

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 995 480**

51 Int. Cl.:

B01D 61/14 (2006.01)

B01D 61/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2018 PCT/US2018/058660**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2019 WO19094249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2018 E 18804820 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 3710141**

54 Título: **Diafiltración continua mediante el ciclado del tanque**

30 Prioridad:

13.11.2017 US 201762585132 P

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

10.02.2025

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.00%)
400 Summit Drive
Burlington, MA 01803, US**

72 Inventor/es:

**GOODRICH, ELIZABETH M.;
GUPTA, AKSHAT y
LUTZ, HERBERT**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 995 480 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

Diafiltración continua mediante el ciclado del tanque

5 Antecedentes

La diafiltración suele implicar la eliminación de sales y, opcionalmente, de otras especies de bajo peso molecular de una muestra de bioproducción en la que reside una molécula objetivo, como una proteína, un péptido, un ácido nucleico o un anticuerpo. Otros usos de la diafiltración incluyen la purificación en la que el producto puede residir en el retentado o en el permeado (o en ambos). Aunque la diafiltración puede realizarse en varias etapas a lo largo de un proceso de bioproducción, con frecuencia se lleva a cabo como una etapa final en dichos procesos para intercambiar una especie de amortiguador y modificar el pH y/o la conductividad de una piscina de producto final que contiene la molécula objetivo.

15 Durante la diafiltración, los pasos de concentración y dilución alternados y/o concurrentes "lavan" las sales de la muestra. La diafiltración se realiza normalmente como una operación por lotes (es decir, diafiltración por lotes), en la que un volumen de muestra se somete a varias iteraciones de paso a través de un ensamble de filtración, con una corriente de retentado del ensamble de filtración que se recircula de nuevo a un tanque de alimentación y una solución amortiguadora fresca que se introduce en el tanque de alimentación para reemplazar el disolvente perdido durante la filtración. La filtración repetida de la muestra continúa hasta que se cumplen las condiciones finales de procesamiento, momento en el que el producto se recupera del sistema. Alternativamente, un volumen de muestra puede viajar a través de una serie de ensambles de filtración de un solo paso (es decir, diafiltración en línea), con la introducción de una solución de amortiguador entre cada platina de filtración. Al realizar la diafiltración con una serie de platinas de filtración de paso único, la entrada y salida de la muestra hacia y desde el sistema de diafiltración puede ser continua. LUTZ H: "Ultrafiltration: Fundamentals and Engineering", Comprehensive Membrane Science and Engineering, vol. 2, 1 ene 2010, pp. 115-139, XP009154484 divulga un sistema de diafiltración por lotes. US 2009/0173690 divulga un sistema de ósmosis inversa que funciona por lotes.

30 Breve Descripción de la Invención

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Se proporcionan métodos y sistemas de diafiltración en los que se puede conseguir una entrada y una salida continuas de una muestra de bioproducción (denominada alternativamente "producto") con el uso de procesos y ensambles de filtración por lotes. Dichos métodos y sistemas pueden proporcionar una producción continua, al tiempo que requieren una superficie de membrana y/o un volumen de amortiguador menores que los requeridos habitualmente para la diafiltración en conducto.

La invención se refiere a un proceso para filtrar una muestra líquida que comprende el encaminamiento de un primer lote de una muestra líquida desde un contenedor de muestras (o fuente de alimentación) a un primer tanque de ciclado. Tras llenar el primer tanque de ciclado, el primer lote se encamina desde el primer tanque de ciclado hasta un ensamble de diafiltración mediante un proceso de diafiltración continuo que incluye encaminar el retentado producido por la diafiltración del primer lote de la muestra líquida de vuelta al primer tanque de ciclado o a un ensamble de filtración de concentración o a un contenedor para la recuperación del producto. El proceso incluye además dirigir un segundo lote de la muestra líquida desde el contenedor de muestras o la fuente de alimentación a un segundo tanque de ciclado mientras el primer lote se somete a diafiltración. Tras el llenado del segundo tanque de ciclado, el segundo lote de la muestra líquida se dirige desde la segunda tanque cíclica al ensamble de diafiltración mediante el proceso de diafiltración continua, que incluye además el encaminamiento del retentado producido por la diafiltración continua del segundo lote de la muestra líquida de vuelta a la segunda tanque cíclica o al ensamble o contenedor de filtración de concentración para la recuperación del producto. El llenado y la diafiltración continua de los lotes de la muestra líquida, y el vaciado de la muestra líquida, continúan alternándose entre la primera y la segunda tanque de ciclado hasta que se procesa un volumen total de producto.

El proceso de diafiltración continua puede ser, por ejemplo, un proceso de diafiltración de volumen constante o un proceso de diafiltración de volumen óptimo. Además, se podría emplear la diafiltración discontinua, que utiliza una serie de pasos alternos de concentración y dilución para efectuar el intercambio del amortiguador.

55 En otras realizaciones, la muestra líquida puede concentrarse antes de ser entregada a la primera o segunda tanque de ciclado, como por ejemplo mediante un proceso de filtración de flujo tangencial de paso único (SPTFF). Opcionalmente, el proceso puede incluir además el encaminamiento alternativo del retentado de los lotes primero y segundo de muestra líquida a un tanque de retención antes de entregar el retentado a un ensamble de filtración de concentración posterior. El retentado producido por la diafiltración de cada lote puede filtrarse alternativamente por el ensamble de filtro de concentración, como por ejemplo por filtración de flujo tangencial de paso único (SPTFF), hasta recuperar un volumen total de producto. El proceso puede incluir además la limpieza de una de las primeras y segundas tanques de ciclado durante el proceso de diafiltración continua en la otro del primer y segundo tanques de ciclado. El ensamble de filtración puede limpiarse y/o enjuagarse durante el llenado del primer o segundo tanque de diafiltración.

En otras realizaciones, el proceso incluye dirigir un tercer lote de la muestra líquida desde el contenedor de muestras a un tercer tanque de ciclado y alternar el llenado y la diafiltración continua de lotes de la muestra líquida entre los tanques de ciclado primero, segundo y tercero hasta que se recupere un volumen total de producto. El tercer lote de la muestra líquida puede dirigirse desde el tercer tanque de ciclado a un segundo ensamble de diafiltración mediante un proceso de diafiltración continua que incluya el encaminamiento del retentado producido por la diafiltración continua del tercer lote a la muestra líquida de vuelta al tercer tanque de ciclado o a un ensamble o contenedor de filtración de concentración para la recuperación del producto. Los dos ensambles de diafiltración pueden configurarse para funcionar en paralelo.

En otra realización, la invención se refiere a un sistema para filtrar una muestra líquida que comprende un primer y un segundo tanques de ciclado, una primera válvula configurada para dirigir un flujo de una muestra líquida al primer o segundo tanque de ciclado, un ensamble de diafiltración continua (CDF), una segunda válvula configurada para dirigir un flujo de la muestra líquida al ensamble CDF desde el primer o segundo tanque de ciclado, una bomba de diafiltración, y una tercera válvula configurada para dirigir un flujo de solución de amortiguador al retentado del ensamble CDF que regresa al primer o segundo tanque de ciclado. El sistema incluye un controlador configurado para conmutar la primera válvula para dirigir alternativamente la muestra líquida a uno de los tanques de ciclado primero y segundo mientras conmuta las válvulas segunda y tercera para dirigir la muestra líquida al ensamble CDF desde, y la solución de amortiguador al retentado que regresa a, el otro de los tanques de ciclado primero y segundo a través de un proceso de diafiltración continuo.

El ensamble CDF comprende un ensamble de filtración de flujo tangencial (TFF). El sistema puede incluir además un ensamble de filtración de flujo tangencial de paso único (SPTFF) corriente arriba de los tanques de diafiltración primero y segundo y/o corriente abajo de los tanques de diafiltración primero y segundo para concentrar una muestra antes y/o después de la diafiltración. El sistema también puede incluir un tanque de retención o medios para contener un volumen de sobrepresión corriente arriba o corriente abajo de los tanques de diafiltración primero y segundo.

En otras realizaciones, el sistema comprende un tercer tanque de ciclado, en el que el controlador está configurado además para ciclar lotes de la muestra líquida entre el primer, segundo y tercer tanque de ciclado en el proceso de diafiltración continua en el ensamble CDF. Puede incluirse un segundo ensamble CDF configurado para operar en paralelo con el primer ensamble CDF. El controlador puede configurarse además para ciclar lotes de la muestra líquida entre la primera, segunda y tercera tanques de ciclado en un proceso de diafiltración continuo tanto en el primer como en el segundo ensamble CDF. Se pueden añadir tanques de ciclado adicionales más allá de la tercera tanque de ciclado hasta tantas tanques de ciclado como sea práctico para la aplicación dada. Cada tanque de ciclado puede estar configurado para realizar una función diferente (por ejemplo, química de reacción o diferentes memorias temporales para la diafiltración de impurezas) mientras otro tanque de ciclado está sometido a CDF.

En otra realización, el sistema comprende un depósito de amortiguador de diafiltración. La bomba de diafiltración puede estar en comunicación fluida con el tanque amortiguador de diafiltración y los tanques de ciclado primero y segundo, o con un conducto de fluido configurado para dirigir el retentado a los tanques de ciclado primero y segundo. El sistema puede comprender además múltiples tanques de amortiguador de diafiltración que pueden tener la misma o diferentes soluciones amortiguador. El controlador puede configurarse además para controlar un flujo de la solución amortiguadora en la bomba de diafiltración para mantener un punto de consigna que puede ser, por ejemplo, un flujo, el nivel del depósito, el tanque, el peso u otro parámetro medible. El sistema puede comprender además una bomba de alimentación en comunicación fluida con la primera y la segunda tanques de ciclado y el ensamble CDF, en el que el controlador está configurado además para controlar un flujo de la muestra líquida en la bomba de alimentación para mantener un punto de ajuste que puede ser, por ejemplo, un flujo, la presión de entrada de la membrana, la caída de presión de la membrana u otro parámetro medible.

