo tangencial, generalmente es algo menos susceptible a ensuciamientos significativos, para abordar este problema.
- 45
- 50

- Tradicionalmente, la floculación se usa generalmente para aglomerar partículas sólidas no deformables. Por ejemplo, las suspensiones diluidas de partículas de arcilla o de dióxido de titanio de tamaño submicrométrico, que son muy difíciles de filtrar debido a su pequeño tamaño de partícula, pueden flocularse químicamente y separarse fácilmente, porque el tamaño de estas partículas submicrométricas aumenta enormemente por la formación de flóculos aglomerados, que sedimentan más rápidamente y, por lo tanto, se filtran más rápido debido a los grandes canales de flujo dentro de la torta.
- 55
- 60

- Sin embargo, cuando se aplica la floculación química a las materias primas de alimentos de mAb u otras materias primas de alimentos biomoleculares/celulares, el aglomerado resultante es único y bastante diferente de las partículas sólidas no deformables de materiales de la tierra y óxidos metálicos debido a la naturaleza de las propiedades biológicas de estos materiales biomoleculares. La mayoría de las partículas sólidas no deformables, tales como los materiales de tierra u óxidos metálicos, tienen una densidad mucho más alta que el agua. Por lo tanto, una vez que estas pequeñas partículas se floculan, su tamaño de partícula aumenta enormemente y los flóculos resultantes
- 65

sedimentan rápidamente (es decir, en minutos) por gravedad. En contraste, las células, los mA b y otras especies de biomoléculas están hechas de aminoácidos y agua, y tienen una densidad muy cercana a la densidad del agua. Por lo tanto, las células floculadas y otras biomoléculas no sedimentan fácilmente y a menudo tardan varias horas antes de que se produzca la sedimentación.

Otro problema es la densidad relativamente baja de la masa celular floculada que, típicamente, forma una masa esponjosa que ocupa una parte significativa del volumen de alimento en lugar de formar una torta compactada. Además, debido al origen biológico de las partículas, los flóculos son frágiles y tienden a descomponerse fácilmente bajo presión.

Por esta razón, la mayoría de los métodos convencionales de separación sólido-líquido, aunque son útiles para los sistemas de partículas sólidas, fallan en las masas de células floculadas, tales como las materias primas de alimentos de mA b.

Se cree que la retención de partículas implica tanto la exclusión de tamaño como la adsorción a través de interacciones hidrófobas, iónicas y de otro tipo. Los mecanismos de ensuciamiento pueden incluir bloqueo de poros, formación de torta y/o constricción de poros. Los filtros de profundidad son ventajosos porque son muy efectivos para eliminar contaminantes y vienen en formatos desechables, lo que elimina los problemas de validación y contaminación relacionados con las instalaciones de hardware reutilizables, tales como las que se encuentran al usar una centrifuga. Sin embargo, los filtros de profundidad actualmente no son capaces de manejar las corrientes de alimento con alto contenido de sólidos que son típicas de los procesos de mA b de alto título, de modo que los filtros de profundidad se usan a menudo después de la centrifugación. La alta carga de partículas y la alta turbidez presentes en el sobrenadante del cultivo celular no clarificado agregan desafíos a la clarificación primaria solamente por filtración en profundidad.

Sin embargo, los filtros de profundidad actualmente no son capaces de manejar la clarificación primaria de las corrientes de alimento con alto contenido de sólidos, y a menudo deben usarse después de la centrifugación o la microfiltración de flujo tangencial. La alta carga de partículas y la alta turbidez presentes en el sobrenadante del cultivo celular no clarificado agregan desafíos a la clarificación primaria solamente por filtración en profundidad. Actualmente, el rendimiento limitado da como resultado grandes instalaciones de filtros de profundidad para clarificación primaria, lo que resulta en pérdidas de producción debido al gran volumen de retención y problemas de escalamiento como se discutió anteriormente.

Además, las materias primas de alimentos de mA b son corrientes de alimentación desafiantes para aclarar y filtrar debido a la presencia de un mayor contenido de biomasa, y dan como resultado un concentrado de alta turbidez después de la centrifugación. Debido a la necesidad de eliminar grandes cantidades de biomasa, los concentrados de alta turbidez acortan la vida útil del filtro de profundidad para la clarificación aguas abajo. Existe la necesidad de mejorar la clarificación de los mA b, lo que resulta en mayores rendimientos.

A la luz de los procesos de clarificación primaria anteriores que se basan en el uso de una etapa de centrifugación de clarificación primaria o una etapa de microfiltración de clarificación primaria seguida de una etapa de clarificación secundaria que se basa en medios de filtración en profundidad para eliminar partículas más grandes, existe la necesidad de un proceso de clarificación primaria desechable, razonablemente confiable y no excesivamente costoso de implementar, un proceso de clarificación primaria que no use una etapa de clarificación centrifugación primaria o de microfiltración seguido de un etapa adicional de clarificación secundaria.

Resumen de la invención

En respuesta a las necesidades y problemas anteriores asociados con los procesos de clarificación primaria de alimentos, corrientes de alimentos, materias primas de alimentos, caldos de cultivo celular y similares, la presente invención supera los desafíos mediante el uso de un proceso de filtración en profundidad de clarificación primaria que usa un dispositivo de filtración en profundidad de clarificación primaria sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria. La presente invención describe procesos y dispositivos para la clarificación primaria de un alimento floculado químicamente de acuerdo con las reivindicaciones.

Se describe un proceso para la clarificación primaria, por filtración en profundidad, de alimentos, corrientes de alimentos, materias primas de alimentos, caldos de cultivo celular y similares, que contienen una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y partículas coloidales sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, el proceso que comprende:

- a) proporcionar un dispositivo de filtración en profundidad que tiene medios filtrantes porosos de profundidad;
- b) proporcionar una corriente de alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y partículas, en donde los desechos celulares y las partículas tienen una distribución de tamaño de partículas de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm ;

c) poner en contacto los medios filtrantes de profundidad porosos con la corriente de alimento, de modo que los medios filtrantes de profundidad sean capaces de filtrar restos celulares y partículas que tengan una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 litros/ m^2/h hasta aproximadamente 100 litros/ m^2/h ; y

d) separar la biomolécula diana de interés de los restos celulares y las partículas sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria.

Se describe un proceso para la clarificación primaria mediante filtración en profundidad de un alimento floculado que contiene una biomolécula diana de interés o bioterapéutica de interés y restos celulares floculados, materiales y partículas coloidales mediante el uso de un dispositivo de filtración en profundidad primaria de clarificación sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, el proceso que comprende:

- a) proporcionar un dispositivo de filtración en profundidad que contiene un medio filtrante de profundidad poroso;
- b) proporcionar un floculante químico;
- c) proporcionar un alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de material celular, desechos y partículas coloidales;
- d) combinar el floculante químico al alimento;
- e) formar materiales celulares floculados químicamente, desechos y partículas coloidales en el alimento, y opcionalmente flocular químicamente la biomolécula diana de interés;
- f) poner en contacto los medios de filtro de profundidad porosa con el alimento que contiene los materiales celulares floculados químicamente, desechos y partículas coloidales; y
- g) separar las especies bimoleculares floculadas de interés y la pluralidad de material celular floculado sin el uso de una etapa de clarificación de centrifugación o una etapa de clarificación de microfiltración de flujo tangencial.

Se describe la clarificación primaria de un alimento mediante el uso de dispositivos de filtración en profundidad sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria. Los dispositivos de filtración en profundidad son capaces de filtrar alimentos con alto contenido de sólidos que contienen partículas que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm hasta 200 μm a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 litros/ m^2/h hasta aproximadamente 100 litros/ m^2/h hasta que el TMP alcanza 20 psi. Los medios de filtro de profundidad de clarificación primarios enseñados en la presente descripción incluyen capas porosas graduadas de grados de poro variables.

Una aplicación preferida de los medios de filtración en profundidad anisotrópicos porosos de clarificación primaria proporcionados en la presente descripción es la clarificación primaria de alimentos floculados con alto contenido de sólidos tratados químicamente que contienen una especie bimolecular o bioterapéutica de interés, y una pluralidad de restos celulares floculados y partículas coloidales floculadas.

Se describe un proceso para usar un dispositivo de filtración en profundidad que tiene un medio filtrante poroso en la clarificación primaria de alimentos floculados que contienen mAb, cultivos de células de mamíferos, cultivos de células vegetales, cultivos de células bacterianas, cultivos de células de insectos y otros materiales y cultivos celulares bimoleculares de interés, mediante la separación eficiente de las masas y los desechos celulares agregados floculados a partir de las especies biomoleculares de interés sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria mediante el uso de un medio de filtro de profundidad poroso basado en fibra capaz de realizar filtración en profundidad de un volumen de materia prima de alimento que contiene partículas muy grandes sin el efecto no deseado de la filtración de la torta.

Se describe un dispositivo de filtración en profundidad que incluye un medio de filtro de profundidad poroso que tiene múltiples capas graduadas para su uso en la clarificación primaria y la eliminación de la biomasa celular agregada, incluidos los restos celulares floculados y las partículas coloidales con un tamaño mayor de aproximadamente 10 micras (μm) o partículas más pequeñas con el uso de un agente floculante.

Se describe un dispositivo de filtración en profundidad que incluye un medio de filtro de profundidad poroso que tiene capas graduadas abiertas para su uso en la filtración en profundidad de clarificación primaria que permite la filtración en profundidad de restos celulares y partículas coloidales que tienen tamaños de partícula que varían de 0,5 μm hasta 200 μm , lo que mejora el rendimiento para las corrientes de alimento no clarificadas sin el efecto no deseado de la filtración de la torta.

Se describe un medio de filtración en profundidad:

- a) que tiene poros grandes para que penetren los grandes flóculos de restos celulares sin el efecto no deseado de la filtración de la torta o la formación de puentes de flóculos dentro de los poros del filtro;
- b) con una profundidad muy alta para extender las masas celulares para evitar el puente interno del flóculo, lo que conduciría a una filtración interna de la torta dentro del medio, externa o interna al medio para evitar la concentración de la caída de presión que podría causar la descomposición del flóculo;

- c) que tiene una capa de filtro de profundidad anisotrópica, es decir, con una reducción gradual en el tamaño de poro que coincide con la población del tamaño del flóculo en la materia prima de alimento. Para ciertas materias primas de alimento con una cantidad significativa de flóculos finos, tales como los producidos a partir de la floculación ácida en lugar de polímeros, la capa de filtro de profundidad incluye un medio compuesto que tiene una combinación de material de fieltro, se necesitan DE y fibras picadas para la eliminación fina;
- d) para la clarificación primaria de especies bimoleculares de interés con tamaños medios de partícula mayores de 10 μm , típico de las corrientes de alimento floculantes y tratadas químicamente, donde el filtro de profundidad incluye capas graduadas de fibras no tejidas con clasificaciones de tamaño de poro nominal abierto capaces de filtrar corrientes de alimento floculadas con alta cantidad de sólidos;
- e) de capas graduadas compuestas de fibras no tejidas y celulosa/tierra de diatomeas con clasificaciones de tamaño nominal de poro abierto capaces de filtrar corrientes de alimento tratadas con floculante de polímero con alta cantidad de sólidos;
- f) que tiene buenas propiedades de retención para los alimentos tratados con floculante polimérico (por ejemplo, polímero inteligente (SmP), quitosano, etc.) a pesar de la mayor permeabilidad;
- g) que tiene buenas propiedades de retención para los alimentos tratados con floculante polimérico (por ejemplo, precipitación ácida, ácido caprílico, etc.) a pesar de la mayor permeabilidad;
- h) usado en el proceso para la clarificación primaria de cultivos que contienen células y desechos celulares mediante el uso de un filtro de profundidad que comprende capas graduadas de fibras no tejidas; y
- i) usado en el proceso para la clarificación primaria de células floculadas y cultivos que contienen restos celulares mediante el uso de un filtro de profundidad que comprende capas graduadas de fibras no tejidas.

Se describe un prefiltro de medios de filtración en profundidad para filtros de profundidad que tienen un tamaño nominal de poro $<$ aproximadamente 25 μm que comprende capas graduadas de fibras no tejidas.

Se describe un prefiltro de medios de filtración en profundidad para filtros de profundidad con un tamaño nominal de poro aproximadamente $<$ 25 μm que comprende al menos tres capas graduadas de fibras no tejidas.

Se describe un medio de filtración en profundidad que incluye un filtro de profundidad que incluye al menos dos capas graduadas de fibras no tejidas con una clasificación de tamaño nominal de poro aproximadamente $>$ 25 μm capaz de filtrar corrientes de alimento floculadas con aproximadamente $>$ 3 % de sólidos.

Se describen medios de filtración en profundidad que incluyen un filtro de profundidad que incluye al menos dos capas graduadas de fibras no tejidas con una clasificación de tamaño nominal de poro aproximadamente $>$ 25 μm capaz de filtrar corrientes de alimento de polímero floculadas con aproximadamente $>$ 3 % de sólidos.

Se describen medios de filtración en profundidad que incluyen un filtro de profundidad que comprende al menos dos capas de fibras graduadas no tejidas con una clasificación de tamaño nominal de poro aproximadamente $>$ 25 μm capaces de filtrar corrientes de alimento de polímero floculadas con aproximadamente $>$ 3 % de sólidos que dan como resultado una turbidez de salida $<$ 20 NTU.

Para superar los desafíos actuales asociados con los filtros de profundidad, la presente invención se dirige hacia el desarrollo de medios de filtros de profundidad de clarificación primarios y el proceso de usar el mismo que puede filtrar corrientes de fluido con altos contenidos de sólidos que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 micras hasta 200 micras a una velocidad de flujo de aproximadamente 10 litros/ m^2/h (10 LMH) hasta 100 litros/ m^2/h (100 LMH) hasta que el TMP alcance 20 psi. El filtro de profundidad de clarificación primaria incluye capas graduadas que tienen varias clasificaciones de poros con la aplicación en la clarificación primaria para polímeros y alimentos floculados tratados químicamente.

La presente invención está dirigida a filtros de profundidad desechables para procesos de clarificación primaria. El uso de capas graduadas abiertas para la filtración en profundidad permite la filtración de alimentos que contienen grandes agrupaciones con el potencial de eliminar la centrifugación, y permite la filtración de sólidos más altos con tamaños de partículas que varían de aproximadamente 0,5 micras hasta aproximadamente 200 micras, lo que mejora el rendimiento para estas corrientes de alimento no aclarados.

Las características y ventajas adicionales de la invención se expondrán en la descripción detallada y en las reivindicaciones que siguen. Debe entenderse que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones, así como también los dibujos adjuntos son solo ilustrativos y explicativos, y están destinados a proporcionar una explicación de varias modalidades de las presentes enseñanzas. Las modalidades específicas descritas en este documento se ofrecen solo a modo de ejemplo y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta especificación, ilustran las modalidades contempladas y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Las **Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F** representan diferentes modalidades esquemáticas de ejemplos de filtros de profundidad de clarificación primaria, en donde la Figura 1A (ocho capas), la Figura 1C (siete capas) y la Figura 1E (ocho capas) representan filtros de profundidad de clarificación primaria para usar con alimentos tratados con polímero floculante (polímero inteligente), y las Figuras 1B, 1D y 1F representan filtros de profundidad de clarificación primaria que tienen al menos ocho capas para usar con alimentos tratados químicamente (tratamiento con ácido); y

La **figura 2** es una representación esquemática de un proceso ilustrativo de purificación de filtro de profundidad de clarificación primaria, como se describe en la presente descripción. El proceso de purificación que se muestra utiliza un biorreactor para el cultivo celular seguido de las siguientes etapas del proceso: filtración en profundidad de clarificación primaria; Cromatografía de unión y elución de proteína A (captura); inactivación de virus; purificación de flujo continuo; y formulación. Como se muestra, cada una de las etapas del proceso emplea uno o más dispositivos que se usan para lograr el resultado deseado de la etapa del proceso. Como se muestra, la clarificación emplea una filtración en profundidad de clarificación graduada como se enseña aquí y se representa en las Figuras 1A a 1F; la cromatografía de unión y elución de la Proteína A se realiza mediante el uso de cromatografía continua de múltiples columnas (CMC); la inactivación de virus emplea dos mezcladores estáticos en línea; la purificación de flujo continuo emplea carbón activado (AC) seguido de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) seguido de un cambio de pH mediante el uso de un mezclador estático en línea y un tanque de compensación seguido de cromatografía de intercambio catiónico de flujo continuo (CEX) y filtración de virus; y la formulación emplea un dispositivo de filtración de flujo tangencial de diafiltración/concentración seguido de filtración estéril. Uno o más filtros estériles se emplean, además, a través de todo el proceso.

Descripción de las modalidades

Para los propósitos de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y otros valores numéricos usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente" aunque no se indique explícitamente. El término "aproximadamente" generalmente se refiere a un intervalo de números que uno consideraría equivalente al valor citado (es decir, que tiene la misma función o resultado). En muchos casos, el término "aproximadamente" puede incluir números que se redondean a la cifra significativa más cercana.

En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar en dependencia de las propiedades deseadas que se pretende obtener con la presente invención. Como mínimo, y sin intentar limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos según el número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas ordinarias de redondeo.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se indican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. Además, debe entenderse que todos los intervalos descritos en el presente documento abarcan todos los subintervalos incluidos en los mismos. Por ejemplo, un intervalo de "1 a 10" incluye todos y cada uno de los subintervalos entre (e incluyendo) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10, es decir, todos y cada uno de los subintervalos tienen un valor mínimo igual o mayor que 1 y un valor máximo igual o inferior a 10, por ejemplo, 5,5 hasta 10.

Antes de describir la presente invención con más detalle, se definirán varios términos. El uso de estos términos no limita el alcance de la invención, sino que solo sirve para facilitar la descripción de la invención.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica con la cual se relaciona esta invención. Los siguientes términos se definen para los fines de la invención como se describe en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente de otra manera.

El término "biorreactor", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier dispositivo o sistema fabricado o diseñado que soporta un entorno biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el cual se lleva a cabo un proceso de cultivo celular que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de tales organismos. Tal proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Los biorreactores de uso común son típicamente cilíndricos, varían en tamaño desde litros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, un biorreactor está hecho de un material diferente al acero y es desechable o de un solo uso. Se contempla que el volumen total de un biorreactor puede ser cualquier volumen

que oscile entre 100 mL y hasta 10 000 litros o más, en dependencia de un proceso particular. En algunas modalidades de acuerdo con los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, el biorreactor está conectado a una unidad de operación tal como un filtro de profundidad. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, un biorreactor se usa tanto para el cultivo celular como para la precipitación, donde puede añadirse un precipitante directamente a un biorreactor, para precipitar así una o más impurezas.

El término "cultivo celular" se refiere a células cultivadas en suspensión, frascos rotativos, matraces y similares, así como a los componentes de la suspensión en sí, que incluyen, entre otros, células, restos celulares, contaminantes celulares, partículas coloidales, biomoléculas, HCP, proteínas de la célula huésped (HCP) y ADN, mAb, floculantes. Los enfoques a gran escala, tales como los biorreactores, incluidas las células adherentes que crecen unidas a microportadores en fermentadores agitados, se incluyen, además en el término "cultivo celular". Además, es posible no solo cultivar células dependientes del contacto, sino además usar las técnicas de cultivo en suspensión en los métodos de la invención reivindicada. Los microportadores ilustrativos incluyen, por ejemplo, dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros como se describe en Butler, Spier & Griffiths, *Animal cell Biotechnology* 3:283-303 (1988). Además, pueden usarse portadores porosos, tales como, por ejemplo, Cytoline.RTM. o Cytopore.RTM., así como también portadores a base de dextrano, tales como DEAE-dextrano (Cytodex 1.RTM.), dextrano recubierto con amina cuaternaria (Cytodex 2.RTM.) o portadores a base de gelatina, portadores como dextrano recubierto con gelatina (Cytodex 3.RTM.). La presente invención abarca los procedimientos de cultivo celular para la producción de proteínas tanto a gran escala como a pequeña escala. Pueden usarse procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de lecho fluidizado, un biorreactor de fibra hueca, un cultivo en botella de rodillo o un sistema de biorreactor de tanque agitado, con o sin microportadores, y puede operar alternativamente en modo de lote, lote de alimentación o perfusión.

Los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" se refieren a una solución nutritiva usada para el crecimiento de células animales, por ejemplo, células de mamíferos. Dicha solución nutritiva generalmente incluye varios factores necesarios para la adhesión celular, el crecimiento y el mantenimiento del entorno celular. Por ejemplo, una solución nutritiva típica puede incluir una formulación de medios basales, varios suplementos en dependencia del tipo de célula y, ocasionalmente, antibióticos. En algunas modalidades, una solución nutritiva puede incluir al menos un componente de una o más de las siguientes categorías: 1) una fuente de energía, generalmente en forma de carbohidrato tal como glucosa; 2) todos los aminoácidos esenciales, y generalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cistina; 3) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones; 4) ácidos grasos libres; y 5) oligoelementos, donde los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos o elementos naturales que generalmente se requieren a concentraciones muy bajas, generalmente en el intervalo micromolar. La solución nutritiva puede suplementarse opcionalmente con uno o más componentes de cualquiera de las siguientes categorías: 1) hormonas y otros factores de crecimiento como, por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico; 2) sales y tampones como, por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato; 3) nucleósidos y bases tales como, por ejemplo, adenosina y timidina, hipoxantina; y 4) hidrolizados de proteínas y tejidos. En general, puede usarse cualquier medio de cultivo celular adecuado. El medio puede estar compuesto por suero, por ejemplo suero fetal bovino, suero de ternera o similares. Alternativamente, el medio puede estar libre de suero, libre de animal o libre de proteína.

El término "aditivo de cultivo celular", como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula (por ejemplo, un aditivo no proteico), que se añade a un proceso de cultivo celular con el fin de facilitar o mejorar el cultivo celular o el proceso de fermentación. En algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, un polímero sensible a estímulos, como se describe en la presente descripción, se une y precipita uno o más aditivos del cultivo celular. Los aditivos de cultivo celular ilustrativos incluyen agentes antiespumantes, antibióticos, colorantes y nutrientes.

Los términos "proteína de células de ovario de hámster chino" y "CHOP", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a una mezcla de proteínas de células huésped ("HCP") derivadas de un cultivo de células de ovario de hámster chino ("CHO"). HCP o CHOP generalmente están presentes como una impureza en un medio de cultivo celular o lisado (por ejemplo, un fluido de cultivo celular cosechado que contiene una proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo o inmunoadhesina expresado en una célula CHO). Generalmente, la cantidad de CHOP presente en una mezcla que comprende una proteína de interés proporciona una medida del grado de pureza de la proteína de interés. Típicamente, la cantidad de CHOP en una mezcla de proteínas se expresa en partes por millón en relación con la cantidad de proteína de interés en la mezcla. Se entiende que cuando la célula huésped es otro tipo de célula de mamífero, una *E. coli*, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal, HCP se refiere a las proteínas, distintas de la proteína diana, que se encuentran en un lisado de la célula huésped.

Los términos "contaminante", "impureza" y "desecho", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a cualquier material exógeno u objetable, incluida una macromolécula biológica tal como un ADN, un ARN, una o más proteínas de célula huésped (HCP o CHOP), endotoxinas, virus, lípidos y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene una proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo) que se separa de una o más de las moléculas exógenas u objetables mediante el uso de un polímero sensible a estímulos. En algunas modalidades, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente descripción se une y precipita una proteína o polipéptido de interés de una muestra que contiene la proteína o polipéptido de interés y una o más

impurezas. En otras modalidades, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente descripción se une y precipita una o más impurezas, y así separa el polipéptido o la proteína de interés de una o más impurezas.

El término "tanque de compensación", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier contenedor o recipiente o bolsa, que se usa entre las etapas del proceso o dentro de una etapa del proceso (por ejemplo, cuando una sola etapa del proceso comprende más de una etapa); donde la salida de una etapa fluye a través del tanque de compensación a la etapa siguiente. En consecuencia, un tanque de compensación es diferente de un tanque de depósito, en el sentido de que no está destinado a retener o recoger todo el volumen de salida de una etapa; pero en su lugar permite un flujo continuo de salida de una etapa a la siguiente. En algunas modalidades, el volumen de un tanque de compensación usado entre dos etapas del proceso o dentro de una etapa del proceso en un proceso o sistema descrito en la presente descripción, no es más del 25 % del volumen total de la salida de la etapa del proceso. En otra modalidad, el volumen de un tanque de compensación no es más del 10 % del volumen total de la salida de una etapa del proceso. En algunas otras modalidades, el volumen de un tanque de compensación es menos del 35 %, o menos del 30 %, o menos del 25 %, o menos del 20 %, o menos del 15 %, o menos del 10 % el volumen total de un cultivo celular en un biorreactor, que constituye el material de partida a partir del cual se va a purificar una molécula diana.

El término "mezclador estático" se refiere a un dispositivo para mezclar dos materiales fluidos, típicamente líquidos. El dispositivo generalmente consiste en elementos mezcladores contenidos en una carcasa cilíndrica (tubo). El diseño general del sistema incorpora un método para suministrar dos corrientes de fluidos al mezclador estático. A medida que las corrientes se mueven a través del mezclador, los elementos que no se mueven mezclan continuamente los materiales. La mezcla completa depende de muchas variables, incluidas las propiedades de los fluidos, el diámetro interno del tubo, el número de elementos del mezclador y sus diseños, etc.

Como se usa en la presente descripción, el término "filtro de profundidad" (por ejemplo, filtro de profundidad de gradiente de densidad) logra la filtración dentro de la profundidad del material de filtro. Una clase común de tales filtros son aquellos que comprenden una matriz aleatoria de fibras unidas (o fijadas de otro modo), para formar un complejo y tortuoso laberinto de canales de flujo. La separación de partículas en estos filtros generalmente resulta del atrapamiento o adsorción a la matriz de fibra. El medio de filtro de profundidad utilizado con mayor frecuencia para el bioprocesamiento de caldos de cultivo celular y otras materias primas de alimento consiste en fibras de celulosa, un coadyuvante de filtración como DE y un aglutinante de resina cargado positivamente. Los medios de filtro de profundidad, a diferencia de los filtros absolutos, retienen partículas a través de los medios porosos, lo que permite la retención de partículas tanto más grandes como más pequeñas que el tamaño de poro. Se cree que la retención de partículas implica tanto la exclusión por tamaño como la adsorción a través de interacciones hidrófobas, iónicas y otras. El mecanismo de ensuciamiento puede incluir bloqueo de poros, formación de torta y/o constricción de poros. Los filtros de profundidad son ventajosos porque eliminan contaminantes y además vienen en formatos desechables, lo que elimina los problemas de validación.

El término "matriz de cromatografía de afinidad", como se usa en la presente descripción, se refiere a una matriz de cromatografía que porta ligandos adecuados para la cromatografía de afinidad. Típicamente, el ligando (por ejemplo, la Proteína A o una variante funcional o fragmento de la misma) está unido covalentemente a un material de matriz de cromatografía y es accesible a la molécula diana en solución cuando la solución entra en contacto con la matriz de cromatografía. Un ejemplo de una matriz de cromatografía de afinidad es una matriz de Proteína A. Una matriz de cromatografía de afinidad se une típicamente a las moléculas diana con alta especificidad basada en un mecanismo de llave/cerradura, como la unión antígeno/anticuerpo o enzima/receptor. Ejemplos de matrices de afinidad son las matrices que portan ligandos de proteína A como Protein A SEPHAROSE™ o PROSEP®-A. En los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, puede usarse una etapa de cromatografía de afinidad como la etapa de cromatografía de unión y elución en todo el proceso de purificación.

Los términos "intercambio iónico" y "cromatografía de intercambio iónico", como se usan en la presente descripción, se refieren al proceso cromatográfico en el cual un soluto o analito de interés (por ejemplo, una molécula diana que se purifica) en una mezcla, interactúa con un compuesto cargado unido (como por unión covalente) a un material de intercambio iónico en fase sólida, de modo que el soluto o analito de interés interactúa de manera no específica con el compuesto cargado más o menos que las impurezas o contaminantes del soluto en la mezcla. Los solutos contaminantes en la mezcla eluyen a partir de una columna del material de intercambio iónico más rápido o más lento que el soluto de interés o están unidos o excluidos de la resina con respecto al soluto de interés.

La "cromatografía de intercambio iónico" incluye específicamente el intercambio catiónico, el intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio iónico en modo mixto. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico puede unir la molécula diana (por ejemplo, una región Fc que contiene proteína diana) seguida de elución (por ejemplo, mediante el uso de la cromatografía de intercambio catiónico y eluyente o "CIEX") o puede unir predominantemente las impurezas mientras que la molécula diana "fluye a través" de la columna (flujo de intercambio catiónico a través de la cromatografía FT-CIEX). La cromatografía de intercambio aniónico puede unir la molécula diana (por ejemplo, una región Fc que contiene proteína diana) seguida de elución o puede unir predominantemente las impurezas mientras la molécula diana "fluye a través" de la columna conocida, además, como cromatografía negativa. En algunas

modalidades y como se demuestra en los Ejemplos expuestos en la presente descripción, la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se realiza en un modo de flujo continuo.

El término "matriz de intercambio iónico" se refiere a una matriz que está cargada negativamente (es decir, un medio de intercambio catiónico) o cargada positivamente (es decir, un medio de intercambio aniónico). La carga puede proporcionarse al unir uno o más ligandos cargados a la matriz, por ejemplo, mediante enlace covalente. Alternativamente, o además, la carga puede ser una propiedad inherente de la matriz (por ejemplo, como es el caso de la sílice, que tiene una carga general negativa).

El término "matriz de intercambio aniónico" se usa en la presente descripción para referirse a una matriz que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios, unidos a la misma. Las resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen celulosa DEAE, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare). Otros materiales ilustrativos que pueden usarse en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción son Fractogel® EMD TMAE, Fractogel® EMD TMAE highcap, Eshmuno® Q y Fractogel® EMD DEAE (EMD Millipore).

El término "matriz de intercambio catiónico" se refiere a una matriz que está cargada negativamente y que tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa en contacto con la fase sólida de la matriz. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la matriz de intercambio catiónico o la resina puede ser, por ejemplo, un carboxilato o sulfonato. Las matrices de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de GE Healthcare) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de GE Healthcare). Se prefieren Fractogel® EMD SO₃, Fractogel® EMD SE Highcap, Eshmuno® S y Fractogel® EMD COO (EMD Millipore).

El término "impureza" o "contaminante", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula extraña u objetable, que incluye una macromolécula biológica tal como ADN, ARN, una o más proteínas de células huésped, endotoxinas, lípidos y uno o más aditivos que pueden estar presentes en una muestra que contiene la molécula diana que se está separando de una o más de las moléculas extrañas u objetables mediante el uso de un proceso de la presente invención. Además, tal impureza puede incluir cualquier reactivo que se use en una etapa que pueda ocurrir antes del método de la invención. Una impureza puede ser soluble o insoluble en la naturaleza.

El término "impureza insoluble", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier entidad indeseable u objetable presente en una muestra que contiene una molécula diana, donde la entidad es una partícula suspendida o un sólido. Las impurezas insolubles ilustrativas incluyen células enteras, fragmentos celulares y desechos celulares.

El término "impureza soluble", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier entidad indeseable u objetable presente en una muestra que contiene una molécula diana, donde la entidad no es una impureza insoluble. Las impurezas solubles ilustrativas incluyen proteínas de la célula huésped (HCP), ADN, ARN, virus, endotoxinas, componentes de medios de cultivo celular, lípidos, etc.

El término "proceso continuo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso para purificar una molécula diana, que incluye dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), de modo que la salida de una etapa de un proceso fluya directamente a la siguiente etapa del proceso en el proceso, sin interrupción, y donde dos o más etapas del proceso pueden realizarse simultáneamente durante al menos una parte de su duración. En otras palabras, en el caso de un proceso continuo, como se describe en la presente descripción, no es necesario completar una etapa del proceso antes de que comience la siguiente etapa del proceso, pero una parte de la muestra siempre está en movimiento a través de las etapas del proceso. El término "proceso continuo" se aplica, además, a las etapas dentro de una etapa del proceso, en cuyo caso, durante la ejecución de una etapa del proceso que incluye múltiples etapas, la muestra fluye continuamente a través de las múltiples etapas que son necesarias para realizar la etapa del proceso. Un ejemplo de tal etapa del proceso descrito en la presente descripción es la etapa de purificación de flujo continuo que incluye múltiples etapas que se realizan de manera continua, por ejemplo, flujo continuo a través de carbón activado seguido de flujo continuo a través medios AEX seguido flujo continuo a través de medios CEX de seguido de flujo continuo a través de filtración de virus.

En algunas modalidades, se usa un filtro de profundidad, como se describe en la presente descripción, para la clarificación, después de lo cual el cultivo celular clarificado puede fluir continuamente sobre la siguiente etapa en el proceso de purificación, por ejemplo, una etapa de cromatografía de unión y elución (por ejemplo, cromatografía de afinidad de Proteína A).

El término "proceso semicontinuo", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso generalmente continuo para purificar una molécula diana, donde la entrada del material fluido en cualquier etapa del proceso o la salida es discontinua o intermitente. Por ejemplo, en algunas modalidades de acuerdo con la presente invención, la entrada en una etapa del proceso (por ejemplo, una etapa de cromatografía de unión y elución) puede cargarse continuamente; sin embargo, la salida puede recopilarse de forma intermitente, donde las otras etapas del proceso en el proceso de purificación son continuas. Por consiguiente, en algunas modalidades, los procesos y sistemas descritos

en la presente descripción son de naturaleza "semicontinua", en el sentido de que incluyen al menos una operación unitaria que se opera de manera intermitente, mientras que las otras operaciones unitarias en el proceso o sistema pueden operarse de manera continua.

El término "proceso conectado" se refiere a un proceso para purificar una molécula diana, donde el proceso comprende dos o más etapas del proceso (u operaciones unitarias), que están en comunicación directa de fluido entre sí, de modo que el material fluido fluya continuamente a través de la etapa del proceso en el proceso y está en contacto simultáneo con dos o más etapas del proceso durante el funcionamiento normal del proceso. Se entiende que a veces, al menos una etapa del proceso en el proceso puede aislarse temporalmente de las otras etapas del proceso mediante una barrera, tal como una válvula en la posición cerrada. Este aislamiento temporal de las etapas individuales del proceso puede ser necesario, por ejemplo, durante el inicio o apagado del proceso o durante la eliminación/reemplazo de las operaciones unitarias individuales. El término "proceso conectado" se aplica, además, a las etapas dentro de una etapa del proceso, por ejemplo, cuando una etapa del proceso requiere que se realicen varias etapas para lograr el resultado deseado de la etapa del proceso. Uno de estos ejemplos es la etapa del proceso de purificación de flujo continuo, como se describe en la presente descripción, que puede incluir varias etapas para realizarse en un modo de flujo continuo, por ejemplo, carbón activado; cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y filtración de virus.