En otra realización más, las vías de flujo en contacto con el fluido del sistema están esterilizadas o desinfectadas para crear un sistema cerrado y comprenden ensambles esterilizados/desinfectados que han sido esterilizados/desinfectados mediante irradiación gamma, ETO, NaOH u otro método, con conexión aséptica mediante soldadura de tubos o conectores asépticos, y utilizando filtros estériles en los conductos de entrada y salida al sistema de diafiltración continua para el control de la carga biológica

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior se desprenderá de la siguiente descripción más particular de las realizaciones de ejemplo, tal como se ilustran en los dibujos adjuntos en los que los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar las realizaciones.

La FIGURA 1 es un esquema de un sistema de diafiltración continua de la invención que consta de un mínimo de componentes sin dejar de conseguir un proceso de diafiltración continua.

La FIGURA 2 es un esquema de otro ejemplo de un sistema de diafiltración continua de la invención que incluye equipo adicional para las operaciones de lavado y limpieza y también proporciona un ejemplo de cómo puede

colocarse una operación de unidad SPTFF tanto antes como después de la diafiltración continua.

Las FIGURAS 3A-3N ilustran los pasos de un proceso de diafiltración continua en el sistema de la FIGURA 2.

La FIGURA 4 es un esquema de otro ejemplo de sistema de diafiltración continua que incluye un tercer tanque de ciclado.

5 La FIGURA 5 es un gráfico del flujo de alimentación frente a los pasos de la bomba, y del área requerida/flujo de los resultados experimentales de pequeños lotes utilizando una configuración paralela de filtros TFF.

La FIGURA 6 es un gráfico del flujo de alimentación frente a los pasos de la bomba, y del área requerida/flujo de los resultados experimentales de pequeños lotes utilizando una configuración en serie de filtros TFF.

La FIGURA 7 es un esquema que ilustra un proceso de recuperación en modo de avance.

10 La FIGURA 8 es un esquema que ilustra un proceso de recuperación en modo inverso.

La FIGURA 9 es un esquema que ilustra un sistema experimental de diafiltración con dos tanques de ciclado.

La FIGURA 10 es un gráfico de cambio de presión, presión transmembrana, lectura UV de recuperación de producto y volumen de consumo de permeado/amortiguador a lo largo del tiempo para un primer ciclo experimental de diafiltración continua.

15 La FIGURA 11 es un gráfico del cambio en la presión, la presión transmembrana, la lectura UV de recuperación de producto y el volumen de consumo de permeado/amortiguador a lo largo del tiempo para cuatro ciclos experimentales de diafiltración continua.

La FIGURA 12 es un gráfico del TMP y del volumen de permeado acumulado frente al tiempo de diafiltración para 4 ciclos consecutivos de DF en la misma membrana.

20 La FIGURA 13 es una tabla de los resultados de la variabilidad de los ciclos de los cuatro ciclos continuos de diafiltración realizados en el experimento descrito en las FIGURAS 9-12.

La FIGURA 14 es una tabla de resultados de rendimiento y balance de masa de los cuatro ciclos continuos de diafiltración de las FIGURAS 9-13.

25 La FIGURA 15 es un gráfico de la permeabilidad de la membrana obtenida sin limpieza tras los cuatro ciclos continuos de diafiltración de las FIGURAS 9-14.

Descripción detallada

Definiciones

30 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

35 Tal y como se utilizan en la presente, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen el plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

40 "Proceso de diafiltración continua" o "proceso CDF" se utiliza en la presente para referirse a un proceso por el que el intercambio de amortiguador de una muestra líquida se produce añadiendo amortiguador y eliminando permeado con un flujo de entrada y salida mínimamente ininterrumpido hacia y desde un ensamble de diafiltración.

45 "Conjunto de diafiltración continua" o "conjunto CDF" se utiliza en la presente para referirse a un conjunto de filtración configurado para su uso en un proceso de diafiltración continua y que contiene uno o más módulos de filtración(*por ejemplo*, un conjunto TFF).

"Ensamble TFF" y "sistema TFF" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un ensamble de filtración de flujo tangencial en el que el fluido se desplaza tangencialmente a lo largo de una superficie de una membrana de filtración en un módulo de filtración del sistema.

50 "Ensamble SPTFF" y "sistema SPTFF" se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un sistema de filtración de flujo tangencial de paso único que está configurado para funcionar en un modo de paso único, en el que el fluido pasa una vez a través del sistema.

55 Un "ensamble de filtración" se refiere a un ensamble que comprende una o más unidades de filtración o módulos de filtración, por ejemplo (incluyendo pero no limitado a), un casete, un filtro enrollado en espiral, una cápsula o un filtro de fibra hueca. Un ensamble de filtración puede incluir una o más unidades de filtración o módulos de filtración que operan en serie o en paralelo. El funcionamiento en serie se refiere a los módulos en los que el retentado del módulo anterior se convierte en la alimentación del módulo siguiente.

60 Un "casete" se refiere a un cartucho o elemento filtrante de placa plana que comprende láminas de membrana de filtración apiladas(*por ejemplo*, de ultrafiltración o microfiltración).

65 Un "elemento filtrante enrollado en espiral" se refiere a un elemento filtrante que comprende lámina(s) de membrana de filtración y, opcionalmente, material separador enrollado alrededor de un núcleo central.

Una "cápsula" se refiere a un elemento de filtración que comprende una matriz de lámina(s) de membrana de

filtración o material de filtración dentro de un cartucho sin soporte.

Por "elemento filtrante de fibra hueca" se entiende un elemento filtrante compuesto por un haz de tubos de membrana de filtración.

"Membrana de filtración" se refiere a una membrana selectivamente permeable para separar una alimentación en una corriente de permeado y una corriente de retentado en un proceso de filtración (*por ejemplo*, un proceso TFF, un proceso de diafiltración). Las membranas de filtración incluyen, entre otras, membranas de ultrafiltración (UF), membranas de microfiltración (MF), membranas de ósmosis inversa (RO) y membranas de nanofiltración (NF).

Los términos "membrana de ultrafiltración" y "membrana de UF" se definen generalmente como una membrana que tiene poros de un tamaño comprendido entre aproximadamente 1 nanómetro y unos 100 nanómetros, o alternativamente se definen por el "corte de peso molecular" de las membranas, expresado en unidades de Daltons, y abreviado como MWCO. En varias realizaciones, la presente invención utiliza membranas de ultrafiltración que tienen índices de MWCO en el rango de unos 1,000 Daltons a un 1,000,000 Daltons.

Los términos "membranas de microfiltración" y "membranas MF" se utilizan en la presente para referirse a las membranas que tienen poros de un tamaño comprendido entre unos 0,1 micrómetros y unos 10 micrómetros.

Los términos "alimentación", "muestra de alimentación" y "corriente de alimentación" se refieren a la solución que se suministra (*por ejemplo*, de forma continua o por lotes) a un módulo de filtración para ser filtrada. La alimentación que se suministra a un módulo de filtración para la filtración puede ser, *por ejemplo*, alimentación procedente de un contenedor de alimentación (*por ejemplo*, un contenedor, un tanque) externo o interno al sistema, o retentado que fluye por un tubo desde un módulo de filtración precedente corriente arriba del sistema de diafiltración.

"Producto" se refiere a un compuesto objetivo en una muestra de alimentación. Típicamente, un producto será una biomolécula (*por ejemplo*, una proteína) de interés, como un anticuerpo monoclonal (mAb). Puede residir en el retentado, en el permeado o en ambos.

El término "filtración" se refiere generalmente al acto de separar la muestra de alimentación en dos corrientes, un permeado y un retentado, utilizando membranas.

Los términos "permeado" y "filtrado" se refieren a la porción del alimento que ha permeado a través de la membrana.

El término "retentado" se refiere a la porción de la solución que ha sido retenida por la membrana, y el retentado es la corriente enriquecida en una especie retenida.

"Conducto de alimentación" o "canal de alimentación" se refiere a un conducto para transportar una alimentación desde una fuente de alimentación (*por ejemplo*, un contenedor de alimentación) a una o más unidades de procesamiento en un ensamble de filtración.

"Conducto de retentado" o "canal de retentado" se refiere a un conducto en un ensamble de filtración para transportar el retentado.

"Conducto de permeado" o "canal de permeado" se refiere a un conducto en un ensamble de filtración para transportar permeado.

El término "pluralidad", cuando se utiliza en la presente para describir las unidades de procesamiento, se refiere a dos o más unidades de procesamiento (*por ejemplo*, dos o más unidades de filtración).

"Fluidamente conectado" se refiere a dos o más componentes de un ensamble de filtración que están conectados por uno o más conductos (*por ejemplo*, un canal de alimentación, un canal de retentado, un canal de permeado) de tal manera que un líquido puede fluir de un componente al otro.

"Procesamiento" se refiere al acto de filtrar (*por ejemplo*, mediante TFF) un alimento que contiene un producto de interés y recuperar posteriormente el producto en una forma concentrada o purificada.

Un "tanque cíclico" o "tanque cíclico" se utiliza en la presente para referirse a un contenedor configurado para almacenar un fluido que puede ser de un solo uso o de usos múltiples y estar compuesto de plástico, vidrio o metal, *por ejemplo*, y que puede ser capaz de recibir o incluir un mezclador interno para mezclar un fluido retenido, incluyendo, *por ejemplo*, tanques por lotes convencionales, bolsas y bolsas de un solo uso. El tanque cíclico o tanque de ciclado también puede configurarse de forma integral en el conducto o canal de alimentación, de manera que pueda captar un volumen de sobrealimentación y no sea necesario que sea un componente separado y distinto. Es preferible que los tanques aquí descritos demuestren una buena mezcla para lograr rendimientos eficientes. Esto puede lograrse, *por ejemplo*, mediante el uso de un mezclador interno y/o mediante el diseño del

tanque y la entrada del flujo de retentado para ayudar a la mezcla. El diafiltrado puede añadirse directamente al tanque, pero es preferible añadirlo al conducto de retentado antes de introducir los fluidos combinados en el tanque.

5 Una "bomba" se utiliza en la presente para referirse a un método o dispositivo configurado para impartir flujo, como inducir un flujo por gravedad, aplicando un diferencial de presión a un fluido, incluyendo, por ejemplo, una bomba de levitación magnética, una bomba peristáltica o una bomba de diafragma.