El término "comunicación fluida", como se usa en la presente descripción, se refiere al flujo de material fluido entre dos etapas del proceso o al flujo de material fluido entre las etapas de una etapa del proceso, donde las etapas del proceso están conectadas por cualquier medio adecuado (por ejemplo, una línea de conexión o tanque de compensación), para permitir el flujo de fluido de una etapa del proceso a otra etapa del proceso. En algunas modalidades, una línea de conexión entre dos operaciones unitarias puede interrumpirse por una o más válvulas para controlar el flujo de fluido a través de la línea de conexión.

Los términos "purificar", "purificación", "separar", "separación", "separación", "aislar", o "aislamiento", como se usan en la presente descripción, se refieren al aumento del grado de pureza de una molécula diana a partir de una muestra que comprende la molécula diana y una o más impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la molécula diana aumenta al eliminar (total o parcialmente) al menos una impureza de la muestra.

El término "precipitar", "precipitado" o "precipitación" como se usa en la presente descripción, se refiere al proceso usado en la clarificación, en el que las propiedades de las impurezas indeseables se modifican de modo que puedan separarse más fácilmente de la molécula diana soluble. Esto se logra típicamente mediante la formación de grandes partículas agregadas y/o complejos insolubles que contienen las impurezas indeseables. Estas partículas tienen propiedades (por ejemplo, densidad o tamaño) de manera que pueden separarse más fácilmente de la fase líquida que contiene la molécula diana soluble, tal como por filtración o centrifugación. En algunos casos, se efectúa un cambio de fase, de modo que las impurezas indeseables pueden separarse más fácilmente de la molécula diana soluble. La precipitación por cambio de fase puede efectuarse mediante la adición de un agente precipitante, tal como un polímero o una molécula pequeña. En una modalidad particular, el precipitante es un polímero sensible al estímulo, denominado, además, polímero inteligente. En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el precipitante o agente precipitante es un floculante. La floculación, como se usa en la presente descripción, es una forma de realizar la precipitación donde el desempeño generalmente depende de la concentración de floculante usada ("dependiente de la dosis"). Los agentes floculantes típicos son los polielectrolitos, como los policationes, que forman complejos con impurezas con carga opuesta.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la clarificación emplea la adición de un precipitante a una muestra que contiene una molécula diana y una o más impurezas, seguido de filtración en profundidad. En algunos casos, puede usarse un cambio en las condiciones de la solución (tales como temperatura, pH, salinidad) para iniciar la precipitación, como en el caso de los polímeros sensibles al estímulo. El material precipitado que contiene la una o más impurezas, así como también el agente precipitante, se elimina al recuperar la molécula diana en la fase líquida, donde el líquido luego se somete típicamente a etapas adicionales de proceso con el fin de purificar aún más la molécula diana.

La precipitación puede realizarse directamente en un biorreactor que contiene un cultivo celular que expresa una molécula diana a purificar, donde se agrega un precipitante directamente al biorreactor. Alternativamente, el precipitante puede agregarse al cultivo celular, que típicamente contiene la molécula diana, en un recipiente separado.

Los expertos en la técnica conocen muchas maneras de eliminar el material precipitado, tales como filtración o sedimentación o cualquier combinación de las mismas.

El término "sedimentación", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso de sedimentación en el cual el material precipitado migra al fondo de un recipiente bajo la influencia de fuerzas gravitacionales. La sedimentación puede seguirse por decantación o filtración de la fase líquida o sobrenadante.

Como se usa en la presente descripción, el término "polímero inteligente" (SmP), (conocido, además, como polímeros sensibles a los estímulos o polímeros inteligentes o Macro Ligandos de Afinidad (AML)), como se usa en la presente

descripción, significa un grupo de polímeros que responden biológica, química o físicamente a un estímulo externo tal como a cambios en las condiciones ambientales tales como pH, temperatura, luz, fuerza iónica, radiación, voltaje, presión externa, composición de solventes u otro estímulo. Los polímeros inteligentes responden con grandes cambios de propiedades a pequeños estímulos físicos o químicos, y pueden cambiar reversiblemente sus propiedades físicas o químicas en respuesta a estos estímulos ambientales (Roy y Gupta, 2003; Kopecek, 2007). Los polímeros inteligentes pueden tomar muchas formas; pueden disolverse en una solución acuosa, adsorberse o injertarse en interfaces sólido-acuosas, o reticularse para formar hidrogeles [Hoffman J Controlled Release (1987) 6:297-305; Hoffman Intelligent Polymers. En: Park K, ed. Controlled drug delivery. Washington: ACS Publications, (1997) 485-98; Hoffman Intelligent polymers in medicine and biotechnology. Artif Organs (1995) 19:458-467]. Típicamente, cuando se estimula la respuesta crítica del polímero, el polímero inteligente en solución mostrará un inicio repentino de turbidez a medida que se separa en fases; el polímero inteligente adsorbido o injertado en la superficie colapsará, convertirá la interfaz de hidrófila a hidrófoba; y el polímero inteligente (reticulado en forma de hidrogel) exhibirá un colapso agudo y liberará gran parte de su solución de hinchamiento. Los polímeros inteligentes pueden mezclarse físicamente o conjugarse químicamente con biomoléculas para producir una gran familia de sistemas polímero-biomolécula que pueden responder a estímulos tanto biológicos como físicos y químicos. Las biomoléculas que pueden estar conjugadas con polímeros incluyen proteínas y oligopéptidos, azúcares y polisacáridos, oligonucleótidos monocatenarios y bicatenarios y plásmidos de ADN, lípidos y fosfolípidos simples, y un amplio espectro de ligandos de reconocimiento y moléculas de fármacos sintéticos. Varios parámetros estructurales controlan la capacidad de los polímeros inteligentes para precipitar específicamente proteínas de interés; los polímeros inteligentes deben contener grupos reactivos para el acoplamiento de ligandos; no interactuar fuertemente con las impurezas; hacer que el ligando esté disponible para la interacción con la proteína diana; y formar precipitados compactos.

Como se usa en la presente descripción, la frase alimento con "alto contenido de sólidos" significa un alimento que tiene aproximadamente > 7 % de sólidos, mientras que la frase "bajo contenido de sólidos" de alimentos sería de aproximadamente 0,1 % -7 % de sólidos.

Los términos "estímulo" o "estímulos", como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a un cambio físico o químico en el entorno que da como resultado una respuesta de un polímero sensible a estímulos descrito en la presente invención. Por consiguiente, se describen polímeros nuevos que responden a un estímulo, y cuyo estímulo da como resultado un cambio en la solubilidad del polímero. Los ejemplos de estímulos a los que responden uno o más polímeros descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, cambios en la temperatura, cambios en la conductividad y/o cambios en el pH. En algunas modalidades, un estímulo comprende la adición de un agente complejante o una sal formadora de complejos a una muestra. En diversas modalidades, generalmente se añade un estímulo después de la adición de un polímero a una muestra. Aunque el estímulo también puede añadirse durante o antes de la adición de un polímero a una muestra.

El término "polímero", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula formada mediante enlaces covalentes de dos o más unidades de monómero. Estas unidades de monómero pueden ser sintéticas o darse en la naturaleza. Los polímeros formados por las unidades repetitivas pueden ser lineales o ramificados. Los ejemplos de polímeros incluyen, entre otros, polietilenglicol, polipropilenglicol, polietileno, polialilamina, polivinilalcohol, poliestireno y copolímeros (por ejemplo, poliestiren-co-polipiridina, ácido poliacrílico-co-metacrilato de metilo), Pluronic, PF68, etc. En algunas modalidades, los polímeros comprenden una cadena principal de polielectrolitos.

Los términos "Proteína A" y "Prot A" se usan indistintamente en la presente descripción y abarcan la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, la proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, por síntesis de péptidos o por técnicas recombinantes), y sus variantes que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región CH_2/CH_3 , tal como una región Fc. La proteína A puede adquirirse comercialmente de Repligen, GE o Fermatech. La proteína A generalmente se inmoviliza en una matriz de cromatografía. Un derivado funcional, fragmento o variante de la proteína A usada en los métodos y sistemas descritos puede caracterizarse por una constante de unión de al menos $K = 10^8 \text{ M}$, y preferentemente $K = 10^9 \text{ M}$, para la región Fc de IgG2a de ratón o IgG1 humano. Una interacción que cumple con dicho valor para la constante de unión se denomina "unión de alta afinidad" en el presente contexto. En algunas modalidades, dicho derivado funcional o variante de la proteína A comprende al menos parte de un dominio funcional de unión a IgG de la proteína A de tipo salvaje, seleccionada de los dominios naturales E, D, A, B, C o mutantes modificados por ingeniería genética de la misma que han retenido funcionalidad de unión a IgG.

Además, los derivados de proteína A o las variantes diseñadas para permitir una unión de un solo punto a un soporte sólido pueden usarse, además, en la etapa de cromatografía de afinidad en los métodos reivindicados.

La unión a un solo punto generalmente significa que el resto de proteína se une a través de un enlace covalente único a un material de soporte cromatográfico de la cromatografía de afinidad de Proteína A. Tal unión a un solo punto puede producirse, además, mediante el uso de residuos adecuadamente reactivos que se colocan en una posición expuesta de aminoácidos, concretamente en un bucle, cerca del extremo N o C o en cualquier otro lugar en la circunferencia externa del pliegue proteico. Grupos reactivos adecuados son, por ejemplo, funciones sulfhidrilo o amino.

En algunas modalidades, los derivados de la proteína A de las variantes se unen mediante una unión multipunto a una matriz de cromatografía adecuada.

El término "matriz de cromatografía de afinidad", como se usa en la presente descripción, se refiere a una matriz de cromatografía que porta ligandos adecuados para la cromatografía de afinidad. Típicamente, el ligando (por ejemplo, la Proteína A o una variante funcional o fragmento de la misma) está unido covalentemente a un material de matriz de cromatografía y es accesible a la molécula diana en solución cuando la solución entra en contacto con la matriz de cromatografía. Un ejemplo de una matriz de cromatografía de afinidad es una matriz de Proteína A. Una matriz de cromatografía de afinidad se une típicamente a las moléculas diana con alta especificidad basada en un mecanismo de llave/cerradura, como la unión antígeno/anticuerpo o enzima/receptor. Ejemplos de matrices de afinidad son las matrices que portan ligandos de proteína A como Protein A SEPHAROSE™ o PROSEP®-A. En los procesos y sistemas descritos en la presente descripción, puede usarse una etapa de cromatografía de afinidad como la etapa de cromatografía de unión y elución en todo el proceso de purificación.

El término "polímero sensible a estímulos", como se usa en la presente descripción, es un polímero que exhibe un cambio en una propiedad física y/o química después de la adición de un estímulo. Una respuesta típica a un estímulo es un cambio en la solubilidad del polímero. Por ejemplo, el polímero poli(N-isopropilacrilamida) es soluble en agua a temperaturas inferiores a aproximadamente 35 °C, pero se vuelve insoluble en agua a temperaturas de aproximadamente 35 °C.

El término "floculación", como se usa en la presente descripción, se refiere a la adición de un floculante, tal como un polímero o químicamente tratado (por ejemplo, tratamiento ácido) descrito en la presente descripción, a una disolución con el fin de eliminar una o más impurezas suspendidas insolubles o solubles. El polímero debe añadirse a la disolución a una concentración que permita la formación espontánea de agregados insolubles que pueden eliminarse de la disolución mediante los métodos típicos de separación sólido-líquido.

Los términos "composición", "disolución" o "muestra", como se usan en la presente descripción, se refieren a una mezcla de una molécula diana o un producto deseado a purificar mediante el uso de uno o más polímeros sensibles a estímulos o químicamente tratados (por ejemplo, tratamiento ácido) descritos en la presente descripción junto con una o más entidades indeseables o impurezas. En algunas modalidades, la muestra comprende una materia prima de alimento o medio de cultivo celular en el que se secreta una molécula diana o un producto deseado. En algunas modalidades, la muestra comprende una molécula diana (por ejemplo, una proteína terapéutica o un anticuerpo) junto con una o más impurezas (por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, lípidos, aditivos de cultivo celular, células y restos celulares). En algunas modalidades, la muestra comprende una molécula diana de interés que se secreta en los medios de cultivo celular.

En algunas modalidades, una muestra de la que se va a purificar una molécula diana mediante el uso de uno o más polímeros sensibles a estímulos o químicamente tratados (por ejemplo, tratamiento ácido) descritos en la presente descripción se "purifica parcialmente" antes de poner en contacto la muestra con un polímero sensible a estímulos. La purificación parcial puede lograrse, por ejemplo, al someter la muestra a una o más etapas de purificación, tales como, por ejemplo, una o más etapas de cromatografía que no son de afinidad. La molécula diana puede separarse de una o más entidades o impurezas indeseables al precipitar la o las impurezas o al precipitar la molécula diana.

Los términos "precipitar" o "precipitación", como se usan en la presente descripción, se refieren a la alteración de un polímero unido (por ejemplo, en un complejo con una biomolécula de interés) o polímero no unido u otra especie soluble de un estado acuoso y/o soluble a un estado no acuoso y/o insoluble.

El término "biomolécula de interés" como se usa en la presente descripción, puede ser una molécula diana deseada, tal como, por ejemplo, un producto o polipéptido deseado de interés (por ejemplo, un anticuerpo), o puede ser una entidad indeseable, que debe eliminarse de una muestra que contiene la molécula diana deseada. Dichas entidades indeseables incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, una o más impurezas seleccionadas de proteínas de la célula huésped, ADN, ARN, agregados de proteínas, aditivos de cultivo celular, virus, endotoxinas, células enteras y restos celulares. Además, la biomolécula de interés puede unirse y precipitarse mediante un polímero sensible al estímulo o tratarse químicamente (por ejemplo, tratamiento con ácido) como se describe en la presente descripción.

Los términos "molécula diana", "biomolécula diana", "molécula diana deseada" y "biomolécula diana deseada", como se usan indistintamente en la presente descripción, generalmente se refieren a un polipéptido o producto de interés, que se desea purificar o separar de una o más entidades indeseables, por ejemplo, una o más impurezas, que pueden estar presentes en una muestra que contiene el polipéptido o el producto de interés.

Los términos "proteína de interés", "polipéptido diana", "polipéptido de interés" y "proteína diana", tal como se usan indistintamente en la presente descripción, generalmente se refieren a una proteína terapéutica o polipéptido, que incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que debe purificarse mediante el uso de un polímero sensible al estímulo de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en la presente memoria de manera intercambiable, el término "polipéptido" o "proteína" generalmente se refiere a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. En algunas modalidades, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se usa para separar una proteína o polipéptido de una o más entidades indeseables presentes en una muestra junto con la proteína o polipéptido. En algunas modalidades, la o las entidades son una o más impurezas que pueden estar presentes en una muestra junto con la proteína o polipéptido a purificar. Como se discutió anteriormente, en algunas modalidades, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se une y precipita específicamente una proteína o polipéptido de interés tras la adición de un estímulo a la muestra. En otras modalidades, un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria se une y precipita una entidad distinta de la proteína o polipéptido de interés, tal como, por ejemplo, proteínas de la célula huésped, ADN, virus, células completas, restos celulares y aditivos de cultivo celular, tras la adición de un estímulo.

En algunas modalidades, una proteína o polipéptido que se purifica mediante el uso de un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria es una proteína de mamífero, por ejemplo, una proteína terapéutica o una proteína que puede usarse en terapia. Las proteínas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, que incluye la hormona del crecimiento humano y la hormona del crecimiento bovina; factor liberador de hormona del crecimiento, hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación; factores anticoagulantes; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético, factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (expresado y secretado por células T normales, y regulado por activación); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora Mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, como la beta-lactamasa; Dnasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF); factor de crecimiento similar a insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP); proteínas CD; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de superficie de membrana; factor de aceleración de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores de direccionamiento de tejido; adresinas; proteínas reguladoras, integrinas; un antígeno asociado a tumor tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Además, en algunas modalidades, una proteína o polipéptido purificado mediante el uso de un polímero inteligente de acuerdo con la presente invención, es un anticuerpo, fragmento funcional o variante del mismo. En algunas modalidades, una proteína de interés es una proteína recombinante que contiene una región Fc de una inmunoglobulina.

Los términos "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (usados de manera intercambiable en la presente memoria) se refieren a una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y dichas cadenas se estabilizan, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro intercatenarios, que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina de cadena sencilla" o "anticuerpo de cadena sencilla" (usado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas polipeptídicas que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, estabilizándose dichas cadenas, por ejemplo, mediante enlaces peptídicos intercatenarios, que tienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprenden de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina β plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan en la presente memoria adicionalmente como "constantes" o "variables", basándose en la falta relativa de variación de secuencias dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o en la variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de los anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica como "regiones" de los anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de los anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

Las inmunoglobulinas o los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica, por ejemplo, los anticuerpos IgM que existen en forma pentamérica y/o los anticuerpos IgA que existen en forma monomérica, dimerica o multimérica. Las inmunoglobulinas o los anticuerpos además pueden incluir anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que retengan o se modifiquen para comprender un dominio de unión específico del ligando. El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos residuos de aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos, además, pueden obtenerse por medios recombinantes. Cuando se producen de forma recombinante, los fragmentos pueden expresarse solos o como parte de una proteína más grande llamada proteína de fusión. Los fragmentos ilustrativos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y/o Fv. Las proteínas de fusión ilustrativas incluyen las proteínas de fusión Fc.