"Caída de presión transmembrana" es la caída de presión media del módulo a través de una membrana de filtración

10 "Flujo transversal" es el flujo de retentado entre una entrada y una salida de un módulo de filtración. A menos que se indique lo contrario, "flujo transversal" se refiere a un flujo transversal medio.

15 "Flujo de permeado" se refiere a un flujo de permeado normalizado por área en un canal de permeado (por ejemplo, litros/hora/m², LMH) de un módulo de filtración.

"Flujo transversal" se refiere a un flujo medio normalizado por área del retentado en un canal de alimentación (por ejemplo, litros/min/m², 1 mm) de un módulo de filtración.

20 "Válvulas" se refiere a los métodos o ensambles que detienen el flujo de fluido y lo redirigen a través de los conductos del sistema. Esto puede incluir el desplazamiento físico de tubos entre depósitos en sistemas abiertos, el "pinzamiento" de tubos, las válvulas on-off, las válvulas de control y las válvulas multipuerto.

A continuación se describen algunas realizaciones de ejemplo.

25 *Sistemas y métodos de diafiltración para la producción continua*

30 En la industria biofarmacéutica, la diafiltración se realiza tradicionalmente como un proceso por lotes en el que una muestra se somete a varias iteraciones de filtración, con un intercambio de amortiguador que se produce gradualmente a lo largo de las varias iteraciones. La diafiltración por lotes tradicional es un proceso de producción intrínsecamente discontinuo, ya que la entrada y salida del producto hacia y desde el sistema de diafiltración se detiene mientras la muestra se somete a las diversas iteraciones de la filtración. A medida que la industria biofarmacéutica avanza hacia el procesamiento continuo para varias de sus operaciones unitarias (*por ejemplo*, producción y recolección por perfusión, cromatografía de flujo continuo, concentración de paso único), surge la necesidad de métodos y sistemas de diafiltración que sean capaces de proporcionar una entrada y una emanación continuas de un producto. Aunque la diafiltración en línea puede proporcionar una entrada y una emanación continuas de un producto, estos sistemas requieren áreas de membrana y volúmenes de amortiguador indeseablemente grandes y resultan muy difíciles de manejar en un entorno cGMP para equilibrar los flujos múltiples. Existe la necesidad de sistemas y métodos de diafiltración que puedan realizar la diafiltración en un proceso de producción continuo, que no requieran superficies de membrana y volúmenes de amortiguador indeseablemente grandes y que sean fáciles de manejar.

45 La diafiltración convencional por lotes suele funcionar sólo durante unas horas para minimizar la degradación de las proteínas a través de múltiples pasadas de la bomba, gestionar la carga biológica y equilibrar el conducto de producción por lotes para dar tiempo a los pasos operativos previos y posteriores al procesamiento. El uso de ciclos permite un funcionamiento continuo a la línea de producción de equilibrio, una utilización más prolongada de la membrana para reducir los requisitos de superficie, y permite que los sistemas compactos con componentes estériles o desinfectados gestionen la carga biológica, sin añadir una complejidad significativa.

50 En los métodos y sistemas de la presente invención, la diafiltración por lotes puede realizarse como una operación central para efectuar el intercambio de amortiguador, con la operación ciclando entre muestras de alimentación proporcionadas por dos o más tanques de ciclado. Como tal, se proporcionan múltiples alícuotas de un volumen global de lote para la diafiltración, lo que da como resultado una entrada y salida continuas de un producto hacia y desde el sistema de diafiltración. Dichos sistemas de diafiltración pueden colocarse entre cualquier proceso u operación unitaria que exista corriente arriba o corriente abajo, por ejemplo, entre operaciones unitarias de SPTFF, reacción, cromatografía, clarificación y/o filtración de virus. Múltiples sistemas de diafiltración de este tipo pueden funcionar en serie o en paralelo y pueden incluir productos ligados como cuentas de cromatografía, sustratos celulares o polímeros adsorbentes en los que los productos se adsorben, lavan, eluyen y regeneran secuencialmente en una serie de pasos sucesivos realizados mediante membranas para facilitar la separación y la retención.

65 Un ejemplo de sistema de diafiltración 100 se muestra en la FIGURA 1 e incluye unas primeras y segundas tanques de ciclado, 102, 104 y un ensamble de diafiltración continua 124. Cada una de las tanques de ciclado 102, 104 está conectada a un contenedor de muestras 110 por conductos de fluido 116a, 116b. El contenedor de muestras 110 puede ser cualquier contenedor configurado para almacenar o encaminar una muestra desde una ubicación anterior. El contenedor de muestras 110 también puede ser una longitud de conducto de fluido configurado en

tamaño para contener un volumen mayor que esté conectado a un proceso corriente arriba.

El sistema de diafiltración 100 incluye además las válvulas 132, 134, 136 y 138. La válvula de muestreo 132 puede conmutarse para controlar un flujo de la muestra a través de cualquiera de los conductos de fluido 116a, 116b de forma que la muestra se dirija al primer tanque de ciclado 102 o al segundo tanque de ciclado 104. La válvula amortiguador 134 puede accionarse para controlar un flujo de solución amortiguadora procedente de un contenedor amortiguador 154 y de una bomba de diafiltración 152 a través de cualquiera de los conductos de fluido 156a, 156b, de forma que la solución amortiguadora se suministre al primer tanque de ciclado 102 o al segundo tanque de ciclado 104. La válvula de alimentación 136 puede accionarse para controlar un flujo de solución de muestra desde la primera o la segunda tanque de ciclado 102, 104, a través de los conductos de fluido 126a, 126b, hasta el ensamble de diafiltración continua 124. Por último, la válvula 138 de retentado puede accionarse para dirigir un flujo de retentado que sale del ensamble 124 de diafiltración continua a través de cualquiera de los conductos de fluido 128a, 128b para volver a los tanques de ciclado 102, 104 o a través del conducto de fluido 128c para salir del sistema, almacenándose opcionalmente en un tanque de retención 148 antes de pasar al contenedor 140 de producto. El contenedor de producto 140 puede ser un paso final de llenado en el que el producto retentado se captura en una forma final para su uso por un usuario final. Opcionalmente, entre el ensamble de filtración continua 124 y la válvula de retentado 138 se encuentra una válvula de control de presión de retentado 139.

En la FIGURA 2 se muestra otro ejemplo de sistema de diafiltración 200 que tiene todos los componentes de la FIGURA 1. Además, en este ejemplo, una primera bomba de filtración 112 y un primer ensamble de filtración 114 están situados opcionalmente entre el contenedor de muestras 110 y las tanques de ciclado 102, 104. Una segunda bomba de filtración 142 y un segundo ensamble de filtración 144 están situados opcionalmente corriente abajo de los tanques de ciclado 102, 104, entre los tanques 102, 104 y el contenedor de producto 140.

Los componentes de preparación previa a la desfiltración y de limpieza posterior a la desfiltración pueden incluirse opcionalmente en el sistema 200. Por ejemplo, con respecto a la preparación previa a la desfiltración, los contenedores 180, 182 para almacenar agua (*por ejemplo*, agua desionizada por ósmosis inversa (RODI)) y soluciones de regeneración (*por ejemplo*, detergentes, enzimas, ácidos, bases, etc.) están en comunicación fluida con una primera válvula de limpieza 172, que dirige selectivamente el flujo de soluciones amortiguador y de regeneración al ensamble de filtración continua 124. También pueden incluirse válvulas de limpieza segunda y tercera 174, 176 para dirigir el flujo de soluciones de limpieza hacia y desde el ensamble de filtración continua 124.

Las válvulas 132, 134, 136 y 138 están conectadas a un controlador 160, como muestran los conductos discontinuos de la FIGURA 2. El controlador 160 está configurado para accionar las válvulas 132, 134, 136 y 138 como se describe más adelante. El controlador 160 también puede controlar el funcionamiento de cualquiera de las bombas de filtración primera y segunda 112, 142, la bomba de alimentación 122, la bomba de diafiltración 152 y la válvula de control de la presión del retentado 139. El controlador 160 también puede controlar opcionalmente los componentes de limpieza, incluidas las válvulas de limpieza 172, 174, 176. Las conexiones al controlador 160 desde las bombas de filtración primera y segunda 112, 142, la bomba de alimentación 122, la bomba de diafiltración 152, la válvula de control de presión del retentado 139 y las válvulas de limpieza 172, 174, 176 también se indican en conductos discontinuos en la FIGURA 2. El controlador 160 puede supervisar además un proceso de diafiltración recibiendo información de sensores situados en componentes del dispositivo que proporcionan, por ejemplo, lecturas de presión, ponderal, volumen, flujo, tiempo y/o concentración de la muestra. Por ejemplo, pueden incluirse sensores de ponderación en las tanques de ciclado 102, 104 o en el depósito de retención 148; los sensores situados en las válvulas 132, 134, 136, 138, 172, 174, 176 o cerca de ellas pueden proporcionar lecturas de presión, flujo y/o volumen de fluido. Para mayor claridad con respecto al diagrama de la FIGURA 1, no se muestran dichos sensores ni sus respectivas conexiones al controlador 160, pero debe entenderse que los sensores pueden estar situados en o cerca de cualquier componente del sistema, incluidos los conductos de fluido situados entre los componentes. El controlador 160 puede configurarse para controlar el inicio de la diafiltración, la tasa y el volumen de adición de amortiguador, los tiempos de lavado de recuperación y otros procesos del sistema, incluidos los procesos de limpieza, lavado, comprobación de la integridad y regeneración.

La configuración de las válvulas 132, 134, 136 y 138, que pueden ser válvulas de interruptor o válvulas multipuerto, permite que el flujo principal de producto se desplace cíclicamente entre las operaciones de llenado, diafiltración y recuperación de producto, mientras que el ensamble de diafiltración 124 funciona de forma continua.