Generalmente, una inmunoglobulina o anticuerpo se dirige contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante, y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, se contemplan, además, los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como los antígenos de glucolípidos asociados a tumores; ver la patente de EE.UU. núm. 5,091,178). Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o un ligando, como un factor de crecimiento.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y otros, Nature 256:495 (1975), o pueden elaborarse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. núm. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" además pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos mediante el uso de las técnicas descritas en Clackson y otros, Nature 352:624-628 (1991) y Marks y otros, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales pueden incluir además anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. núm. 4,816,567 y Morrison y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Los residuos "estructurales" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en la presente memoria.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana.

El anticuerpo humanizado comprenderá, además, opcionalmente, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver Jones y otros, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

En algunas modalidades, un anticuerpo que se separa o purifica mediante el uso de un polímero sensible a estímulos de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos terapéuticos ilustrativos incluyen, por ejemplo, trastuzumab (HERCEPTIN[™], Genentech, Inc., Carter y otros, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:

4285-4289; Patente de EE.UU. núm. 5,725,856); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico "C2B8" Patente de EE.UU. núm. 5,736,137; anti-IgE (Presta y otros, (1993) J. Immunol. 151:2623-2632; documento núm. WO 95/19181); anti-CD18 (patente de EE.UU. núm. 5.622.700; documento núm. WO 97/26912); anti-IgE, que incluye E25, E26 y E27 (patente de EE.UU. núm. 5,714,338; patente de EE.UU. núm. 5,091,313; documento núm. WO 93/04173; patente de EE.UU. núm. 5,714,338); anticuerpo anti-receptor de Apo-2 (documento núm. WO 98/51793); anticuerpos anti-TNF-alfa que incluyen cA2 (REMICADE™), CDP571 y MAK-195 (patente de EE.UU. núm. 5.672.347; Lorenz y otros, (1996) J. Immunol. 156 (4): 1646-1653; Dhainaut y otros, (1995) Crit. Care Med. 23 (9): 1461-1469); Factor anti-tejido (TF) (EP 0 420 937 B1); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy y otros, (1996) Arthritis Rheum 39 (1): 52-56); anticuerpos anti-receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc gamma RI, como en Graziano y otros, (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002; anticuerpos anti-GpIIb/IIIa; anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS™); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR™; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos antihepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR™; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo anti-idiotípico BEC2 epítopo GD3; anticuerpo anti-alfa v beta3 VITAXIN™; anticuerpo de carcinoma de células renales antihumano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-humano 17-1A (3622W94); y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

Los términos "aislar", "purificar" y "separar" se usan indistintamente en la presente memoria, en el contexto de purificar una molécula objetivo (por ejemplo, un polipéptido o proteína de interés) de una composición o muestra que comprende la molécula objetivo y una o más impurezas, mediante el uso de un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria. En algunas modalidades, el grado de pureza de la molécula objetivo en una muestra aumenta al eliminar (total o parcialmente) una o más impurezas de la muestra mediante el uso de un polímero sensible a estímulos, como se describe en la presente memoria. En otra modalidad, el grado de pureza de la molécula objetivo en una muestra se incrementa precipitando la molécula objetivo de una o más impurezas en la muestra.

En algunas modalidades, un proceso de purificación emplea adicionalmente una o más "etapas de cromatografía". Típicamente, estas etapas pueden llevarse a cabo, si es necesario, después de la separación de una molécula diana a partir de una o más entidades indeseadas mediante el uso de un polímero sensible a estímulos de acuerdo con la presente invención.

En algunas modalidades, una "etapa de purificación" para aislar, separar o purificar un polipéptido o proteína de interés mediante el uso de un polímero sensible a estímulos descrito en la presente descripción, puede ser parte de un proceso de purificación global que da como resultado una composición o muestra "homogénea" o "pura", cuyo término se usa en la presente descripción para referirse a una composición o muestra que comprende menos de 100 ppm de HCP en una composición que comprende la proteína de interés, alternativamente menos de 90 ppm, menos de 80 ppm, menos de 70 ppm, menos de 60 ppm, menos de 50 ppm, menos de 40 ppm, menos de 30 ppm, menos de 20 ppm, menos de 10 ppm, menos de 5 ppm o menos de 3 ppm de HCP. Como se usa en la presente descripción, la "clarificación primaria" incluye la eliminación de la biomasa celular agregada, incluidos los restos celulares floculados y las partículas coloidales con un tamaño mayor de aproximadamente 10 micras (µm) o partículas más pequeñas con el uso de un agente floculante.

Los términos "clarificar", "clarificación", "etapa de clarificación", como se usan en la presente descripción, generalmente se refiere a una o más etapas que se usan inicialmente en la purificación de biomoléculas. La etapa de clarificación generalmente comprende la eliminación de células y/o restos celulares mediante el uso de una o más etapas que incluyen cualquiera de las siguientes, solas o varias combinaciones de las mismas, por ejemplo, clarificación de filtración en profundidad, precipitación, floculación y sedimentación. En algunas modalidades, la presente invención proporciona una mejora sobre la etapa de clarificación convencional comúnmente usada en diversos esquemas de purificación. Las etapas de clarificación generalmente implican la eliminación de una o más entidades indeseables, y se realiza típicamente antes de una etapa que implica la captura de la molécula diana deseada. Otro aspecto clave de la clarificación es la eliminación de componentes solubles e insolubles en una muestra que más tarde puede provocar el ensuciamiento de un filtro estéril en un proceso de purificación, lo que hace que el proceso de purificación general sea más económico. Además, pueden usarse métodos para mejorar la eficiencia de la clarificación, por ejemplo, la precipitación. La precipitación de impurezas puede realizarse por diversos medios, tales como la floculación, el ajuste del pH (precipitación ácida), los cambios de temperatura, el cambio de fase debido a polímeros o moléculas pequeñas sensibles a estímulos, o cualquier combinación de estos métodos.

El término "cromatografía", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de técnica que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula objetivo) de otras moléculas presentes en una mezcla. Por lo general, el analito de interés se separa de otras moléculas como resultado de las diferencias en las velocidades a las que las moléculas individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de unión y elución.

Los términos "resina de cromatografía" o "medios de cromatografía" se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a cualquier tipo de fase (por ejemplo, una fase sólida) que separa un analito de interés (por ejemplo, una molécula objetivo) de otras moléculas presentes en una mezcla. Por lo general, el analito de interés se separa de otras moléculas como resultado de las diferencias en las velocidades a las que las moléculas individuales de la mezcla

migran a través de una fase sólida estacionaria bajo la influencia de una fase móvil, o en procesos de unión y elución. Los ejemplos de diversos tipos de medios de cromatografía incluyen, por ejemplo, resinas de intercambio catiónico, resinas de afinidad, resinas de intercambio aniónico, membranas de intercambio aniónico, resinas de interacción hidrófoba y monolitos de intercambio iónico.

El término "etapa de captura", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a un método usado para unir una molécula objetivo con un polímero sensible a estímulos o una resina de cromatografía, que da como resultado una fase sólida que contiene un precipitado de la molécula objetivo y el polímero o resina. Típicamente, la molécula diana se recupera posteriormente mediante el uso de una etapa de elución, que elimina la molécula diana de la fase sólida, lo que da como resultado la separación de la molécula diana de una o más impurezas. En diversas modalidades, la etapa de captura puede realizarse mediante el uso de un medio de cromatografía, tal como una resina, membrana o monolito, o un polímero, tal como un polímero sensible a estímulo, polielectrolito o polímero que se une a la molécula objetivo.

El término "sal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base. Las diversas sales que pueden usarse en los diversos tampones empleados en los métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, acetato (por ejemplo, acetato de sodio), citrato (por ejemplo, citrato de sodio), cloruro (por ejemplo, cloruro de sodio), sulfato (por ejemplo, sulfato de sodio) o una sal de potasio.

El término "disolvente", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere a una sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más sustancias para proporcionar una disolución. Los disolventes incluyen disolventes acuosos y orgánicos, donde los disolventes orgánicos útiles incluyen un disolvente apolar, etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo, hexilenglicol, propilenglicol y 2,2-tiodiglicol.

El término "partes por millón" o "ppm", como se usa indistintamente en la presente memoria, se refiere a una medida de pureza de una molécula diana deseada (por ejemplo, una proteína o anticuerpo objetivo) purificada mediante el uso de un polímero sensible a estímulos descrito en la presente memoria. En consecuencia, esta medida puede usarse para calibrar la cantidad de una molécula diana presente después del proceso de purificación o para calibrar la cantidad de una entidad indeseada. En algunas modalidades, las unidades "ppm" se usan en la presente descripción para referirse a la cantidad de impureza en una disolución, por ejemplo, HCP o CHOP, en nanogramos/mililitro de proteína de interés en miligramos/mililitro (es decir, CHOP ppm = (CHOP ng/ml)/(proteína de interés mg/ml)). Cuando las proteínas se secan (por ejemplo, mediante liofilización), ppm se refiere a (CHOP ng)/(proteína de interés mg)).

El término "pI" o "punto isoeléctrico" de un polipéptido, como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere al pH al cual la carga positiva del polipéptido equilibra su carga negativa. El pI puede calcularse a partir de la carga neta de los residuos de aminoácidos o residuos de ácido siálico de los carbohidratos unidos del polipéptido, o puede determinarse mediante enfoque isoeléctrico.

Los términos "modo de unión y elución" y "proceso de unión y elución", como se usan en la presente descripción, se refieren a una técnica de separación en la cual al menos una molécula diana contenida en una muestra (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc) se une a una resina adecuada o medios (por ejemplo, un medio de cromatografía de afinidad o un medio de cromatografía de intercambio catiónico) y posteriormente se eluye.

Los términos "proceso de flujo continuo", "modo de flujo continuo" y "operación de flujo continuo", tal como se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a una técnica de separación en la cual al menos una molécula diana (por ejemplo, una proteína que contiene una región Fc o un anticuerpo) contenido en una preparación biofarmacéutica junto con una o más impurezas está destinado a fluir a través de un material, que generalmente se une a la una o más impurezas, donde la molécula diana generalmente no se une (es decir, fluye a través).

El término "etapa del proceso" u "operación unitaria", como se usa indistintamente en la presente descripción, se refiere al uso de uno o más métodos o dispositivos para lograr un cierto resultado en un proceso de purificación. Los ejemplos de etapas de proceso u operaciones unitarias que pueden emplearse en los procesos y sistemas descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, clarificación, cromatografía de unión y elución, inactivación de virus, purificación de flujo continuo y formulación. Se entiende que cada uno de las etapas del proceso u operaciones unitarias puede emplear más de un etapa o método o dispositivo para lograr el resultado deseado de esa etapa del proceso u operación unitaria. Por ejemplo, en algunas modalidades, la etapa de clarificación y/o la etapa de purificación de flujo continuo, como se describe en la presente descripción, puede emplear más de un etapa o método o dispositivo para lograr esa etapa del proceso u operación unitaria. En algunas modalidades, uno o más dispositivos que se usan para realizar un etapa del proceso u operación unitaria son dispositivos de un solo uso y pueden eliminarse y/o reemplazarse sin tener que reemplazar ningún otro dispositivo en el proceso o incluso tener que detener la ejecución de un proceso.

Como se usa en la presente descripción, el término "tamaño de poro" y "tamaño nominal de poro" se refiere al tamaño de poro que retiene la mayoría de las partículas al 60-98 % del tamaño de nominal poro.

Como se usa en la presente descripción, el término "rendimiento" significa el volumen filtrado a través de un filtro.

Como se usa en la presente descripción, el término "sistema" generalmente se refiere a la forma física de todo el proceso de purificación, que incluye dos o más etapas de proceso u operaciones unitarias, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el sistema está encerrado en un entorno estéril.

En la presente invención, el uso de capas graduadas abiertas permite que las partículas más grandes penetren y se capturen dentro de la profundidad de los filtros, en lugar de acumularse en la superficie (consulte los Ejemplos 2A y 2B).

La ventaja es un mayor rendimiento y la retención de sólidos grandes (0,5 micras hasta aproximadamente 200 micras) mientras se elimina el problema de la formación de torta. El uso de poros abiertos en los filtros de clarificación primaria proporciona estos filtros de profundidad con el aumento lineal de la presión con la retención de sólidos sin un aumento significativo de la presión y, por lo tanto, resulta en altos rendimientos. La dimensión estructural del filtro en combinación con la optimización de capas (tamaños de poro y grosor) proporciona propiedades de filtración excepcionales que pueden retener una gran cantidad de sólidos.

En la presente invención, el uso de capas graduadas abiertas permite que las partículas floculadas más grandes en la corriente de alimentación penetren en la profundidad del filtro y se capturen dentro de los poros del filtro en lugar de acumularse en la superficie (consulte los Ejemplos 9 (AE) y 11 (AJ)). El filtro de profundidad de clarificación primaria proporcionado en la presente descripción está dispuesto de tal manera que las capas superiores "abiertas" constituyen la zona de prefiltración de los filtros de profundidad con el fin de capturar partículas floculadas más grandes, mientras que las capas inferiores constituyen la zona de pulido que captura las partículas floculadas agregadas residuales más pequeñas. Una ventaja con el filtro de profundidad de clarificación primaria que tiene este tipo de disposición es un mayor rendimiento y la retención de sólidos floculados más grandes, al tiempo que elimina el problema de la formación de torta. El uso de tales poros abiertos en el filtro de clarificación primaria enseñado en la presente descripción proporciona un aumento lineal de la presión con la retención de sólidos, sin un aumento significativo de la presión, y por lo tanto da como resultado rendimientos más altos y más deseables.

En las Figuras 1A, 1B, 1D, 1E y 1F se representan ejemplos de filtros de profundidad de clarificación primaria según la invención.

La Figura 1C representa filtros de profundidad de clarificación primaria que tienen al menos siete capas, y se usan cuando los alimentos de cultivo celular se tratan con un floculante polimérico (por ejemplo, polímero inteligente o floculante tradicional).

Las Figuras 1A y 1E representan filtros de profundidad de clarificación primaria que tienen al menos ocho capas, y cada uno se usa cuando los alimentos de cultivo celular se tratan con un floculante polimérico (por ejemplo, polímero inteligente o floculante tradicional).

Las Figuras 1B, 1D y 1F representan filtros de profundidad de clarificación primaria que tienen al menos ocho capas, y cada uno se usa cuando los alimentos de cultivo celular se tratan químicamente (por ejemplo, tratamiento con ácido).

El filtro de profundidad de clarificación primaria representado en la Figura 1A muestra un filtro de profundidad de clarificación primaria usado cuando los alimentos de cultivo celular se tratan con un floculante polimérico (por ejemplo, polímero inteligente) que tiene dos capas (superiores) con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 100 micras de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas más con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 50 micras de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas adicionales con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 25 micras de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, seguido de una sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la celulosa (CE25), por ejemplo, y otra sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la tierra de diatomeas (DE40) por ejemplo.

El filtro de profundidad de clarificación primaria representado en la Figura 1B muestra un filtro de profundidad de clarificación primaria usado cuando los alimentos de cultivo celular se tratan químicamente (por ejemplo, tratamiento con ácido) que tienen dos capas (superiores) con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 25 micras de un no tejido tal como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas más con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 10 micras de un no tejido tal como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas adicionales con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 5 micras de un no tejido tal como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, seguido de una sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la celulosa (CE25), por ejemplo, y seguido de otra sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la tierra de diatomeas (DE40) por ejemplo. La capa de celulosa o la de tierra de diatomeas puede seleccionarse como la capa más baja (fondo).

El filtro de profundidad de clarificación primaria representado en la Figura 1C muestra un filtro de profundidad de clarificación primaria usado cuando los alimentos de cultivo celular se tratan con un floculante polimérico (por ejemplo,

polímero inteligente) que tiene dos capas (superiores) con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 100 micras que comprende un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas más con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 100 micras de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas adicionales con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 100 micras que comprende un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, seguido de una sola capa (fondo) de aproximadamente 8 micras de espesor de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,2 cm de espesor.

El filtro de profundidad de clarificación primaria representado en la Figura 1D muestra un filtro de profundidad de clarificación primaria usado cuando los alimentos de cultivo celular se tratan químicamente (por ejemplo, tratamiento con ácido), que tienen dos capas (superiores) con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 50 micras que comprende un no tejido tal como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas adicionales con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 25 micras de un no tejido, como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas más con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 10 micras de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, seguido de una sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la celulosa (CE25), por ejemplo, y seguido de otra sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la tierra de diatomeas (DE40) por ejemplo. La capa de celulosa o la de tierra de diatomeas puede seleccionarse como la capa más baja (fondo).

El filtro de profundidad de clarificación primaria representado en la Figura 1E muestra un filtro de profundidad de clarificación primaria usado cuando los alimentos de cultivo celular se tratan con un floculante polimérico (por ejemplo, polímero inteligente) que tiene dos capas (superiores) con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 100 micras que comprende un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas más con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 50 micras de un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas adicionales con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 25 micras que comprende un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, seguido de una capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la celulosa (CE25), por ejemplo, y seguido de otra sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la tierra de diatomeas (DE40) por ejemplo.

El filtro de profundidad de clarificación primaria representado en la Figura 1F muestra un filtro de profundidad de clarificación primaria usado cuando los alimentos de cultivo celular se tratan químicamente (por ejemplo, tratamiento con ácido) que tiene dos capas (superiores) con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 35 micras, que comprende un material no tejido tal como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas más con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 15 micras de un material no tejido, como polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, que tiene dos capas adicionales con un tamaño nominal de poro de aproximadamente 10 micras que comprende un no tejido como el polipropileno de aproximadamente 0,4 cm de espesor, seguido de una sola capa de aproximadamente 0,35 cm de espesor de un material como la celulosa (CE25), por ejemplo, y seguido de otra sola capa de 0,35 cm de espesor de un material como la tierra de diatomeas (DE40) por ejemplo. La capa de celulosa o la de tierra de diatomeas puede seleccionarse como la capa más baja (fondo).

La dimensión estructural del filtro de profundidad de clarificación primaria proporcionado en la presente descripción en combinación con la optimización de los tamaños de poro y/o el grosor de la capa del filtro de profundidad de clarificación primaria da como resultado propiedades de filtración altamente ventajosas que además retienen altas cantidades de sólidos. Dado que los filtros de profundidad logran la filtración a través de la profundidad de los medios a través de una combinación de varios mecanismos, el volumen de la columna de alimentación (V_i) versus el volumen de la columna de medios (V_m) muestra la efectividad de los diferentes filtros.

Además, varios alimentos tienen diferentes cantidades de sólidos que dan como resultado un rendimiento altamente variable de los filtros de profundidad, por lo tanto, el valor (V_i) versus (V_m) proporciona una mejor estimación de la "eficiencia" real de los filtros.

Otro parámetro importante, K, se usa para describir la eficiencia del filtro mientras se normaliza para el contenido sólido de la materia prima de alimento. El parámetro K permite la filtración de alimentos con diferentes contenidos de sólidos para compararlos de manera efectiva.

El parámetro K en realidad es función de tres parámetros medibles, rendimiento de volumen (TP), eficiencia de recolección (η) y concentración inicial de sólidos (C_i) como se muestra en la Ecuación 1.

$$K = [TP] \times [\eta] \times [C_i] \times 100$$

(1)

Donde el rendimiento de volumen (TP) está dado por el volumen de alimento filtrado (V_f) dividido por el volumen de medios (V_m), la eficiencia de recolección (η) está dada por el volumen de sólidos capturados (V_{sc}) dividido por el volumen de sólidos en el alimento (V_s), y la concentración inicial de sólidos (C_i) está dada por el volumen de sólidos en el alimento (V_s) dividido por el volumen de alimento filtrado (V_f) como se indica en la Ecuación 2.

$$K = \left[\frac{V_f}{V_m} \right] \times \left[\frac{V_{sc}}{V_s} \right] \times \left[\frac{V_s}{V_f} \right] \times 100$$

(2)

Los siguientes ejemplos demostrarán la utilidad de las ecuaciones (1) y (2) y el parámetro K para determinar y comparar la eficiencia de los filtros de profundidad de partículas cuando se usan con materias primas de alimento específicas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo hacer las composiciones de la invención y cómo practicar los métodos de la invención y no pretenden limitar el alcance de lo que el inventor considera como su invento. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique de otra manera, la temperatura está en grados C, las reacciones químicas se realizaron a presión atmosférica o presión transmembrana, como se indica, el término "temperatura ambiente" se refiere a aproximadamente 25 °C y "presión ambiental" se refiere a presión atmosférica.

Ejemplos comparativos

La sedimentación a menudo falla debido al largo tiempo de sedimentación (horas). La eliminación de un gran volumen de masa de flóculo celular no consolidado provoca un bajo rendimiento de mAb, ya que una fracción significativa del mAb queda atrapada en la masa celular. (Consulte el Ejemplo 5)

La filtración de la torta falla porque la masa celular se descompone bajo presión. En otras palabras, los desechos celulares se separan del polímero bajo tensión y fluyen como una alta turbidez en el filtrado (consulte el Ejemplo 6).

La filtración en profundidad falla porque los flóculos, particularmente los de los sistemas de polímeros, son bastante grandes, del orden de 100 micras. En lugar de penetrar en los medios, lo cual es necesario para la filtración en profundidad, los flóculos grandes pronto se apilan sobre la superficie del medio del filtro de profundidad, lo que reduce el medio del filtro de profundidad a un filtro de torta ineficiente. (Consulte el Ejemplo 7)

La filtración dinámica, como la filtración tangencial o los medios filtrantes vibrados, se han probado con poco éxito porque el esfuerzo de corte necesario para reducir la formación de torta divide los flóculos en partículas individuales, anulando los beneficios de la floculación. (consulte el Ejemplo 8)

La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que pretenden ser ilustrativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Preparación de un fluido de cultivo celular (CCF) sin expresión y sin clarificar

En un experimento representativo, se cultivaron células de expresión derivadas de una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) en un biorreactor de 10 L (New Brunswick Scientific) hasta una densidad de 10×10^6 células/mL, y se cosecharon a un 80 % de viabilidad. Se determinó que el título de anticuerpo monoclonal (mAb) era de 0,8 g/L. Se descubrió que el nivel de proteínas de la célula huésped (HCP) fue de 200 000 ng/mL mediante el uso de un ensayo ELISA (Cygnus Technologies, Southport, NC, # 3G ELISA). El pH del cultivo celular sin clarificar fue 6,9.

Ejemplo 2.

Preparación de polímero sensible al estímulo iónico multivalente.

Se colocaron 10 g de polialilamina (PAA) (Nittobo Medical Co., Ltd., Tokyo, Japan, 150 kD; 40 % peso/peso) en un matraz de fondo redondo de 100 mL y se añadió una disolución de 3,34 g de hidróxido de sodio (1,2 Eq. por monómero) en 25 ml de H₂O a temperatura ambiente con agitación magnética en pequeñas cantidades. Después se añadió cloruro de bencilo (2,30 g, 2,09 mL), se agitó durante unos minutos a temperatura ambiente y luego se calentó hasta 60 °C

durante toda la noche durante 17 horas. La reacción se enfrió luego hasta temperatura ambiente y se eliminó el disolvente, lo que dio como resultado la precipitación del polímero. El polímero precipitado se lavó con agua y se agitó en una disolución acuosa de AcOH 1 M (40 ml) hasta que se logró la solubilización completa. La disolución se diluye luego con H₂O hasta un volumen final de 400 mL (disolución de polímero al 1 %), se añade fosfato potásico dibásico (K₂HPO₄) (3,48 g) con agitación y el pH de la disolución se ajusta a pH 6,8 para precipitar el polímero modificado. El polímero se recoge mediante filtración en un embudo de frita y finalmente se seca durante toda la noche en un horno de vacío a 50 hasta 60 °C. El polímero se redisolvió luego en ácido acético 1 M para generar una solución concentrada de polímero al 10 % en peso.

Ejemplo 3.

Tratamiento de polímero inteligente (SmP) al alimento CHO-S.

Con el fin de flocular el cultivo celular con SmP, se añadió una muestra de 500 mL de caldo de cultivo celular del Ejemplo 1 a una botella de medio de 1000 ml. Mientras se agita, una muestra de concentrado de polímero del Ejemplo 2 a la dosis de polímero deseada (% en peso), típicamente 0,2 %. La solución se dejó mezclar durante 15 minutos.

Ejemplo 4.

Tratamiento ácido de alimento CHO-S.

Con el fin de flocular el cultivo celular con la adición de ácido para reducir el pH, se añadió una muestra de 500 mL de caldo de cultivo celular del Ejemplo 1 a una botella de medio de 1000 mL. Mientras se agitaba, se añadió ácido acético concentrado gota a gota hasta que se alcanzó el pH deseado. El pH objetivo era pH 4,8-5,0 a menos que se indique de otra manera. La solución se dejó mezclar durante 15 minutos.

Ejemplo 5.

Estudios de sedimentación para el alimento CHO-S tratado con polímero inteligente (SmP).

Los experimentos de sedimentación se realizaron a diferentes tiempos de sedimentación para determinar la efectividad del uso de diferencias de densidad para realizar la separación sólido líquido de los alimentos tratados con SmP. Se prepararon 500 mL de caldo de cultivo celular de acuerdo con el Ejemplo 3.

El alimento tratado con SmP se dejó sedimentar durante aproximadamente 0,5 a 6 horas, y se tomaron muestras del sobrenadante y se midió la turbidez y el volumen de sólidos. La turbidez se midió mediante el uso de un turbidímetro HACH Modelo # 2100P. **La Tabla 1** muestra los estudios de sedimentación del alimento CHO-S tratado con SmP durante tiempos que varían de 0,5 a 6 horas.

Se observó que el tiempo de sedimentación era > aproximadamente 180 minutos para alcanzar la turbidez de equilibrio de < aproximadamente 20 NTU para el alimento CHO-S tratado con SmP, y aproximadamente 120 minutos para alcanzar la turbidez de equilibrio de <aproximadamente 20 NTU para el alimento CHO-DH44 tratado con SmP.

Cuando se usó la dosis de polímero más pequeña (0,05 %), la floculación incompleta condujo a un aumento de la turbidez (> aproximadamente 350 NTU) incluso después de 12 horas de tiempo de sedimentación para el alimento CHO-S tratado con SmP. Además, los tiempos de sedimentación de 3 horas tienen un gran volumen de masa celular no consolidada (aproximadamente 30 % hasta 40 %) para el alimento CHO-S tratado con SmP y 20 % para el alimento CHO-DH44 tratado con SmP que aparentemente podría dar como resultado una baja producción de mAb (aproximadamente 60 % hasta 80 %) ya que una cantidad significativa de mAb queda atrapada en la masa no consolidada.

Tabla 1: Estudios de sedimentación para el pienso CHO-S tratado con polímero inteligente.

Tiempo (min)	Turbidez (0,05 %) (NTU)	Turbidez (0,2 %) (NTU)	Turbidez (0,4 %) (NTU)	Turbidez (0,6 %) (NTU)
0	451	549	601	666
60	128	26	81	112
120	101	16	54	90
180	98	10	38	68

Ejemplo 6.

Filtración de tortas para los alimentos DG44 y CHO-S tratados con polímero inteligente (SmP)

Se usó medio de tierra de diatomeas (DE) para determinar la efectividad de la filtración de la torta. Primero, se empaquetó el DE a una profundidad de al menos aproximadamente 4 cm en el embudo Buchner, después de lo cual pasamos el alimento tratado con SmP del Ejemplo 3 con aplicación de vacío a través de él. Durante la filtración a

través de los medios de tierra de diatomeas, las células CHO-S formaron una película de torta de filtro en el tamiz de 20 μm . Se observó que la torta del filtro impedía el flujo de filtrado hacia el exterior, lo que daba como resultado un rendimiento <aproximadamente 10 L/m². Además, se observó que la masa celular se separó del polímero bajo tensión, lo cual dio como resultado un filtrado altamente turbio (aproximadamente 200 NTU hasta 300 NTU) que puede afectar significativamente las operaciones de filtración secundaria.

Ejemplo 7.

Filtración en profundidad para los alimentos CHO-S tratadas con polímero inteligente (SmP) mediante el uso de filtros de clarificación primaria disponibles comercialmente (DOHC y FOHC).

Los experimentos de filtración se realizaron con alimento CHO-S tratado con polímero inteligente (SmP) del Ejemplo 3 y alimento tratado con ácido del Ejemplo 4 para determinar el rendimiento de los filtros de profundidad MilliStak® DOHC disponibles comercialmente. Los filtros DOHC se enjuagaron con agua de acuerdo con las instrucciones del usuario. El alimento se aplicó a los filtros de profundidad mediante el uso de una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de aproximadamente 100 L/m²/h. Sin embargo, los filtros de profundidad no fueron capaces de manejar corrientes de alimento con alto contenido de sólidos. Se cree que la filtración en profundidad falló principalmente porque las células agregadas eran más grandes y en lugar de penetrar en los medios, lo cual es necesario para la filtración en profundidad, se acumulan partículas más grandes en la parte superior de la superficie del medio del filtro de profundidad, lo que reduce los medios del filtro de profundidad a un filtro de torta ineficiente. DOHC tuvo un rendimiento de aproximadamente 20 L/m² para los alimentos tratados con SmP y FOHC tuvo un rendimiento de aproximadamente 5 L/m² para los alimentos tratados con ácido. La formación de la torta del filtro a partir de las partículas más grandes del flóculo se debe en gran medida a lo apretado del filtro que redujo significativamente el rendimiento de los filtros.

Ejemplo 8.

Filtración dinámica para el alimento tratado con polímero inteligente (SmP).

Se realizaron experimentos de filtración dinámica mediante el uso de dispositivos de filtración Pellicon® 3 de flujo tangencial (0,11 m²) (disponibles de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.) para determinar la efectividad de la separación de sólidos y líquidos de los alimentos tratados con SmP. Los dispositivos de filtración contenían membranas de microfiltración (0,45 μm) construidas de una membrana de polivinildifluoruro (PVDF). La cosecha del cultivo celular tratado con SmP se cargó a 50 L/m²/h hasta que la TMP alcanzó 15 psi. Se observó un taponamiento instantáneo de los dispositivos Pellicon® 3, lo que resultó en un rendimiento <5 L/m². Se observó un rendimiento deficiente debido a la pérdida de material creada por el taponamiento rápido y el volumen de retención del sistema y dispositivo.

Ejemplo 9A.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y grandes.

Se ensambló un dispositivo de filtración en profundidad 10 mediante el uso de siete (7) capas de fibras no tejidas (polipropileno) que tenían un espesor total de todas las capas de 1,6 cm. Las capas se disponen en el dispositivo de filtración en profundidad desde el tamaño nominal de poro más abierto de 200 μm (2 capas) seguido de nominales de 50 μm (2 capas), nominales de 40 μm (2 capas) a una sola capa nominal de 8 μm (ver **Figura 1**).

Las propiedades individuales de las siete (7) capas de fibras no tejidas (fieltro de aguja) (Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI) se muestran en la **Tabla 3** (2 capas $\times$ 200 μm , 2 capas $\times$ 50 μm , 2 capas $\times$ 40 μm y 1 capa $\times$ 8 μm). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo de filtración en profundidad se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,45 L/min a 4 psi.

Tabla 3: Caracterización de las propiedades físicas del material de fieltro no tejido de Rosedale Products, Inc. and Midwest Filtration Company

Proveedor	Capa	Poro Nom. (μm)	Poro Prom. (μm)	Peso base (g/m ²)	Velocidad del flujo de agua (galones/min)
Rosedale	Punzón de aguja	200	100	425	555
Rosedale	Punzón de aguja	100	85	380	529
Rosedale	Punzón de aguja	50	70	309	524
Rosedale	Punzón de aguja	40	70	347	514
Rosedale	Punzón de aguja	30	60	320	523
Rosedale	Punzón de aguja	25	50	266	492

Continuación

	Proveedor	Capa	Poros Nom. (μm)	Poros Prom. (μm)	Peso base (g/m^2)	Velocidad del flujo de agua (galones/min)
5	Rosedale	Punzón de aguja	20	40	413	330
	Rosedale	Punzón de aguja	10	35	396	360
	Rosedale	Fundido soplado	8	8	288	264
10	Midwest	UniPro 760 PP (Punzón de aguja)	≥ 200	110	260	552
	Midwest	Punzón de aguja	200	80	336	500
	Midwest	Punzón de aguja	100	70	369	497
	Midwest	Punzón de aguja	50	65	335	476
	Midwest	Punzón de aguja	25	50	390	436
15	Midwest	Punzón de aguja	10	35	390	410
	Midwest	Punzón de aguja	5	31	368	400
	Midwest	Punzón de aguja	1	30	486	350
20	Midwest	UniPro 530 MM (Fundido soplado)	≤ 1	15	187	338

Ejemplo 9B.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y grandes.

El filtro de profundidad graduada del Ejemplo 9B consiste en fibras no tejidas graduadas, que tienen una profundidad de 1,6 cm, y son capaces de filtrar una corriente de alimento floculada con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm . El filtro de profundidad graduada consta de siete (7) capas de fibras no tejidas de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI (2 capas $\times$ 200 μm , 2 capas $\times$ 100 μm , 2 capas $\times$ 50 μm y 1 capa $\times$ 8 μm). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,55 L/min a 4 psi.

Ejemplo 9C.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y grandes.

El filtro de profundidad graduada del Ejemplo 9C consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 1,6 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm . El filtro de profundidad graduada consta de siete (7) capas de fibras no tejidas de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI (3 capas $\times$ 200 μm , 3 capas $\times$ 100 μm y 1 capa $\times$ 8 μm). El filtro de profundidad graduada proporcionado en la presente descripción se ensambló en un dispositivo de filtración Mini Cap integral de 23 cm^2 (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.) y se probó la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,55 L/min a 4 psi.

Ejemplo 9D.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y grandes.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 9D consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 1,6 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de 0,5 μm hasta 100 μm . El filtro de profundidad graduado consta de siete (7) capas de fibras no tejidas de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI (2 capas $\times$ 100 μm , 2 capas $\times$ 50 μm , 2 capas $\times$ 40 μm y 1 capa $\times$ 8 μm). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,5 L/min a 4 psi.

Ejemplo 9E.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y grandes.

El filtro de profundidad graduada del Ejemplo 9E consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 1,6 cm y es capaz de filtrar una corriente polimérica de alimento floculado que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm . El filtro de profundidad graduada consta de siete (7) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio (2 capas $\times$ UniPro® 760 PP, 2 capas $\times$ 100 μm ,

2 capas $\times$ 50 μm y 1 capa $\times$ UniPro® 530 MM). El alimento del filtro de profundidad graduado consta de siete (7) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio (2 capas $\times$ UniPro® 760 PP, 2 capas $\times$ 100 μm , 2 capas $\times$ 50 μm y 1 capa $\times$ UniPro® 530 MM). El filtro de profundidad graduado proporcionado en la presente descripción se ensambló en un dispositivo de filtración Mini Cap integral de 23 cm^2 (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.) y se probó la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,65 L/min a 4 psi.

Ejemplo 10.