Las FIGURAS 3A-3N ilustran un ejemplo de proceso de diafiltración en continuo utilizando el sistema 200 de la FIGURA 2. Opcionalmente, puede realizarse una operación inicial de lavado de la membrana antes de su uso, como se ilustra con las flechas en negrita 301a, 301b (FIGURA 3A). En concreto, las válvulas de limpieza primera, segunda y tercera 172, 174, 176 se accionan para dirigir un flujo de agua desde el contenedor 180 a través del ensamble de filtración continua 124. Con la válvula 138 de retentado cerrada a lo largo de los conductos de fluido 128a, 128b, 128c y la válvula 176 de limpieza abierta, el agua se dirige hacia la salida del sistema 200 tras el lavado de la membrana. Además, puede realizarse una operación opcional de equilibrado de la membrana antes de la diafiltración, como se ilustra con las flechas en negrita 302a, 302b (FIGURA 3B). En concreto, las válvulas de limpieza primera, segunda y tercera 172, 174, 176 se accionan para dirigir un flujo de solución de amortiguador

desde el contenedor 154 a través del ensamble de filtración continua 124.

Al iniciarse el proceso de diafiltración, la válvula 132 se conmuta para dirigir un flujo del producto desde el contenedor de muestras 110 al primer tanque de ciclado 102, como muestra la flecha en negrita 303a (FIGURA 3C). Opcionalmente, puede introducirse un flujo de solución de amortiguador en el primer tanque de ciclado antes o al mismo tiempo que se llena el depósito con solución de muestra. El primer ensamble de filtración 114 puede realizar opcionalmente un paso de concentración para concentrar la muestra antes de la diafiltración. Como se apreciará en las FIGURAS 3C-3N, una vez iniciado el proceso de diafiltración, el flujo de entrada al sistema de diafiltración 200 puede permanecer continuo hasta que la muestra se aproxime a la finalización del procesamiento.

Una vez que el primer tanque de ciclado 102 contiene un volumen suficiente para que comience la diafiltración de un primer lote de la muestra, la válvula 132 se conmuta para cambiar la dirección del flujo de la muestra al segundo tanque de ciclado 103, como muestra la flecha en negrita 303b (FIGURA 3D), mientras comienza la diafiltración del primer lote. En particular, las válvulas 136 y 138 se conmutan para dirigir el flujo del primer lote de muestra hacia y desde el ensamble de diafiltración 124 y el tanque del primer ciclo 102, como se muestra con la flecha 304a en negrita. Durante la diafiltración del primer lote, la válvula 134 se conmuta para dirigir la solución amortiguadora al primer tanque de ciclado 102, o a un conducto de fluido que conduce al primer tanque de ciclado, como muestra la flecha 304b en negrita. Como se apreciará en las FIGURAS 3D-3N, una vez iniciada la diafiltración, el ensamble de diafiltración 124 puede permanecer en funcionamiento continuo hasta que la muestra se aproxime a la finalización del procesamiento.

Una vez que se han cumplido las condiciones de procesamiento para el primer lote de muestra, ésta se dirige al tanque de retención 148, como muestra la flecha en negrita 305 (FIGURA 3E), para su almacenamiento hasta que vaya a comenzar la recuperación del producto. El depósito de retención 148 y cualquier filtración posterior de la muestra mediante el ensamble de filtración 144 son opcionales. Como alternativa, la muestra puede ser conducida por un conducto de fluido directamente a una siguiente platina de procesamiento o recuperación. A medida que el producto del primer lote de muestra se dirige al tanque de retención 148, el flujo de la muestra al sistema 200 continúa hacia el segundo tanque de ciclado 104, como muestra la flecha en negrita 303b. La recuperación del producto del primer lote de la muestra puede incluir opcionalmente un lavado del amortiguador, como muestran las flechas en negrita 306a, 306b (FIGURA 3F), y como se describe más adelante.

Entre la diafiltración de los lotes de muestras, puede purgarse opcionalmente la tanque de ciclado 102, como muestran las flechas en negrita 307a, 307b (FIGURA 3G), que se describen más adelante.

Una vez que la segunda tanque de ciclado 104 contiene un volumen suficiente para que comience la diafiltración de un segundo lote de la muestra, la válvula 132 se conmuta para invertir la dirección del flujo de la muestra de vuelta a el primer tanque de ciclado 102, como muestra la flecha en negrita 303a (FIGURA 3H), mientras comienza la diafiltración del segundo lote. En particular, las válvulas 136 y 138 se conmutan para dirigir el flujo del segundo lote de muestra hacia y desde el ensamble de diafiltración 124 y el tanque del segundo ciclo 102, como se muestra con la flecha en negrita 308a. Durante la diafiltración del segundo lote, la válvula 134 se conmuta para dirigir la solución amortiguadora al segundo tanque de ciclado 104, o a un conducto de fluido que conduce al primer tanque de ciclado, como muestra la flecha 308b en negrita.

Una vez que se han cumplido las condiciones de procesado para el segundo lote de la muestra, ésta se dirige al tanque de retención 148, como muestra la flecha en negrita 309 (FIGURA 3I), para su almacenamiento hasta que comiencen otros pasos de recuperación del producto.

Una vez que el tanque de retención 148 contiene un volumen suficiente para que comience la recuperación del producto, el flujo de la muestra se dirige desde el tanque de retención 148, a través de la segunda bomba de filtración 142 y el segundo ensamble de filtración 144, hacia el contenedor 140, como se muestra con la flecha en negrita 310 (FIGURA 3I). Como se apreciará en las FIGURAS 3I-3N, una vez iniciada la recuperación del producto del tanque de retención 148, la emanación del sistema de diafiltración 200 puede permanecer continua hasta que la muestra termine de procesarse.

Al igual que con el primer lote de la muestra, la recuperación del producto del segundo lote de la muestra puede incluir opcionalmente un lavado del amortiguador, como muestran las flechas en negrita 311a, 311b (FIGURA 3J). Entre la diafiltración de los lotes de muestras, la tanque de ciclado 104 puede purgarse opcionalmente, como muestran las flechas en negrita 312a, 312b (FIGURA 3K).

Opcionalmente, se puede llevar a cabo un proceso de regeneración rápida de la membrana entre la diafiltración de los lotes de muestras, como muestran las flechas en negrita 313a-313d (FIGURA 3L), en el que el ensamble de diafiltración 124 se lava y/o retrolava con amortiguador, agua y/o solución de regeneración. Este proceso de regeneración puede producirse sin interrupción del flujo de entrada y salida del sistema, ya que un flujo de entrada de muestra puede seguir dirigiéndose a uno de los tanques de ciclado (por ejemplo, al primer tanque de ciclado 102, como se muestra con la flecha en negrita 303a en la FIGURA 3L) y una emanación de muestra puede seguir dirigiéndose fuera del tanque de retención 148 (como se muestra con la flecha en negrita 310).

Una vez completada la diafiltración del segundo lote de muestra, así como cualquier proceso opcional de lavado o regeneración del amortiguador, se inicia la diafiltración de un tercer lote de muestra, con la muestra encaminada desde, y la solución amortiguadora encaminada hacia, el primer depósito 102 de ciclado, como muestran las flechas en negrita 304a, 304b (FIGURA 3M). El sistema sigue alternando el llenado y la diafiltración continua de lotes de la muestra entre los tanques de ciclo 102 y 104. Durante dicho ciclo, el ensamble de diafiltración 124 puede estar en funcionamiento continuo. Además, el flujo de entrada y salida del sistema (como muestran las flechas en negrita 303a, 303b y 310) también puede ser continuo.

Una vez que se aproxima la finalización de la diafiltración de todos los lotes de la muestra, puede cesar la afluencia al sistema y el funcionamiento del ensamble de filtración 124, mientras se permite que se complete la recuperación del producto, como se muestra en la FIGURA 3N.

Aunque se muestra que los sistemas de diafiltración 100 y 200 incluyen dos tanques de ciclado 102, 104 y un tanque de retención 148, son posibles otras configuraciones. Por ejemplo, en un sistema pueden incluirse tres, cuatro, cinco o más tanques de ciclado. Además, como se ha indicado anteriormente, la inclusión de un tanque de retención es opcional. En la FIGURA 4 se muestra una configuración alternativa de un sistema de diafiltración. El sistema de diafiltración 300 incluye un tercer tanque de ciclado 106. Las válvulas 134a, 136a y 138a están configuradas para dirigir, respectivamente, una corriente de amortiguador, una corriente de alimentación y una corriente de retentado a/desde cualquiera de los tres tanques de ciclo 102, 104 y 106. El sistema 300 incluye además una válvula de salida 146 configurada para controlar un flujo de muestra que sale de cualquiera de los tres tanques de ciclo 102, 104 y 106. Como tal, cualquiera de los tanques de ciclo 102, 104 y 106 puede almacenar un lote de muestra antes o después de la diafiltración, y los procesos de diafiltración pueden ciclar entre los tres tanques.

Los sistemas 100, 200, 300 pueden incluir además, opcionalmente, ensambles de diafiltración adicionales, de forma que, además de ciclar entre tanques, los procesos de diafiltración puedan funcionar en paralelo y/o ciclar entre los ensambles de diafiltración.

Los sistemas de la presente invención abarcan los ensambles de diafiltración continua que son ensambles de filtración de flujo tangencial (TFF). Los ensambles TFF pueden incluir casetes, elementos filtrantes enrollados en espiral, cápsulas o elementos filtrantes de fibra hueca. La TFF proporciona un método eficaz para realizar el intercambio de memorias temporales al tiempo que permite la concentración de una muestra en una misma operación unitaria. Como tal, el TFF es ventajoso para su uso en procesos de diafiltración.

En otra realización, los sistemas de la presente invención incluyen ensambles TFF situados corriente arriba y/o corriente abajo del ensamble de diafiltración (por ejemplo, los ensambles de filtración 114 y 144) para concentrar una muestra antes o después de la diafiltración. Estos ensambles TFF pueden ser ensambles TFF de paso único (SPTFF). Los ensambles SPTFF, y los métodos de uso de los mismos tras la diafiltración, permiten ventajosamente obtener mayores recuperaciones de producto mediante el uso de procesos de lavado del amortiguador, como se describirá más adelante. Sin un paso final de SPTFF en un proceso de lavado con amortiguador, el producto recuperado se diluiría por exceso de amortiguador.

En algunas realizaciones, los sistemas de diafiltración de la presente invención incluyen equipos de bioproducción estándar, como tanques por lotes convencionales, bombas y válvulas de control. Los sistemas incluyen además válvulas de conmutación y/o válvulas multipuerto en comunicación fluida con los tanques de ciclado y el ensamble de diafiltración para permitir que un flujo principal de producto se cicle entre las operaciones de llenado, diafiltración y recuperación de producto mientras el ensamble de diafiltración funciona de manera continua.

Los sistemas y métodos de la presente invención permiten ventajosamente que alícuotas más pequeñas de producto se sometan a diafiltración, al tiempo que proporcionan una producción continua. Al diafiltrar alícuotas más pequeñas, el tiempo de proceso, y por tanto el número de pasadas de la bomba, puede ser menor que en los procesos típicos de diafiltración por lotes. Es conveniente limitar el número de pasadas de la muestra por la bomba, ya que las biomoléculas pueden dañarse al pasar por las bombas y el equipo de filtración, lo que puede dar lugar a un menor rendimiento del producto. Además, dichos sistemas y métodos pueden utilizarse en conducto con otras operaciones de procesamiento, al tiempo que satisfacen los requisitos de intercambio de amortiguador para las operaciones de bioprocesamiento. Al dividir una muestra en varias alícuotas, pueden utilizarse tanques de ciclo y ensambles de filtración más pequeños, lo que permite reducir la huella del sistema y la duración de los ciclos. Además, al hacer pasar secuencialmente varios ciclos de producto por un ensamble de diafiltración de funcionamiento continuo, se eliminan los tiempos muertos entre lotes, como ocurre en la diafiltración por lotes tradicional. Con el funcionamiento continuo de un ensamble de diafiltración, la carga de proteína por área de membrana puede incrementarse, de tal manera que desechar la membrana al final del proceso y, en consecuencia, eliminar el tiempo de limpieza, las soluciones de limpieza y los esfuerzos de reutilización y revalidación, se vuelve más viable económicamente, en particular para las grandes operaciones.

En algunas realizaciones, queda un tiempo adecuado al final de cada ciclo de diafiltración para permitir el lavado del amortiguador con el fin de recuperar mayores cantidades de producto (FIGURAS 3F, 3J). El lavado con

- amortiguador puede realizarse, por ejemplo, introduciendo una solución amortiguadora, aire o drenaje por gravedad para empujar el producto adicional situado en o sobre la membrana del ensamble de diafiltración, o en conductos/tuberías de fluidos, de vuelta a un tanque del ciclo actual (también denominado retrolavado o lavado). El contenido del tanque del ciclo se suministra entonces como alimento para una operación posterior de la unidad.
- 5 Alternativamente, una muestra puede bombearse primero desde un tanque de ciclo y luego ser perseguida por una solución de amortiguador hasta un tanque de recogida de producto separado, cuyo contenido se suministra posteriormente como alimentación para la siguiente operación de la unidad.
- 10 En otras realizaciones, al final de cada ciclo de diafiltración queda un tiempo adecuado para realizar un ciclo de regeneración rápida de la membrana, lo que puede ayudar a mantener constantes los flujos de diafiltración a lo largo de operaciones de ciclado prolongadas. Puede que no sea necesario realizar ciclos de regeneración rápida después de cada ciclo de diafiltración, y pueden invocarse periódicamente o según sea necesario.
- 15 En otras realizaciones, tras todos los ciclos de diafiltración, el sistema se somete a un procedimiento de limpieza in situ (CIP) total o parcial. Como alternativa, o además, se sustituyen todos o algunos de los conductos de fluido y componentes del sistema. Por ejemplo, los ensambles de filtración TFF que incluyen módulos de un solo uso pueden tener dichos módulos retirados y desechados, o los tanques de ciclado que incluyen bolsas de un solo uso pueden tener dichas bolsas desechadas.
- 20 La diafiltración puede realizarse mediante varios métodos de control. En una realización, los procesos de diafiltración continua son procesos de diafiltración de volumen constante en los que un volumen total de la muestra se mantiene en un valor constante a lo largo de la diafiltración. En los procesos de diafiltración a volumen constante, la amortiguador se añade al tanque del ciclo al mismo ritmo que se elimina el filtrado. Como alternativa, se pueden llevar a cabo procesos convencionales de diafiltración por lotes en los que se añade un gran volumen de
- 25 amortiguador de diafiltración a un tanque cíclico y la muestra se somete a una filtración de concentración repetida hasta que se alcanza un determinado volumen de retentado. Cuando se alcanza un determinado volumen de retentado, se añade más amortiguador, y el proceso se repite hasta que se ha añadido el volumen total de amortiguador deseado.
- 30 En otra realización, los procesos de diafiltración continua de la presente invención son procesos de diafiltración óptimos. En los procesos de diafiltración óptimos, se permite que el volumen y la concentración de producto cambien a lo largo de una trayectoria controlada durante todo el proceso para optimizar el uso del amortiguador, el rendimiento del producto y el intercambio de amortiguador para una aplicación concreta. Los procesos de diafiltración óptimos pueden ser especialmente adecuados para operaciones en las que se desee eliminar un
- 35 componente que esté parcialmente retenido en la muestra, como, por ejemplo, en un proceso de diafiltración que, además de intercambiar la amortiguador, también implique la separación de proteínas de una muestra que contenga un producto de ácido nucleico.
- 40 Los métodos de control de la diafiltración pueden efectuarse mediante diversas estrategias de control. En una realización, los procesos de diafiltración continua se controlan mediante la supervisión y el ajuste del flujo transversal de la membrana TFF y la presión transmembrana (PTM). El flujo cruzado de la membrana TFF puede controlarse ajustando un flujo de alimentación, un flujo de retentado, un flujo cruzado medio y/o un punto de consigna de caída de presión para una bomba de alimentación. La TMP puede controlarse mediante una válvula de control de la presión del retentado o mediante una presión de superposición aplicada al tanque del ciclo. Durante
- 45 la diafiltración, un volumen de producto en recirculación puede controlarse a un punto de consigna constante (por ejemplo, diafiltración a volumen constante) o a un punto de consigna variable basado en un algoritmo que optimiza una concentración del producto y/o especies de amortiguador en el tanque del ciclo (*por ejemplo*, diafiltración óptima). El control del volumen puede supervisarse mediante una sonda de nivel o mediante células de carga asociadas a los tanques del ciclo. Como alternativa, pueden utilizarse flujoímetros, totalizadores y/o básculas
- 50 ponderales para medir un flujo de adición de amortiguador y un flujo de eliminación de permeado. Dichas mediciones pueden proporcionarse a un controlador (*por ejemplo*, el controlador 160), que puede supervisar el proceso de diafiltración y efectuar ajustes en el flujo cruzado y la TMP, como por ejemplo conmutando válvulas o ajustando la velocidad de las bombas.
- 55 El control del punto final para la diafiltración también puede efectuarse mediante diversas estrategias de control del punto final. En una realización, un punto final de diafiltración puede basarse en un volumen totalizado de amortiguador de diafiltración añadido y/o un volumen totalizado de permeado eliminado, medido mediante totalizadores de flujo o básculas ponderales situadas en los conductos de fluidos y tanques del sistema o cerca de ellos, o mediciones basadas en el tiempo. En otra realización, se puede activar un punto final de diafiltración
- 60 basándose en una calidad medible de la corriente de permeado o retentado que indique que se ha producido un intercambio de amortiguador adecuado. Por ejemplo, un punto final de la diafiltración puede ser un ajuste de la solución, como la reducción de la conductividad, en el que la diafiltración se ejecuta para reducir la conductividad antes de un siguiente paso como el TFF o un proceso de cromatografía de intercambio iónico. Algunos ejemplos de cualidades medibles son el pH, la conductividad, el índice de refracción, los rayos ultravioleta, la turbidez, la
- 65 medición del tamaño de las partículas o la medición directa casi en tiempo real de la concentración de un excipiente, una impureza o un producto objetivo (*por ejemplo*, determinada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento

(HPLC) u otro equipo analítico) en línea o in situ.

5 La recuperación del producto también puede efectuarse mediante diversas estrategias de recuperación. En una realización, se controlan los valores de consigna del flujo y/o la velocidad de la bomba para una bomba de alimentación y/o una bomba de diafiltración(por ejemplo, las bombas, 122, 152). En otra realización, se supervisa y controla un punto final de recuperación del tanque basándose en valores medidos obtenidos de sensores de nivel, peso y/o aire, una totalización de volumen medido, una duración de vaciado programada u otros medios para detectar que un tanque está vacío.

10 Por último, la recuperación del amortiguador puede controlarse mediante diversas estrategias de recuperación. En algunas realizaciones, el lavado del amortiguador se supervisa y controla en función del flujo, la velocidad y/o la presión de descarga de una bomba del amortiguador. Un punto final de lavado del amortiguador puede activarse por la duración del lavado, el volumen totalizado, el peso del contenedor de recuperación de amortiguador, un sensor de aire u otra calidad medible de solución proteínica/amortiguadora, como una señal ultravioleta (UV).

15 En algunas realizaciones, además de efectuar un intercambio de amortiguador, los sistemas y métodos de diafiltración continua también pueden proporcionar opcionalmente la filtración de especies de peso molecular relativamente bajo de otros componentes de la muestra. Algunos ejemplos de componentes permeables a los filtros a partir de componentes retenidos son las sales de las proteínas, las proteínas de los ácidos nucleicos, los productos proteínicos de las células o los flóculos, los virus y las proteínas de las células huésped de las células, los reactivos de replegado de las proteínas, el alcohol de las proteínas, el polietilenglicol (PEG) sin reaccionar de las proteínas PEGiladas, las toxinas sin reaccionar de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) y los carbohidratos sin reaccionar de las vacunas conjugadas.

20 Los sistemas y métodos de la presente invención pueden incluir la diafiltración por microfiltración, ultrafiltración, ósmosis inversa o nanofiltración, dependiendo de las moléculas que deban separarse. Ejemplos particulares de membranas de diafiltración adecuadas incluyen las membranas Biomax®-30kD y las membranas Ultracel®-30kD (EMD Millipore, Bedford, MA) u otros cortes de tamaño de membrana adecuados para retener los componentes de interés.

30 Algunos ejemplos de soluciones amortiguador adecuadas para su uso en los sistemas y métodos de la presente invención son el agua, las corriente purificadas, la solución salina tamponada con fosfato (PBS), los acetatos y las histidinas.