Desempeño de filtración de los filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y grandes

Los dispositivos de filtro de los Ejemplos 9A-9E se probaron para el desempeño de filtración mediante el uso del siguiente método. Los filtros de profundidad se corrieron con alimento no clarificado sin tratar y tratado con SmP después de enjuagar con agua Milli-Q con TMP a través de cada filtro monitoreado por transductores de presión. La cosecha de cultivo celular no aclarado se trató con una dosis de polímero inteligente (SmP) al 0,2 % en peso (% en peso) y se agitó durante 15 minutos. Los filtros de profundidad se enjuagaron primero con $\geq$ aproximadamente 50 L de agua Milli-Q por cada metro cuadrado de área de filtro a 600 L/m²/h para humedecer el medio filtrante y eliminar los extraíbles. Las cosechas no aclaradas sin tratar y tratadas con SmP se cargaron a 100 L/m²/h hasta que TMP a través de cualquier filtro alcanzó 20 psig.

La **Tabla 4** compara el rendimiento del filtro de dos filtros Millistak® (XOHC y DOHC) con el filtro de profundidad de clarificación primaria para la filtración del alimento descrita en el Ejemplo 3. (0,2 % (p/v) de alimento tratado con polímero inteligente (SmP)). XOHC y DOHC dieron un rendimiento de 10 L/m² y 44 L/m² mientras que el rendimiento del filtro de profundidad de clarificación primaria fue de 325 L/m². La turbidez del filtrado en todos los casos fue $<$ aproximadamente 5 NTU como se muestra en la Tabla 4. En términos de volumen de columna de filtrado por volumen de columna de medio, XOHC y DOHC dieron un rendimiento de 1,5 $V_f/V_{m\text{y}}$ y 6 V_f/V_m , mientras que el rendimiento del filtro de profundidad de clarificación primaria fue de 16,5 V_f/V_m (325 L/m²) con una eficiencia K del 84 %. A partir de esta comparación, es evidente que el Ejemplo 9A, un filtro compuesto por capas descritas en la presente reivindicación es capaz de eliminar grandes cantidades de sólidos durante la clarificación de las cosechas de células no aclaradas.

Tabla 4: Comparación del filtro de profundidad de clarificación primaria (PC) descrito en el Ejemplo 9A para el rendimiento de filtración de alimento tratado con SMP con 0,2 % (p/v).

Alimento	Tratamiento	Tipo de filtro	Dosis (%) (p/v)	PCV (%)	Turbidez (NTU)	TP (L/m ²)	TP (V_f/V_m)	K (%)
CHO-S	Sin tratamiento	XOHC	N/A	3,8	5	10	2	8
CHO-S	Sin tratamiento	DOHC	N/A	3,8	45	44	6,5	26
CHO-S	tratado con SMP	XOHC	0,2	4,0	2	8	1,5	8
CHO-S	tratado con SMP	DOHC	0,2	4,0	2	39	6	24
CHO-S	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9A)	0,2	4,0	6	325	16,5	66

La presente invención tiene una ventaja significativa en términos de crecimiento de presión diferencial lineal. En el caso de XOHC y DOHC, la presión del fluido era menor y constante al comienzo, pero de repente aumentó exponencialmente y alcanzó así su límite. Una posible explicación consistente con la respuesta de presión observada es la rápida formación de una capa de torta en la superficie del filtro. En el caso de los filtros de profundidad de clarificación primaria, el aumento de presión es cercano a lineal, sin un aumento significativo abrupto de la presión. Este resultado es consistente con las partículas atrapadas a lo largo de la profundidad del filtro, lo que evita la formación de torta. Además, se observa un gran aumento en el rendimiento volumétrico del filtro, que de nuevo es consistente con la filtración en profundidad en lugar de la filtración de torta observada en los filtros comerciales XOHC y DOHC.

La **Tabla 5** compara el rendimiento del filtro de los filtros de profundidad de clarificación primaria descritos en los Ejemplos 9B-9E en términos del volumen de la columna de alimento versus el volumen de la columna de medios.

El filtro de profundidad graduado descrito en el Ejemplo 9B proporcionó un rendimiento de volumen de 32 V_f/V_m (640 L/m²) con una eficiencia K del 90 % para el alimento CHO-DG44 tratado con SmP y un rendimiento de volumen de 22 V_f/V_m (430 L/m²) con una eficiencia K del 90 % para el alimento CHO-S tratado con SmP.

En otro Ejemplo 9C, el filtro de profundidad graduado dio como resultado un rendimiento de volumen de 33 V_f/V_m (660 L/m²) con una eficiencia K_{man} de 94 % para el alimento CHO-DG44 tratado con SmP y un rendimiento de volumen de 22 V_f/V_m (435 L/m²) con una eficiencia K del 90 % para el alimento CHO-S tratado con SmP.

El filtro de profundidad graduado descrito en el Ejemplo 9D dio como resultado un rendimiento de volumen de 29 V_f/V_m (580 L/m²) con una eficiencia K del 81 % para el alimento CHO-DG44 tratado con SmP y un rendimiento de volumen de 20 V_f/V_m (390 L/m²) con una eficiencia K del 81 % para el alimento de CHO-S tratado con SmP.

En otro Ejemplo 9E más, el filtro de profundidad graduado descrito en la presente reivindicación dio como resultado un rendimiento de volumen de $33 V_f/V_m$ (650 L/m^2) con una eficiencia K del 92 % para el alimento CHO-S tratado con SMP.

A partir de esta comparación, es evidente que el Ejemplo 9A-9E, filtro compuesto por capas descritas en las reivindicaciones, es capaz de eliminar grandes cantidades de sólidos durante la clarificación de las cosechas de células no aclaradas.

Tabla 5: Comparación del filtro de profundidad de clarificación primaria (PC) descrito en el Ejemplo 9B-9E para el rendimiento de filtración de alimento tratado con SMP con 0,2 % (p/v).

Alimento	Tratamiento	Tipo de filtro	Dosis (%) (p/v)	PCV (%)	Turbidez (NTU)	TP (L/m^2)	TP (V_f/V_m)	K (%)
CHO-DG44	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9B)	0,2	2,8	< 5	640	30	90
CHO-S	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9B)	0,2	4,0	< 5	430	22	90
CHO-DG44	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9C)	0,2	2,9	< 5	660	33	94
CHO-S	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9C)	0,2	4,0	< 5	435	22	90
CHO-DG44	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9D)	0,2	2,9	< 5	580	29	81
CHO-S	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9D)	0,2	4,0	< 10	390	20	80
CHO-S	tratado con SMP	PC (Ejemplo 9E)	0,2	3,0	< 5	650	33	92

Ejemplo 11A.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

Los alimentos tratados químicamente (por ejemplo, tratamiento con ácido) tienen la capacidad de aumentar el tamaño promedio de partícula de <aproximadamente $5 \mu\text{m}$ hasta > aproximadamente $20 \mu\text{m}$. Además, los alimentos tratados con ácido proporcionan una amplia distribución del tamaño de partícula. En respuesta a la necesidad de separación de esta amplia gama de partículas, una combinación de capas no tejidas de graduación abierta y más ajustadas (CE y DE) proporciona la filtración en profundidad efectiva. Se ensambló un dispositivo de filtración en profundidad mediante el uso de ocho (8) capas de fibras no tejidas (polipropileno) que tienen un espesor total de todas las capas de 2,0 cm. Las capas se disponen en el dispositivo de filtración 50, **Figura 1**, con un tamaño nominal de poro abierto de $200 \mu\text{m}$ (2 capas), seguido de nominales de $50 \mu\text{m}$ (2 capas), nominales de $40 \mu\text{m}$ (2 capas), seguido de una capa de celulosa (CE25), y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Las propiedades individuales de las seis (6) capas de fibras no tejidas (perforadas con aguja) (Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI) se muestran en la **Tabla 3** ($2 \times 200 \mu\text{m}$, $2 \times 50 \mu\text{m}$, and $2 \times 40 \mu\text{m}$). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de $0,40 \text{ L/min}$ a 4 psi.

Ejemplo 11B.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11B consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 2 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ hasta aproximadamente $100 \mu\text{m}$. El filtro de profundidad graduada consta de seis (6) capas de fibras no tejidas (2 capas $\times 30 \mu\text{m}$, 2 capas $\times 25 \mu\text{m}$, 2 capas $\times 20 \mu\text{m}$) de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI, seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo de filtración se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de $0,15 \text{ L/min}$ a 4 psi.

Ejemplo 11C.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11B consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 2 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El alimento del filtro de profundidad graduado consta de seis (6) capas de fibras no tejidas (2 capas $\times$ 25 μm , 2 capas $\times$ 20 μm , 2 capas $\times$ 10 μm) de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI, seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,15 L/min a 4 psi.

Ejemplo 11D.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11D consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 1,6 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El filtro de profundidad graduado se compone de cuatro (4) capas de fibras no tejidas (2 $\times$ 20 μm , 2 $\times$ 10 μm) de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI y celulosa (CE 25) / tierra de diatomeas (DE 60). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,3 L/min a 4 psi.

Ejemplo 11E.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11E consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 2 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El filtro de profundidad graduada consta de seis (6) capas de fibras no tejidas de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI (2 capas $\times$ 25 μm , 2 capas $\times$ 20 μm , 2 capas $\times$ 10 μm), seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,2 L/min a 4 psi.

Ejemplo 11F.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11F consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 1,6 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El filtro de profundidad graduada consta de cuatro (4) capas de fibras no tejidas de Rosedale Products, Inc., Ann Arbor, MI (2 capas $\times$ 20 μm , 2 capas $\times$ 10 μm), seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,3 L/min a 4 psi.

Ejemplo 11G.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11G consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 1,6 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El filtro de profundidad graduada consta de seis (6) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio (2 capas $\times$ 50 μm , 2 capas $\times$ 25 μm , 2 capas $\times$ 10 μm) seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, resultando en un valor de 0,35 L/min a 4 psi.

Ejemplo 11H.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11H consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 2 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El filtro de profundidad graduado consta de seis (6) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio ($2 \times 25 \mu\text{m}$, $2 \times 10 \mu\text{m}$, $2 \times 5 \mu\text{m}$) seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,4 L/min a 4 psi.

Ejemplo 11I.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 11I consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 2 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 100 μm . El filtro de profundidad graduado comprende seis (6) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio ($2 \times 10 \mu\text{m}$, $2 \times 5 \mu\text{m}$, $2 \times 1 \mu\text{m}$), seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). Después de ensamblar la pila de capas, se agregaron tapas de extremo de lengüeta de manguera de polipropileno en la parte superior e inferior y todo el conjunto se sobremoldeó en un único dispositivo integral de filtración Mini Cap (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA EE. UU.). El dispositivo se probó para determinar la permeabilidad al agua, lo que resultó en un valor de 0,4 L/min a 4 psi.

Ejemplo 12.

Desempeño de la filtración de filtros de profundidad para eliminación de partículas de biomoléculas agregadas y pequeñas.

Los dispositivos de filtro de los Ejemplos 11A-11I se probaron para el desempeño de filtración mediante el uso del siguiente método. La cosecha de cultivo celular no aclarada se trató con ácido acético glacial 1 M para ajustar el pH a 4,8 y se agitó durante 30 minutos. Los filtros de profundidad se hicieron funcionar con alimento no clarificado tratado con ácido y sin tratar después de enjuagar con agua Milli-Q con el TMP a través de cada filtro monitoreado por transductores de presión. Los filtros de profundidad se enjuagaron primero con $\geq$ aproximadamente 50 L de agua Milli-Q por cada metro cuadrado de área de filtro a 600 L/m²/h para humedecer el medio filtrante y eliminar los extraíbles. Las cosechas no tratadas y precipitadas con ácido no clarificadas se cargaron a 100 L/m²/h hasta que el TMP a través de cualquier filtro alcanzó 20 psig.

La **Tabla 6** compara el rendimiento del filtro de dos filtros Millistak® (XOHC y DOHC) con el filtro de profundidad de clarificación primaria para alimento tratado con ácido. XOHC y DOHC dieron un rendimiento de 5 L/m² y 20 L/m² mientras que el rendimiento del filtro de profundidad de clarificación primaria fue de 210 L/m².

Tabla 6: Comparación del filtro de profundidad de clarificación primaria de precipitación ácida (APPC) para el rendimiento de filtración para alimento tratado con ácido (pH = 4,8).

Alimento	Tratamiento	Tipo de filtro	pH	PCV (%)	Turbidez (NTU)	TP (L/m ²)	TP (V _f /V _m)	K (%)
CHO-S	Sin tratamiento	XOHC	6,9	3,8	5	10	2	8
CHO-S	Sin tratamiento	DOHC	6,9	3,8	45	44	6,5	26
CHO-S	Tratado con ácido	XOHC	4,8	3,9	1	5	1,5	6
CHO-S	Tratado con ácido	DOHC	4,8	3,9	3	20	4	16
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11A)	4,8	3,9	25	210	9	36

La **Tabla 2** compara el rendimiento del filtro de dos filtros Millistak® (XOHC y DOHC) con un filtro de profundidad de clarificación primaria precipitado con ácido para alimento tratado con ácido en términos del volumen de la columna de alimento frente al volumen de la columna de medio. XOHC y DOHC dieron un rendimiento de 1,5 V_f/V_m (K = 6) y 4 V_f/V_m (K = 16) mientras que el rendimiento del filtro de profundidad de clarificación primaria fue de 9 V_f/CV_m (K = 36). A partir de esta comparación, es evidente que el Ejemplo 9A, un filtro compuesto por capas descritas en la presente reivindicación es capaz de eliminar grandes cantidades de sólidos durante la clarificación de las cosechas de células no aclaradas.

Tabla 2: Estudios de sedimentación para el alimento CHO-DG44 tratado con polímero inteligente.

Tiempo (min)	Turbidez (0,05 %) (NTU)	Turbidez (0,2 %) (NTU)	Turbidez (0,4 %) (NTU)	Turbidez (0,6 %) (NTU)
0	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
60	365	33	50	84
120	344	26	31	68
360	325	17	21	49

La **Tabla 7** compara el rendimiento del filtro de los filtros de profundidad de clarificación primaria descritos en los Ejemplos 11B-11I en términos del volumen de la columna de alimento versus el volumen de la columna de medios. A partir de esta comparación, es evidente que en los Ejemplos 11A-11I, los filtros compuestos de capas como se proporcionan en la presente descripción son capaces de eliminar grandes cantidades de sólidos durante la clarificación de las cosechas de células no clarificadas.

Tabla 7: Comparación del filtro de profundidad de clarificación primaria de precipitación ácida (APPC) para el rendimiento de filtración para alimento tratado con ácido (pH = 4,8).

Alimento	Tratamiento	Tipo de filtro	pH	PCV (%)	Turbidez (NTU)	TP (L/m ²)	TP (V _f /V _m)	K (%)
CHO-DG44	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11B)	4,8	2,8	< 10	554	27	77
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11B)	4,8	4,0	< 10	347	18	72
CHO-DG44	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11C)	4,8	2,8	< 10	660	30	84
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11C)	4,8	4,0	< 10	391	20	80
CHO-DG44	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11D)	4,8	2,8	< 10	580	29	81
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11E)	4,8	4,0	< 10	425	22	87
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11F)	4,8	4,0	< 10	395	20	81
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11G)	4,8	12,0	< 10	122	6,1	73
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11H)	4,8	12,0	< 10	132	6,9	82
CHO-S	Tratado con ácido	APPC (Ejemplo 11I)	4,8	12,0	< 10	140	7,2	86

Ejemplo 13.

Filtros de profundidad para la eliminación de partículas coloidales agregadas y pequeñas en el intervalo de 0,1 µm a 200 µm.

El filtro de profundidad graduado del Ejemplo 13 consiste en fibras no tejidas graduadas, tiene una profundidad de 2 cm y es capaz de filtrar una corriente de alimento floculado con ácido que comprende partículas en el intervalo de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 200 µm. El filtro de profundidad graduado consta de seis (6) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio (2 capas × 25 µm, 2 capas × 10 µm, 2 capas × 5 µm) seguido de celulosa comercialmente disponible (CE 25)/tierra de diatomeas (DE 40) e IM75. El filtro de profundidad graduado proporcionado en la presente descripción se ensambló en un dispositivo de filtración Mini Cap integral de 23 cm² (disponible de Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.) y se probó la permeabilidad al agua, lo que resultó un valor de 0,25 L/min a 4 psi. A continuación, la cosecha no clarificada precipitada con ácido se cargó a 100 L/m²/h hasta que el TMP a través de cualquier filtro alcanzó 20 psig. El desempeño de filtración se comparó con el filtro graduado de control que consta de seis (6) capas de fibras no tejidas de Midwest Filtration Company, Cincinnati, Ohio (2 capas × 25 µm, 2 capas × 10 µm, 2 capas × 5 µm) seguido de una capa de celulosa (CE25) y una capa de tierra de diatomeas (DE40). El filtro descrito en este ejemplo dio como resultado un rendimiento de 11 V_f/V_m (K = 66) mientras que el rendimiento del filtro de profundidad graduado de control fue de 12 V_f/CV_m (K = 72). Sin embargo, el filtro de profundidad graduado descrito en el ejemplo resultó en una turbidez de 1 NTU en comparación con 4 NTU para el filtro graduado de control. A partir de esta comparación, es evidente que el filtro del Ejemplo 13 compuesto por capas como se proporciona en la presente descripción es capaz de eliminar partículas coloidales más pequeñas además de las células y los desechos celulares durante la clarificación, lo que puede potencialmente conducir a la eliminación de filtros de clarificación secundarios en el proceso.