35 **EJEMPLIFICACIÓN**

Ejemplo 1: Viabilidad de la elaboración de pequeños lotes

40 La viabilidad de procesar pequeños lotes (aproximadamente 200 mL) de muestra se demostró a escala de banco de laboratorio ejecutando la diafiltración de una solución de IgG policlonal de 67 g/L a través de un sistema TFF de recirculación estándar en una variedad de flujos de alimentación utilizando uno o dos dispositivos de membrana, dispuestos en serie o en paralelo, y determinando el tiempo, el área de membrana y las pasadas de bomba que serían necesarias para lograr 8 diavolumenes de intercambio de amortiguador.

45 El compromiso entre el área de la membrana, los pasos de la bomba y el flujo de alimentación en función del flujo de alimentación se muestra en la FIGURA 5 para los dispositivos en paralelo y en la FIGURA 6 para los dispositivos en serie. El tiempo total de funcionamiento de la configuración paralela fue de 13,33 horas/día, frente a las 3 horas de un sistema de diafiltración por lotes equivalente, con una reducción de 4,4 veces la superficie. La determinación de un área y un flujo de alimentación óptimos para la diafiltración se muestra en el recuadro rectangular de la FIGURA 5. Los detalles del proceso para un sistema equivalente de diafiltración por lotes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Línea de base del proceso por lotes

Volumen del biorreactor	200	L	
Volumen del buque por día	1	Vvd	
Título	1,5	g/L	
Rendimiento de purificación	85%	%	
Concentración de proteínas Alimento final UFDF	20	g/L	
Volumen de alimentación	12,75	L	
Horas diarias de funcionamiento de la UFDF	20	hrs	*supone un tiempo inactivo de 4 horas al día

ES 2 995 480 T3

flujo de alimentación SPTFF I	0,64	L/h	*o 10,6 ml/min
Concentración de proteínas fuera del SPTFF I	67	g/L	*en función de la concentración óptima actual de proteínas (C_{opt})
flujo de alimentación al sistema DF	3,2		
Volumen de alimentación a DF	190		*o 0,190 L
			*suponga un tiempo de llenado de 1 hora
Superficie instalada	0,22	m ²	*para el estudio actual
Tiempo de proceso	3	Hrs	
Flujo de permeado a 6 Imm	29,2	LMH	
Volumen del lote	3,8	L	
Volumen DF para 10 DV	38,1	L	
Área requerida	0,4345	m ²	
Flujo de alimentación	6	Imm	
Pases de bomba	123	Pases	

Una superficie de membrana baja que funcione en flujo en serie o en paralelo con flujos de alimentación inferiores a las recomendaciones típicas para el procesamiento por lotes permite procesar de 2 a 4 veces más kg/m² al día con 0,3-0,6 del número de pasadas de bomba que se requieren normalmente. Ejemplo 2: Recuperación de productos

Se evaluó la recuperación de producto tanto en modo directo (salida al contenedor de recogida de producto sin ciclo, FIGURA 7) como en modo inverso (vuelta al contenedor de recirculación del mismo ciclo, FIGURA 8) para cuantificar el porcentaje de recuperación alcanzable frente al grado de dilución del amortiguador necesario para la recuperación.

El rendimiento fue superior al 98% en las cuatro configuraciones, con una dilución de la concentración de proteínas de aproximadamente un 30-50%. Estos datos se muestran en la tabla. 2.

Tabla 2. Recuperación de producto de cuatro configuraciones con $2 \times 0,11\text{m}^2$ de pantalla Pellicon® 3 Ultracel 30kD C y concentración de DF = 67 g/L

Configuración de la membrana	Dirección de recuperación	Recuperación (%)	Concentración en la piscina (g/L)
En paralelo	Adelante	98,3%	48,9
En paralelo	Reversa	98,2%	46,56
Serie	Adelante	98,2%	59,65
Serie	Reversa	98,2%	43,9

El balance de masas indicó que quedaba en el tanque < 1% de proteína residual de un ciclo, que podía limpiarse fácilmente para drenar dentro de la ventana de tiempo disponible, de modo que el arrastre al ciclo siguiente no sería una preocupación.

Ejemplo 3: Rendimiento y coherencia del proceso

Se demostró el rendimiento y la consistencia del proceso durante cuatro ciclos consecutivos de la configuración del tanque de 2 ciclos que se muestra en la FIGURA 9, sin limpieza entre ciclos. Las etapas de cada ciclo se indican en el cuadro 3. Los resultados se muestran en las FIGURAS 10-15.

Tabla 3. Diafiltración cíclica continua por etapas

Paso	Punto final	Duración del escalonado	Tasa de flujo (ml/min)	Comentarios
8 DV diafiltración	Amortiguador de diafiltración =8 DV (1520 ml)	~32,5 minutos	220 ml/min (1 Imm)	Aumentar a 10 DV añadirá ~8 minutos aumentando el tiempo total de DF a 38 minutos. El volumen de permeado fue mayor = 8 DV DF

ES 2 995 480 T3

Paso	Punto final	Duración del escalonado	Tasa de flujo (ml/min)	Comentarios
				+ retención de amortiguador inicial del sistema (~85 ml) = ~1600ml
Recuperación del tanque	El tanque está totalmente llovido	~3 minutos	50 ml/min	
Recuperación del amortiguador	Recuperación total Tanque + recuperación de amortiguador = 290 ml/min	~3 minutos	50 ml/min	Punto final basado en la dilución mínima para la recuperación >98 % de los estudios de recuperación
Limpieza del amortiguador	190 ml (1 DV)	~4 minutos	50 ml/min	
Duración total del ciclo		42,5 minutos		50,5 minutos para 10 DV

El flujo de alimentación, la presión del retentado, el nivel del tanque y la adición de amortiguador de diafiltración (DF) se controlaron con éxito según el punto de consigna a lo largo de los cuatro ciclos.

- 5 Los tiempos de ciclo, el número de diavolumenes, los rendimientos, las concentraciones finales de proteínas y los balances de masa fueron coherentes en los cuatro ciclos.

10 Como se refleja en las celdas de la FIGURA 14 con flechas, el contenedor utilizado en los experimentos tiene un labio que retiene aproximadamente 2 ml de volumen, que no se puede recuperar durante la recuperación del tanque. En este experimento, ese volumen no se recuperó tras los ciclos 1 y 2 y se arrastró a los ciclos 3 y 4, apareciendo así como residuo del tanque en los ciclos 3 y 4. Este volumen se recogió después de los ciclos 3 y 4. Para calcular el rendimiento del ciclo, el volumen recogido tras los ciclos 3 y 4 se sumó al de los ciclos 1 y 2. Los diseños de los tanques pueden optimizarse para mejorar la capacidad de drenaje o puede realizarse un método de recuperación por adición de amortiguador.

15 No se observó ninguna degradación en el flujo del proceso, a pesar de que no se realizó ninguna limpieza entre ciclos, lo que indica que probablemente el proceso podría mantenerse durante duraciones significativamente más largas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para filtrar una muestra líquida, que comprende:

5 dirigir un primer lote de una muestra líquida desde un contenedor de muestras (110) a un primer tanque de ciclado (102);
 tras llenar el primer tanque de ciclado (102), dirigir el primer lote de la muestra líquida desde el primer tanque de ciclado (102) a un ensamble de diafiltración (124) mediante un proceso de diafiltración continuo que incluye dirigir el retentado producido por la diafiltración del primer lote de la muestra líquida de vuelta a el primer tanque de ciclado (102) o, una vez alcanzado un punto final de diafiltración, dirigir el retentado al ensamble de filtración de concentración (144);
 10 durante la diafiltración del primer lote de la muestra líquida, dirigir un segundo lote de la muestra líquida desde el contenedor de muestras (110) a un segundo tanque de ciclado (104);
 tras llenar la segunda tanque de ciclado (104), dirigir el segundo lote de la muestra líquida desde la segunda tanque de ciclado al ensamble de diafiltración (124) mediante el proceso de diafiltración continua que incluye dirigir el retentado producido por la diafiltración del segundo lote de la muestra líquida de vuelta a la segunda tanque de ciclado (104) o, una vez alcanzado un punto final de diafiltración, dirigir el retentado al ensamble de filtración de concentración (144);
 15 dirigir un flujo de solución amortiguadora al retentado que retorna al primer o segundo tanque de ciclado (102, 104); y
 seguir alternando el llenado y la diafiltración continua de los lotes y el vaciado de la muestra líquida entre la primera (102) y la segunda (104) tanques cíclicas hasta procesar un volumen total de producto, en el que el proceso de diafiltración continua incluye una etapa de filtración de flujo tangencial (TFF).

25 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra líquida se concentra antes de ser entregada al primer (102) o segundo (104) tanques de ciclado.

30 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además dirigir alternativamente el retentado de los lotes primero y segundo de muestra líquida a un tanque de retención antes (148) de entregar el retentado al ensamble de filtración de concentración.

35 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además filtrar alternativamente el retentado producido por diafiltración continua del primer lote de la muestra líquida y el retentado producido por diafiltración continua del segundo lote de la muestra líquida a través del ensamble del filtro de concentración (144) hasta recuperar un volumen total de producto.

40 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la limpieza de una de las primeras y segundas tanques de ciclado (102, 104) durante un proceso continuo de diafiltración en la otra de las primeras y segundas tanques de ciclado (102, 104).

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además lavar el ensamble de diafiltración (124) durante el llenado del primer o segundo tanque de ciclado.

45 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el proceso de diafiltración continua es un proceso de diafiltración de volumen constante o un proceso de diafiltración de volumen óptimo.

50 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además dirigir un tercer lote de la muestra líquida desde el contenedor de muestras a un tercer tanque de ciclado (106) y alternar el llenado y la diafiltración continua de lotes de la muestra líquida entre el primer, segundo y tercer tanque de ciclado (102, 104, 106) hasta que se recupere un volumen total de producto.

55 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además encaminar el tercer lote de la muestra líquida desde el tercer tanque de ciclado (106) a un segundo ensamble de diafiltración mediante un proceso de diafiltración continua que incluye encaminar el retentado producido por la diafiltración continua del tercer lote a la muestra líquida de vuelta al tercer tanque de ciclado (106) o al ensamble de filtración de concentración (144) para la recuperación del producto, en donde los ensambles de diafiltración están configurados para operar en paralelo.

10. Un sistema (100) para filtrar una muestra líquida, que comprende:

60 primera y segunda tanques de ciclado (102, 104);
 una primera válvula (132) configurada para dirigir un flujo de una muestra líquida al primer o segundo tanque de ciclado (102, 104);
 un ensamble de diafiltración (124);
 una segunda válvula (136) configurada para dirigir la muestra líquida al ensamble de diafiltración desde el primer o segundo tanque de ciclado;
 65 una bomba de diafiltración (152) en comunicación fluida con un depósito amortiguador de diafiltración (154) y los

depósitos de ciclado primero y segundo (102, 104), o en comunicación fluida con un conducto de fluido configurado para dirigir el retentado a los depósitos de ciclado primero y segundo (102, 104); una tercera válvula (134) configurada para dirigir un flujo de solución amortiguadora al retentado del ensamble de diafiltración que regresa al primer o segundo tanque de ciclado (102, 104); y un controlador (160) configurado para conmutar la primera válvula (132) para dirigir alternativamente la muestra líquida a uno de los tanques de ciclado primero y segundo (102, 104) mientras conmuta las válvulas segunda y tercera (136, 134) para dirigir la muestra líquida al ensamble de diafiltración (124) desde, y la solución de amortiguador al retentado que regresa a, el otro de los tanques de ciclado primero y segundo (102, 104) a través de un proceso de diafiltración continuo

en el que el ensamble de diafiltración (124) comprende un ensamble de filtración de flujo tangencial (TFF).

11. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además:

un ensamble de filtración de flujo tangencial de paso único (SPTFF) (114) corriente arriba de la primera y segunda tanques de ciclado (102, 104); o bien un ensamble de filtración de flujo tangencial de paso único (SPTFF) corriente abajo de los tanques de diafiltración primero y segundo.

12. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10 comprende además un depósito de retención (148) situado corriente abajo del primer y segundo tanques de ciclado (102, 104).

13. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además una tercera tanque de ciclado (106), en el que el controlador (160) está configurado además para ciclar lotes de la muestra líquida entre la primera, segunda y tercera tanques de ciclado (102, 104, 106) en el proceso de diafiltración continua en el ensamble de diafiltración (124).

14. El sistema de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además un segundo ensamble de diafiltración configurado para operar en paralelo con el primer ensamble de diafiltración (124), en el que el controlador (160) está configurado además para ciclar lotes de la muestra líquida entre el primer, segundo y tercer tanque de ciclado (102, 104, 106) en un proceso de diafiltración continuo en ambos ensambles de diafiltración.

15. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además una bomba de alimentación (122) en comunicación fluida con la primera y la segunda tanques de ciclado (102, 104) y el ensamble de diafiltración (124), en el que el controlador (160) está configurado además para controlar un flujo de la muestra líquida en la bomba de alimentación (122).

16. Un proceso para filtrar una muestra líquida, que comprende:

dirigir un primer lote de una muestra líquida desde un contenedor de muestras (110) a un primer tanque de ciclado (102);

tras llenar el primer tanque de ciclado (102), dirigir el primer lote de la muestra líquida desde el primer tanque de ciclado (102) a un ensamble de diafiltración (124) mediante un proceso de diafiltración continua que incluya dirigir el retentado producido por la diafiltración del primer lote de la muestra líquida de vuelta al primer tanque de ciclado (102) o, una vez alcanzado un punto final de diafiltración, dirigir el retentado a un contenedor de recuperación del producto (140);

durante la diafiltración del primer lote de la muestra líquida, dirigir un segundo lote de la muestra líquida desde el contenedor de muestras (110) a un segundo tanque de ciclado (104);

tras llenar el segundo tanque de ciclado (104), dirigir el segundo lote de la muestra líquida desde el segundo tanque de ciclado (104) al ensamble de diafiltración (124) mediante el proceso de diafiltración continua que incluye dirigir el retentado producido por la diafiltración del segundo lote de la muestra líquida de vuelta al segundo tanque de ciclado (104) o, una vez alcanzado un punto final de diafiltración, dirigir el retentado a un contenedor de recuperación del producto (140);

dirigir un flujo de solución amortiguadora al retentado que retorna al primer o segundo tanque de ciclado (102, 104); y

seguir alternando el llenado y la diafiltración continua de lotes y el vaciado de la muestra líquida entre el primer y segundo tanques de ciclado (102, 104) hasta procesar un volumen total de producto,

en el que el proceso de diafiltración continua incluye una etapa de filtración de flujo tangencial (TFF).

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el contenedor de recuperación del producto (140) es un contenedor de producto final para uso de un usuario final.

18. El sistema de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el controlador (160) está configurado además para controlar el suministro de la solución amortiguadora en función del flujo de la solución amortiguadora en la bomba de diafiltración, la vida del permeado, la concentración óptima de diafiltración o el nivel de cualquiera de los tanques

de ciclado.