Otro beneficio importante para el cliente es la mejora de la economía de clarificación de materia prima de alimento de alto contenido de sólidos. Como se señaló anteriormente, en el proceso de clarificación, las aplicaciones para muchas materias primas de alimento con alto contenido de sólidos se usan centrífugas y/o microfiltración de flujo tangencial como la etapa de clarificación primaria aguas arriba de la clarificación secundaria que típicamente incluye un filtro de profundidad. Al incorporar el filtro de profundidad en el proceso de clarificación primaria de la manera descrita en la presente descripción, se elimina el uso anterior (etapa de clarificación aguas arriba) y posterior (etapa de clarificación aguas abajo) de una etapa de centrifugación y/o una etapa de microfiltración de flujo tangencial. Además, se anticiparía

menos tiempo de inactividad en la limpieza, verificación y reemplazo de la(s) centrífuga(s) y/o membranas de microfiltración de flujo tangencial.

Ejemplo 14.

Dispositivo y sistema de filtración en profundidad de clarificación para purificar una molécula diana.

La Figura 5 es una representación esquemática de un proceso ilustrativo de purificación de un dispositivo de filtración en profundidad de clarificación incorporado en un sistema para purificar una molécula diana, en donde el sistema incluye dos o más operaciones unitarias conectadas en comunicación fluida entre sí, con el fin de realizar un proceso de purificación de una molécula diana de manera continua o semicontinua. Cada operación unitaria puede emplear uno o más dispositivos para lograr el propósito previsto de esa operación unitaria. En consecuencia, en algunas modalidades, los sistemas descritos en la presente descripción incluyen varios dispositivos que están conectados para permitir que el proceso de purificación se ejecute de manera continua o semicontinua.

Sin desear limitarse a la teoría, se contempla que un sistema puede encerrarse en un entorno estéril cerrado, para desempeñar todo el proceso de purificación de una manera estéril.

En diversas modalidades, el primer dispositivo en dicho sistema es un biorreactor que contiene el material de partida, por ejemplo, cultivar células que expresan una proteína a purificar. El biorreactor puede ser cualquier tipo de biorreactor como un biorreactor de lotes o alimentado por lotes o un biorreactor continuo como un biorreactor de fermentación de perfusión continua. El biorreactor puede estar hecho de cualquier material adecuado y puede ser de cualquier tamaño. Los materiales típicos son acero inoxidable o plástico. En una modalidad particular, el biorreactor es un biorreactor desechable, por ejemplo, en forma de una bolsa flexible y plegable, diseñada para un solo uso.

La clarificación puede realizarse directamente en el biorreactor, o alternativamente, el biorreactor puede simplemente usarse para cultivar las células, y la clarificación se realiza en un recipiente diferente. En otra modalidad más, el cultivo celular simplemente fluye a través de un dispositivo de filtración en profundidad de clarificación como se enseñó en la presente descripción para eliminar una o más impurezas. En consecuencia, en algunas modalidades, el biorreactor está en comunicación fluida con un dispositivo para realizar filtración en profundidad.

El dispositivo de filtración en profundidad de clarificación tal como se enseñó en la presente descripción está en comunicación fluida con un dispositivo para realizar la captura mediante el uso de una cromatografía de unión y elución (por ejemplo, un dispositivo de cromatografía continua de múltiples columnas). En algunas modalidades, el dispositivo para cromatografía de unión y elución está conectado en comunicación fluida con una operación unitaria para realizar la purificación de flujo continuo, que puede incluir más de un dispositivo/etapa. En algunas modalidades, se incluye un mezclador estático en línea o un tanque de compensación entre el dispositivo para la cromatografía de unión y elución y el primer dispositivo usado para la purificación por flujo.

En algunas modalidades, el proceso de purificación de flujo continuo incluye más de un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de carbón activado seguido de un dispositivo de cromatografía AEX seguido de un mezclador estático en línea y/o un tanque de compensación para cambiar el pH, seguido de un dispositivo de cromatografía CEX seguido de un dispositivo de filtración de virus. Los dispositivos generalmente pueden estar en cualquier formato adecuado, por ejemplo, una columna o un cartucho.

Las últimas operaciones unitarias en el sistema pueden incluir uno o más dispositivos para lograr la formulación, que incluye diafiltración/concentración y filtración estéril.

Típicamente, cada dispositivo incluye al menos una entrada y al menos una salida, para permitir que la salida de un dispositivo esté en comunicación fluida con la entrada de un dispositivo consecutivo en el sistema.

En la mayoría de los procesos y sistemas usados en la industria hoy en día, cada dispositivo usado en un proceso de purificación emplea una unidad de equipo de proceso, conocida además como "patín", que generalmente incluye las bombas, válvulas, sensores y soportes para dispositivos necesarios. Típicamente, al menos un patín está asociado con cada dispositivo. En algunas de las modalidades descritas en la presente descripción, se reduce el número de patines usados durante todo el proceso de purificación. Por ejemplo, en algunas modalidades, solo se usa un patín para realizar todo el proceso de purificación de flujo continuo, que puede incluir múltiples dispositivos, por ejemplo, dispositivo de carbón activado, dispositivo de cromatografía de intercambio aniónico, dispositivo de cromatografía de intercambio catiónico y dispositivo de filtración de virus, junto con cualquier equipo necesario para cambios de condición de solución. En consecuencia, en algunas modalidades, puede usarse un único patín para todas las etapas anteriores en el proceso de purificación de flujo continuo.

En algunas modalidades, la comunicación fluida entre los diversos dispositivos es continua; en que el fluido fluye directamente a través de todos los dispositivos sin interrupciones. En otras modalidades, pueden incluirse una o más válvulas, sensores, detectores, tanques de compensación y equipos para cualquier cambio de solución en línea entre

los diversos dispositivos, para interrumpir temporalmente el flujo de fluido a través del sistema, si es necesario, por ejemplo, para reemplazar/eliminar una operación unitaria particular.

5 En algunas modalidades, se incluyen uno o más tanques de compensación entre los diversos dispositivos. En algunas modalidades, no más de 3 y no más de 2 tanques de compensación están presentes en todo el sistema.

10 En algunas modalidades, un sistema incluye, además, uno o más sensores y/o sondas para controlar y/o monitorear uno o más parámetros de proceso dentro del sistema, por ejemplo, temperatura, presión, pH, conductividad, oxígeno disuelto (DO), dióxido de carbono disuelto (DCO₂), velocidad de mezcla, velocidad de flujo, parámetros del producto. El sensor, además, puede ser un sensor óptico en algunos casos.

En algunas modalidades, el control del proceso puede lograrse de manera que no comprometa la esterilidad del sistema.

15 En algunas modalidades, los sensores y/o sondas pueden conectarse a un módulo electrónico de sensores, cuya salida puede enviarse a una placa de terminales y/o una caja de relés. Los resultados de las operaciones de detección pueden ingresarse en un sistema de control implementado por computadora (por ejemplo, una computadora) para el cálculo y control de varios parámetros (por ejemplo, mediciones de temperatura y peso/volumen, pureza) y para la visualización y la interfaz de usuario. Tal sistema de control además puede incluir, además, una combinación de sistemas electrónicos, mecánicos y/o neumáticos para controlar los parámetros del proceso. Debe apreciarse que el sistema de control puede realizar otras funciones y la invención no se limita a tener una función particular o conjunto de funciones.

25 La descripción expuesta anteriormente puede abarcar múltiples invenciones distintas con utilidad independiente. Aunque cada una de estas invenciones se ha descrito en su(s) forma(s) preferida(s), las modalidades específicas de la misma tal como se describen e ilustran en la presente descripción no deben considerarse en un sentido limitante, porque son posibles muchas variaciones. El objeto de las invenciones incluye todas las combinaciones y subcombinaciones novedosas y no obvias de los diversos elementos, características, funciones y/o propiedades descritas en la presente descripción. Las siguientes reivindicaciones señalan particularmente ciertas combinaciones y subcombinaciones consideradas como novedosas y no obvias. Las invenciones incorporadas en otras combinaciones y subcombinaciones de características, funciones, elementos y/o propiedades pueden reivindicarse en solicitudes que reclamen prioridad de esta o una solicitud relacionada.

35 1. Un proceso para la clarificación de un alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y/o partículas coloidales por filtración en profundidad sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, el proceso que comprende:

40 a) proporcionar un dispositivo de filtración en profundidad que tiene medios filtrantes porosos de profundidad;
b) proporcionar un alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y/o partículas coloidales;
c) poner en contacto los medios de filtro de profundidad con el alimento; y
d) separar la biomolécula diana de interés de los restos celulares y las partículas coloidales en el alimento sin el uso de una etapa de clarificación primaria por centrifugación o una etapa de clarificación primaria por
45 microfiltración de flujo tangencial.

2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además agregar un floculante químico al alimento en la etapa (b), para formar un alimento floculado químicamente que incluye una pluralidad de restos celulares floculados y partículas coloidales;

50 3. El proceso de la reivindicación 1, en donde el medio filtrante de profundidad poroso es anisotrópico, los poros tienen una clasificación nominal de tamaño de poro > aproximadamente 25 µm, y el alimento floculado del filtro tiene > aproximadamente 3 % de sólidos, lo que resulta en una turbidez de salida < aproximadamente 20 NTU.

4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el proceso de clarificación es un proceso de clarificación primaria, y el filtro de profundidad comprende al menos 2 capas graduadas de fibras no tejidas.

55 5. El proceso de la reivindicación 4, en donde las capas graduadas tienen un espesor total de aproximadamente 0,3 cm hasta aproximadamente 3 cm.

6. El proceso de la reivindicación 1, en donde el filtro de profundidad comprende al menos 3 capas graduadas de fibras no tejidas.

60 7. El proceso de la reivindicación 6, en donde las capas graduadas tienen un espesor total de aproximadamente 0,3 cm hasta aproximadamente 3 cm.

8. El proceso de la reivindicación 1, en donde los restos celulares y las partículas coloidales tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 µm hasta aproximadamente 200 µm, y la media del tamaño de partícula es mayor que aproximadamente 10 µm.

65 9. El proceso de la reivindicación 2, en donde los medios del filtro de profundidad comprenden un compuesto de capas graduadas de fibras no tejidas, celulosa y tierra de diatomeas que tienen una clasificación nominal de tamaño de poro abierto suficiente para filtrar la materia prima de alimento floculada químicamente.

10. El proceso de la reivindicación 1, en donde la biomolécula diana de interés incluye anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales y bioterapéuticos.
11. El proceso de la reivindicación 1, en donde el floculante químico es un polímero o un ácido.
12. El proceso de la reivindicación 1, en donde el floculante químico es un polímero inteligente.
- 5 13. El proceso de la reivindicación 12, en donde el polímero inteligente es una poliamina modificada.
14. El proceso de la reivindicación 11, en donde el ácido es ácido acético.
15. El proceso de la reivindicación 4, en donde las fibras no tejidas comprenden polipropileno, polietileno, poliéster o nylon.
16. El proceso de la reivindicación 2, en donde el filtro de profundidad proporciona rendimientos > aproximadamente 100 L/M²/h y elimina los restos celulares floculados y las partículas coloidales que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 µm hasta aproximadamente 200 µm.
- 10 17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alimento es un cultivo celular ubicado en un biorreactor y se carga directamente desde el biorreactor al dispositivo de filtración en profundidad para el procesamiento de clarificación primaria.
- 15 18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el efluente de cultivo celular clarificado se carga directamente en una columna de cromatografía de unión y elución de proteína A para procesamiento cromatográfico.
19. Un proceso para la clarificación primaria de un alimento floculado que incluye una especie bimolecular de interés y una pluralidad de materiales celulares por filtración en profundidad sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, el proceso que comprende:
 - a) proporcionar un dispositivo de filtración en profundidad que tiene medios filtrantes porosos de profundidad;
 - b) proporcionar un floculante químico;
 - 25 c) proporcionar un alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de materiales celulares y/o partículas coloidales;
 - d) agregar el floculante químico al alimento;
 - e) formar un alimento floculado químicamente que incluye materiales celulares floculados y/o partículas coloidales;
 - 30 f) poner en contacto los medios de filtro de profundidad con el alimento floculado químicamente; y
 - g) separar la biomolécula diana de interés de los materiales celulares floculados y/o partículas coloidales floculadas en el alimento sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria.
- 35 20. El proceso de la reivindicación 19, en donde el medio filtrante de profundidad porosa es anisotrópico, los poros tienen una clasificación de tamaño nominal de poro > aproximadamente 25 µm, y el alimento floculado tiene > aproximadamente 3 % de sólidos que resultan en una turbidez de salida < aproximadamente 20 NTU.
21. El proceso de la reivindicación 19, en donde el filtro de profundidad comprende al menos 2 capas graduadas de fibras no tejidas.
- 40 22. El proceso de la reivindicación 21, en donde las capas graduadas tienen un espesor total de aproximadamente 0,3 cm hasta aproximadamente 3 cm.
23. El proceso de la reivindicación 19, en donde el filtro de profundidad comprende al menos 3 capas graduadas de fibras no tejidas.
- 45 24. El proceso de la reivindicación 23, en donde las capas graduadas tienen un espesor total de aproximadamente 0,3 cm hasta aproximadamente 3 cm.
25. El proceso de la reivindicación 19, en donde los materiales celulares y las partículas coloidales tienen una distribución del tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 µm hasta aproximadamente 200 µm, y un tamaño medio de partícula mayor que aproximadamente 10 µm.
- 50 26. El proceso de la reivindicación 19, en donde los medios del filtro de profundidad comprenden un compuesto de capas graduadas de fibras no tejidas, celulosa y tierra de diatomeas que tienen una clasificación de tamaño nominal de poro abierto suficiente para filtrar el alimento floculado químicamente.
27. El proceso de la reivindicación 19, en donde la biomolécula diana de interés incluye anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales y bioterapéuticos.
- 55 28. El proceso de la reivindicación 19, en donde el floculante químico es un polímero o un ácido.
29. El proceso de la reivindicación 19, en donde el floculante químico es un polímero inteligente.
30. El proceso de la reivindicación 29, en donde el polímero inteligente es poliamina modificada.
31. El proceso de la reivindicación 28, en donde el ácido es ácido acético.
32. El proceso de la reivindicación 19, en donde el filtro de profundidad proporciona rendimientos > aproximadamente 100 L/M² y elimina los restos celulares floculados las partículas coloidales floculadas.
- 60 33. El proceso de la reivindicación 19, en donde el alimento incluye cultivos celulares, cultivos de células de mamíferos transgénicas, cultivos de células bacterianas, cultivos de células de mamíferos no transgénicas, cultivos de tejidos, lotes de fermentación microbiana, extractos de plantas, biocombustibles, cultivos de agua de mar, cultivos de agua dulce, cultivos de aguas residuales, aguas residuales tratadas, aguas residuales no tratadas, cultivos de leche, hemocultivos y combinaciones de los mismos.
- 65 34. El proceso de la reivindicación 19, en donde las fibras no tejidas comprenden polipropileno.

35. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el alimento es un cultivo celular ubicado en un biorreactor y se carga directamente desde el biorreactor al dispositivo de filtración en profundidad para el procesamiento de clarificación primaria.

36. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el efluente de cultivo celular clarificado se carga directamente en una columna de cromatografía de unión y elución de proteína A para procesamiento cromatográfico.

37. Un dispositivo de filtración en profundidad para la clarificación primaria de un alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y/o partículas coloidales sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, que comprende un filtro de profundidad de medios porosos que tienen al menos 2 capas graduadas de fibras no tejidas que tienen un espesor total de aproximadamente 0,3 cm hasta aproximadamente 3 cm, y los poros tienen una clasificación de tamaño nominal de poro > aproximadamente 25 μm .

38. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde el medio es anisotrópico.

39. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde los medios comprenden al menos 3 capas graduadas de fibras no tejidas.

40. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde los medios comprenden un compuesto de capas graduadas de fibras no tejidas, celulosa y tierra de diatomeas que tienen una clasificación de tamaño nominal de poro abierto suficiente para filtrar la materia prima de alimento floculada químicamente.

41. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde las fibras no tejidas comprenden polipropileno, polietileno, poliéster o nylon.

42. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde los restos celulares y las partículas coloidales tienen una distribución del tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm , y un tamaño medio de partículas mayor de aproximadamente 10 μm .

43. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde el medio proporciona rendimientos > aproximadamente 100 L/M²/h y elimina los restos celulares floculados y las partículas coloidales que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm hasta aproximadamente 200 μm .

44. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde el alimento floculado del filtro tiene > aproximadamente 3 % de sólidos, lo que da como resultado una turbidez de salida < aproximadamente 20 NTU cuando se añade un floculante químico al alimento.

45. El dispositivo de la reivindicación 37, en donde la biomolécula diana de interés incluye anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales y bioterapéuticos.

46. Un proceso para purificar una proteína diana de una muestra que comprende:

(i) proporcionar una muestra que comprende una molécula diana y una o más impurezas;

(ii) agregar un precipitante a la muestra y eliminar una o más impurezas mediante el uso de un filtro de profundidad de gradiente de densidad, para obtener así una muestra clarificada;

(iii) someter la muestra clarificada a partir de (ii) a una etapa de cromatografía de unión y elución, para obtener así un eluato;

(iv) poner en contacto el eluato de la etapa (iii) con uno o más agentes inactivadores de virus mediante el uso de uno o más mezcladores estáticos en línea o uno o más tanques de compensación;

(v) someter la salida de la etapa de inactivación del virus a un proceso de purificación de flujo continuo que comprende el uso de dos o más matrices seleccionadas de carbón activado, medios de cromatografía de intercambio aniónico, medios de cromatografía de intercambio catiónico y membrana de filtración de virus; y

(vi) formular la salida de la etapa (v) a la concentración deseada y las condiciones del tampón,

en donde el proceso se realiza continuamente de modo que al menos dos o más de las etapas del proceso se realizan simultáneamente durante al menos una parte de su duración.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la clarificación primaria de un alimento floculado químicamente que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y/o partículas coloidales mediante filtración en profundidad sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, el proceso que comprende:

a) proporcionar un dispositivo de filtración en profundidad que tiene un medio de filtro de profundidad poroso seleccionado de los siguientes:

(i) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 100 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 50 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 25 μm , seguido de 1 capa de celulosa y 1 capa de tierra de diatomeas;

(ii) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 25 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 10 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 5 μm , seguido de 1 capa de celulosa y 1 capa de tierra de diatomeas;

(iii) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro nominal de 50 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 25 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 10 μm , seguido de 1 capa de celulosa y 1 capa de tierra de diatomeas;

(iv) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 100 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 50 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 25 μm , seguido de 1 capa de tierra de diatomeas y 1 capa de celulosa; o

(v) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 35 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 15 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 10 μm , seguido de 1 capa de tierra de diatomeas y 1 capa de celulosa; y

b) proporcionar un alimento floculado que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y/o partículas coloidales;

c) poner en contacto los medios de filtro de profundidad con el alimento; y

d) separar la biomolécula diana de interés de los restos celulares y las partículas coloidales en el alimento,

en donde las capas de fibras no tejidas tienen cada una un espesor de aproximadamente 0,4 cm y las capas de tierra de diatomeas y de celulosa tienen cada una un espesor de aproximadamente 0,35 cm.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medio de filtro de profundidad poroso es anisotrópico, los poros tienen una clasificación de tamaño nominal de poro mayor de aproximadamente 25 μm , y el alimento floculado tiene más de aproximadamente 3 % de sólidos, lo que da como resultado una turbidez de salida menor de aproximadamente 20 NTU.

3. El proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el floculante químico es un polímero, preferentemente un polímero inteligente, con mayor preferencia una poliamina modificada; o es un ácido preferentemente ácido acético.

4. El proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alimento incluye cultivos celulares, cultivos de células de mamíferos transgénicas, cultivos de células bacterianas, cultivos de células de mamíferos no transgénicas, cultivos de tejidos, lotes de fermentación microbiana, extractos de plantas, biocombustibles, cultivos de agua de mar, cultivos de agua dulce, cultivos de aguas residuales, aguas residuales tratadas, aguas residuales no tratadas, cultivos de leche, hemocultivos y combinaciones de los mismos.

5. El proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alimento es un cultivo celular ubicado en un biorreactor y se carga directamente desde el biorreactor al dispositivo de filtración en profundidad para el procesamiento de clarificación primaria; preferentemente en donde el efluente del cultivo celular clarificado se carga directamente en una columna de cromatografía de unión y elución de proteína A para el procesamiento cromatográfico.

6. Un dispositivo de filtración en profundidad para la clarificación primaria de un alimento que contiene una biomolécula diana de interés y una pluralidad de restos celulares y/o partículas coloidales sin el uso de una etapa de centrifugación para la clarificación primaria o una etapa de microfiltración de flujo tangencial para la clarificación primaria, que comprende un medio de filtro de profundidad poroso seleccionado entre los siguientes:

- (i) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 100 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 50 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 25 μm , seguido de 1 capa de celulosa y 1 capa de tierra de diatomeas;
- 5 (ii) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 25 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 10 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 5 μm , seguido de 1 capa de celulosa y 1 capa de tierra de diatomeas;
- 10 (iii) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro nominal de 50 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 25 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño nominal de poro de 10 μm , seguido de 1 capa de celulosa y 1 capa de tierra de diatomeas;
- 15 (iv) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 100 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 50 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 25 μm , seguido de 1 capa de tierra de diatomeas y 1 capa de celulosa; y
- 20 (v) de arriba a abajo, que tiene 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 35 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 15 μm , seguida de 2 capas de fibra no tejida cada una que tiene un tamaño de poro de 10 μm , seguido de 1 capa de tierra de diatomeas y 1 capa de celulosa,
- en donde las capas de fibras no tejidas tienen cada una un espesor de aproximadamente 0,4 cm y las capas de tierra de diatomeas y de celulosa tienen cada una un espesor de aproximadamente 0,35 cm.
- 25 7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el medio es anisotrópico.
8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el medio comprende un compuesto de capas graduadas de fibras no tejidas, celulosa y tierra de diatomeas que tienen una clasificación de tamaño nominal de poro abierto suficiente para filtrar la materia prima de alimento floculada químicamente; y/o el filtro comprende fibras no tejidas que comprenden polipropileno, polietileno, poliéster o nylon, preferentemente polipropileno.
- 30 9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde los restos celulares y las partículas coloidales tienen una distribución del tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 200 μm , y un tamaño medio de partícula mayor de aproximadamente 10 μm .
- 35 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde los medios proporcionan rendimientos de más de aproximadamente 100 L/M²/h y eliminan los restos celulares floculados y las partículas coloidales floculadas, preferentemente restos y partículas que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 200 μm .
- 40 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el alimento floculado tiene más de aproximadamente 3 % de sólidos, lo que da como resultado una turbidez de salida menor de aproximadamente 20 NTU cuando se añade un floculante químico al alimento.
- 45 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde la biomolécula diana de interés incluye anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos policlonales y bioterapéuticos.
- 50

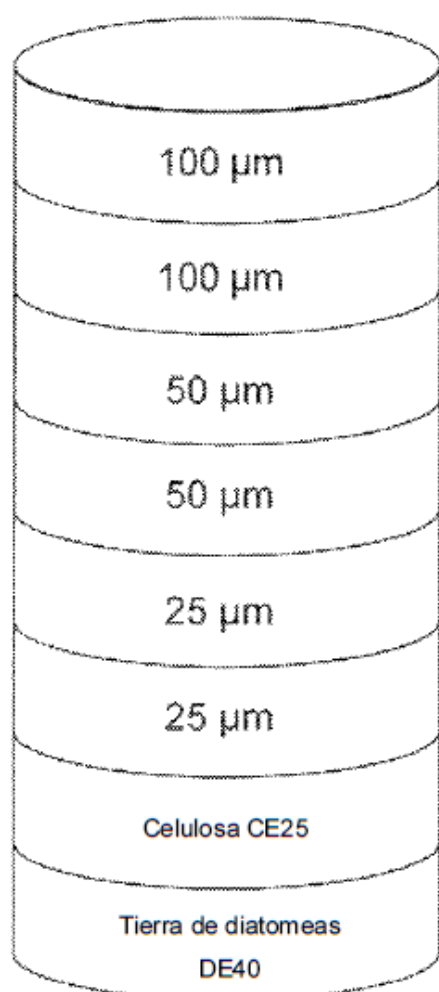


Figura 1A

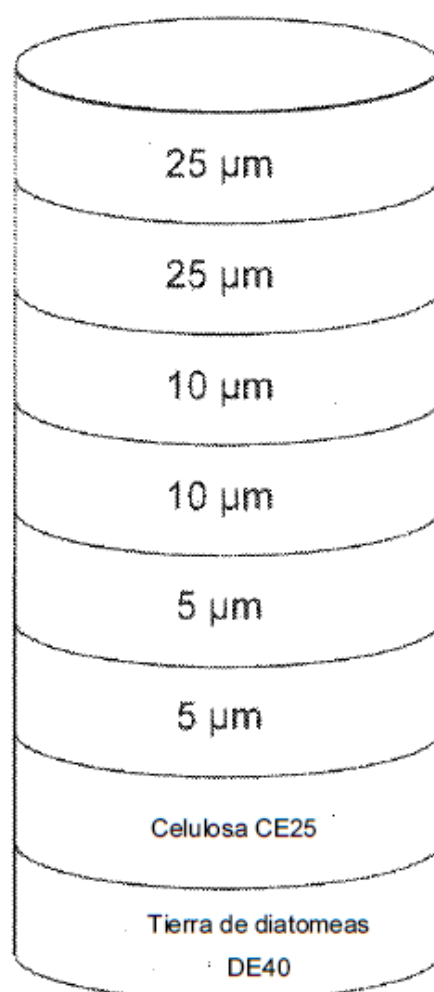


Figura 1B

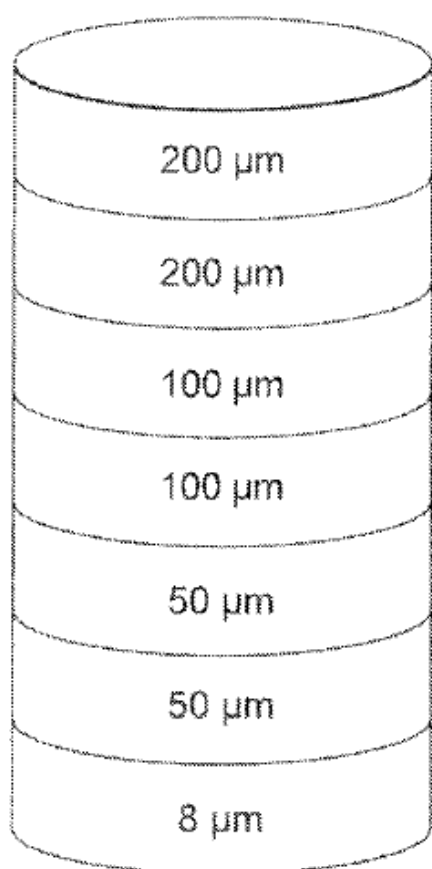


Figura 1C

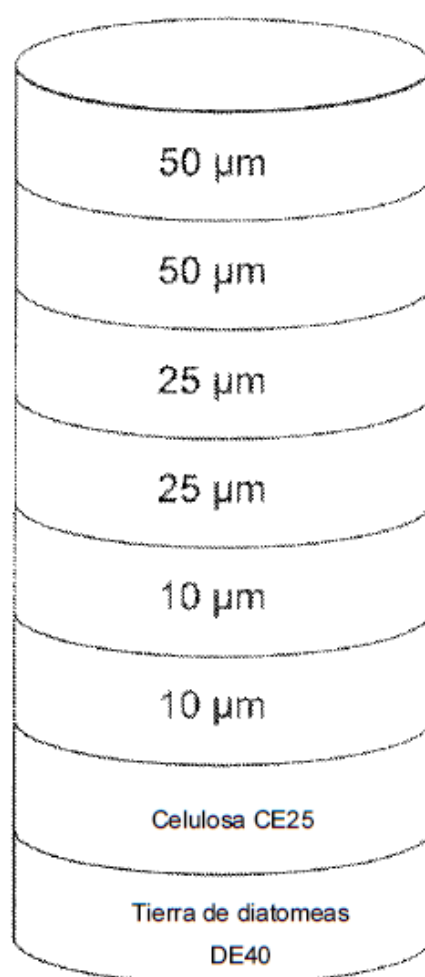


Figura 1D

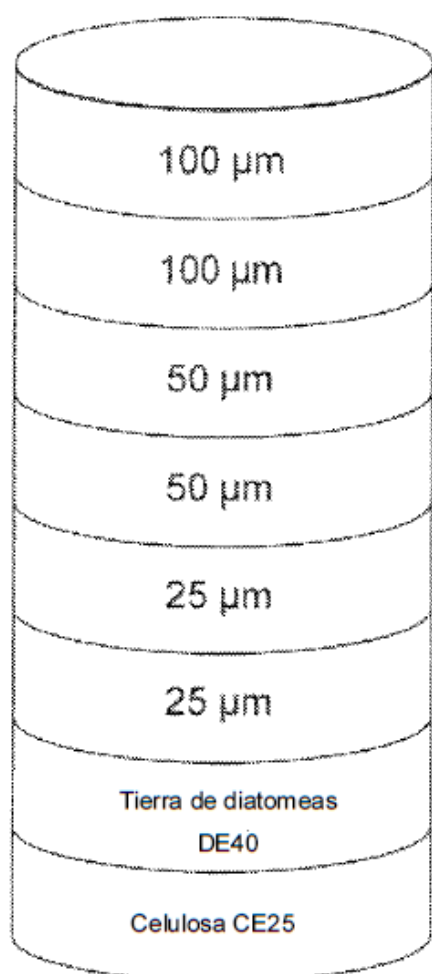


Figura 1E

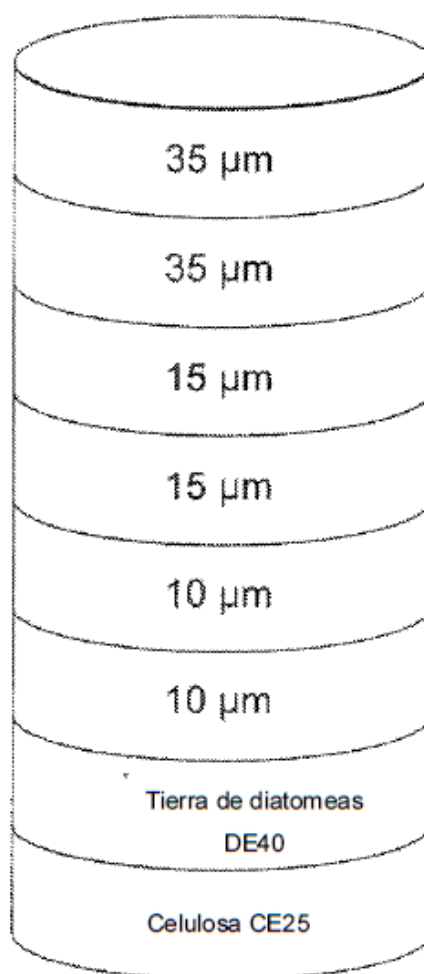


Figura 1F

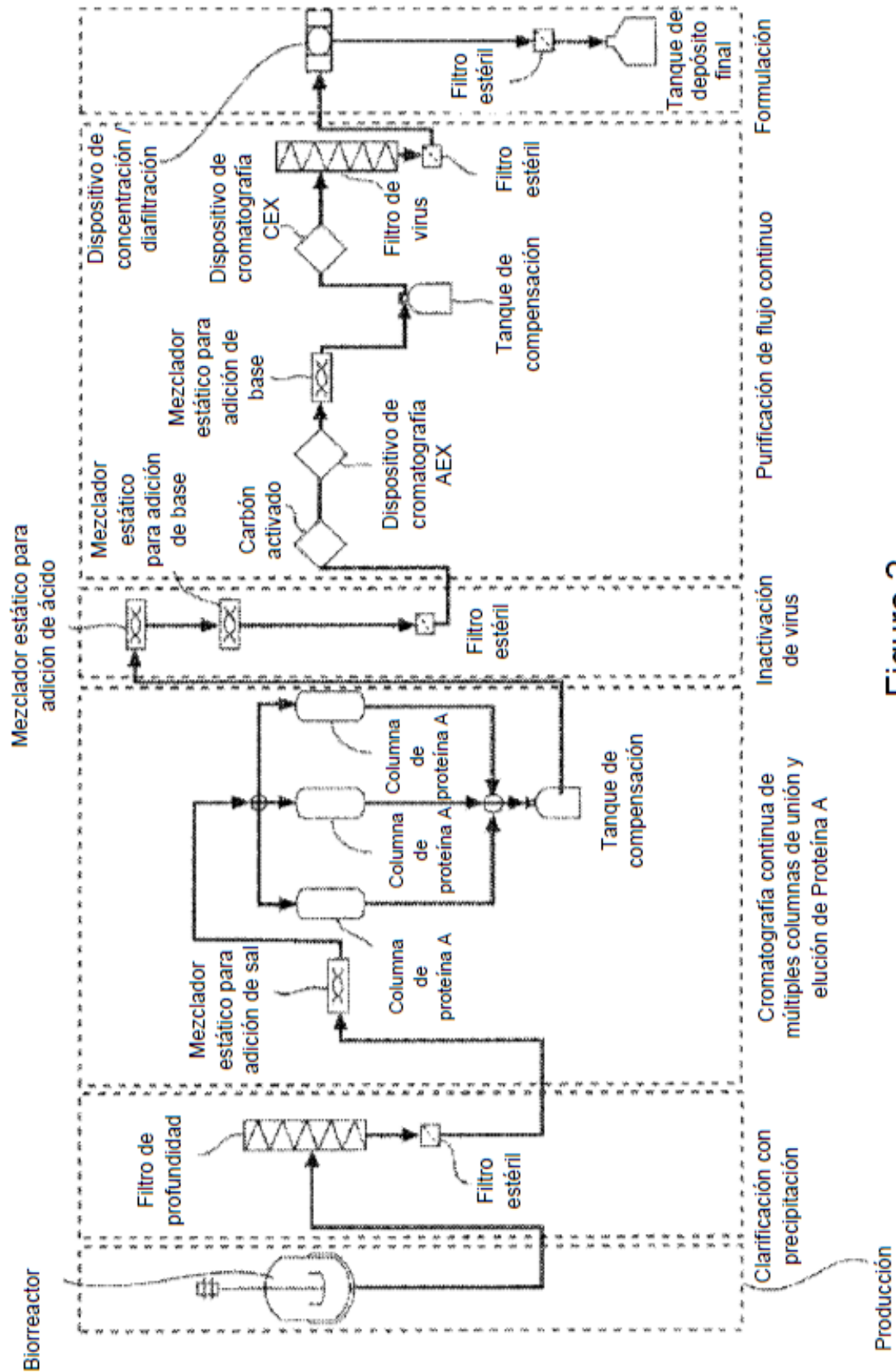


Figura 2