DIBUJOS

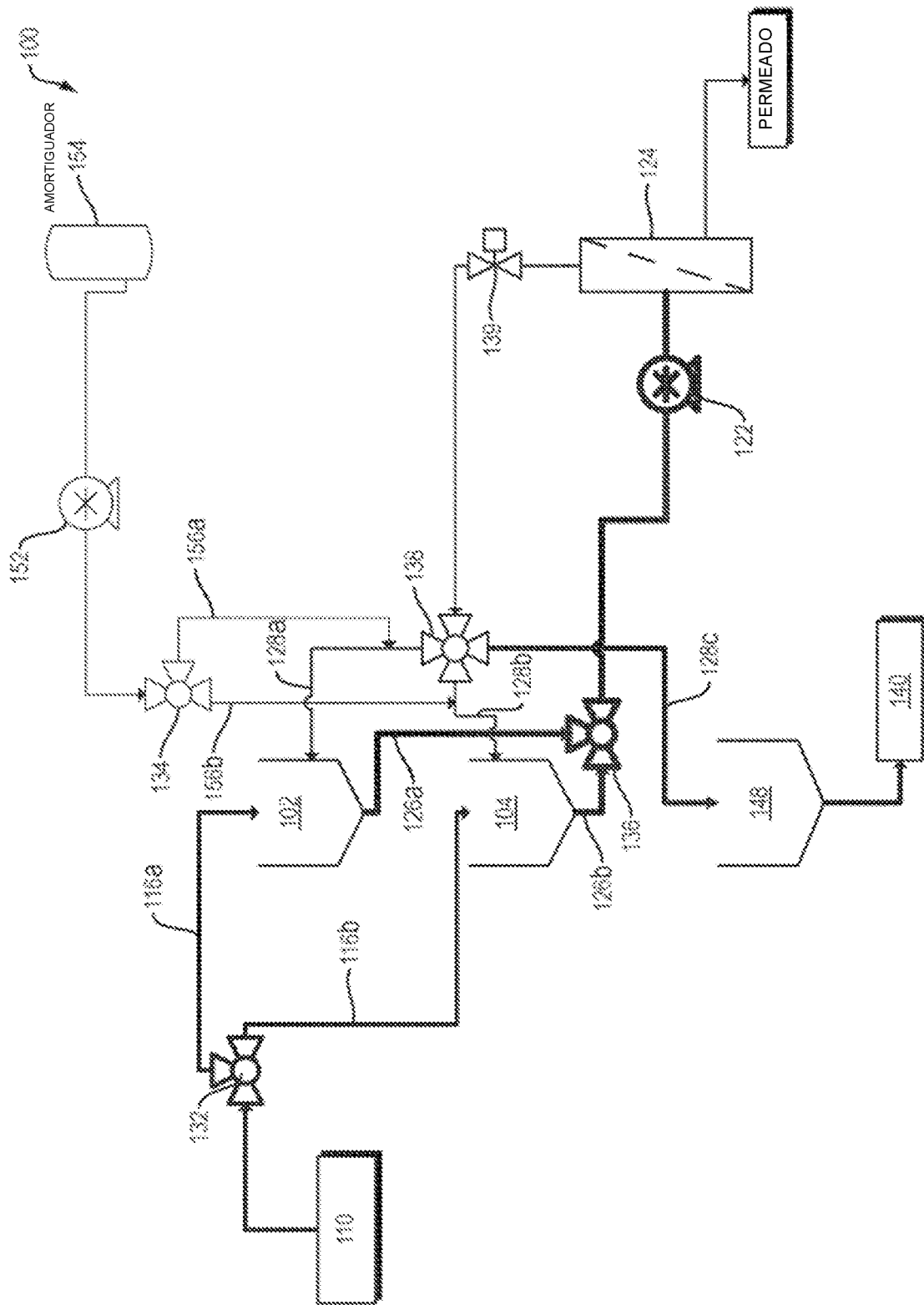


FIG. 1

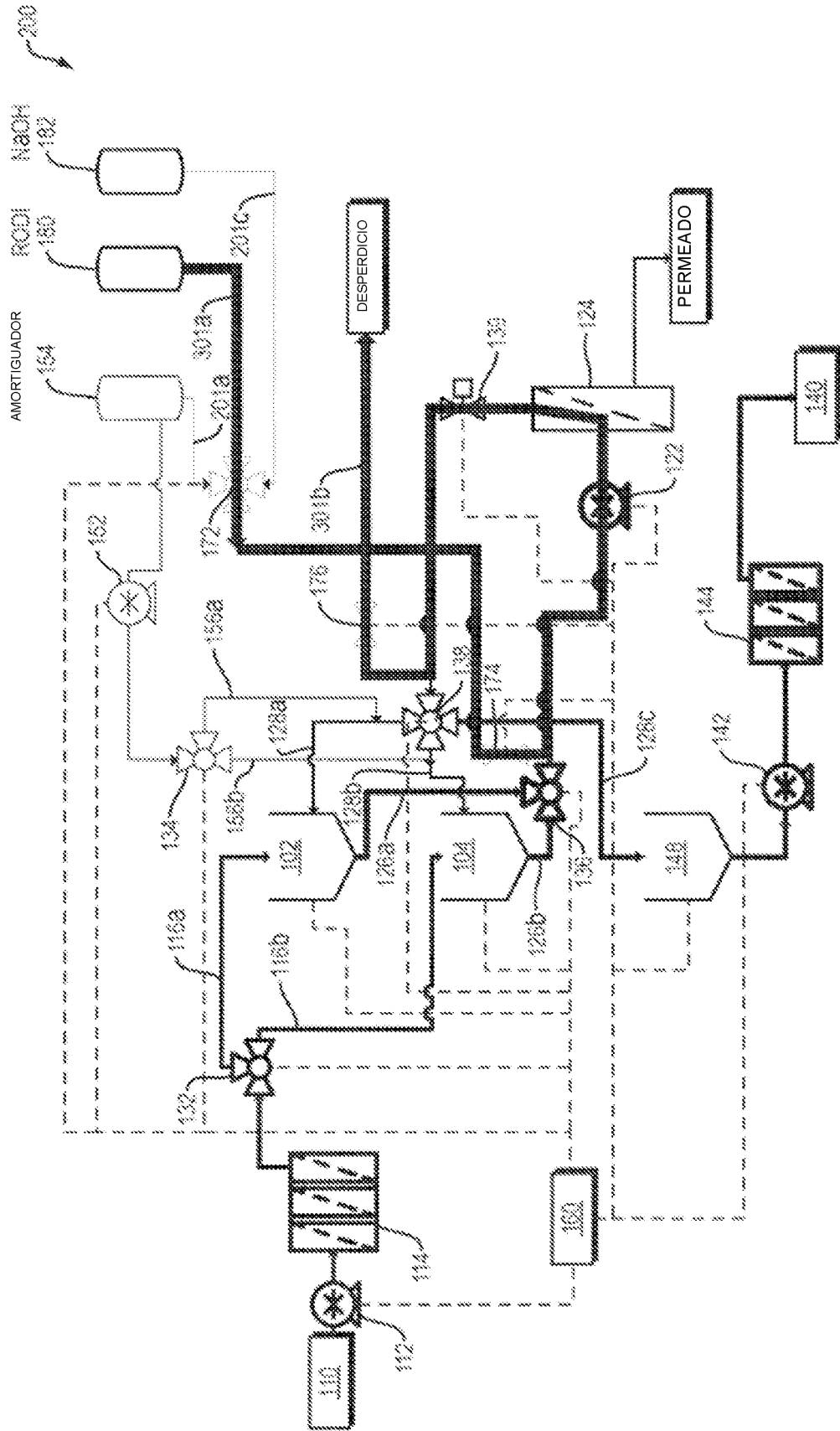


FIG. 3A

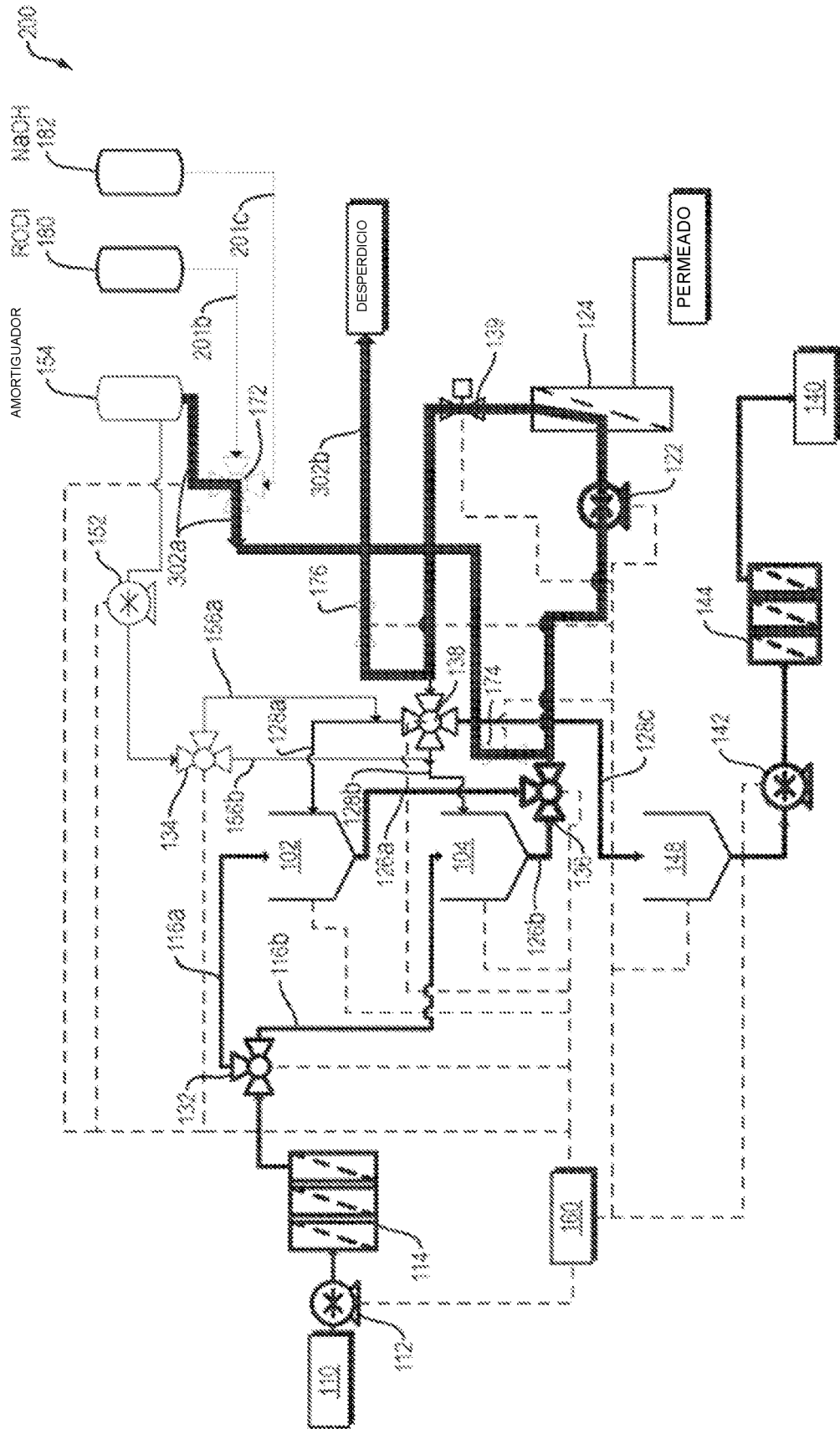


FIG. 3B

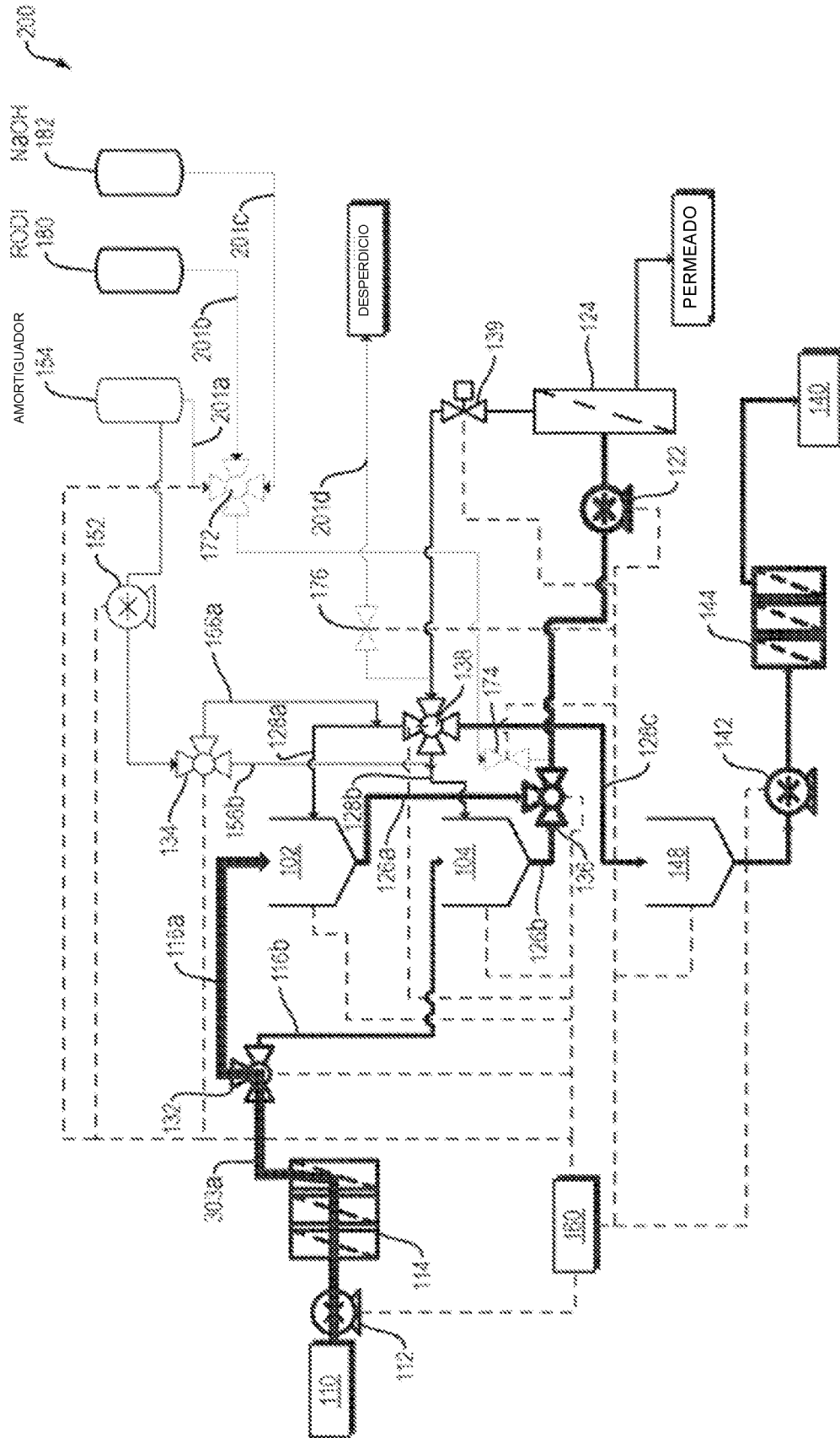


FIG. 3C

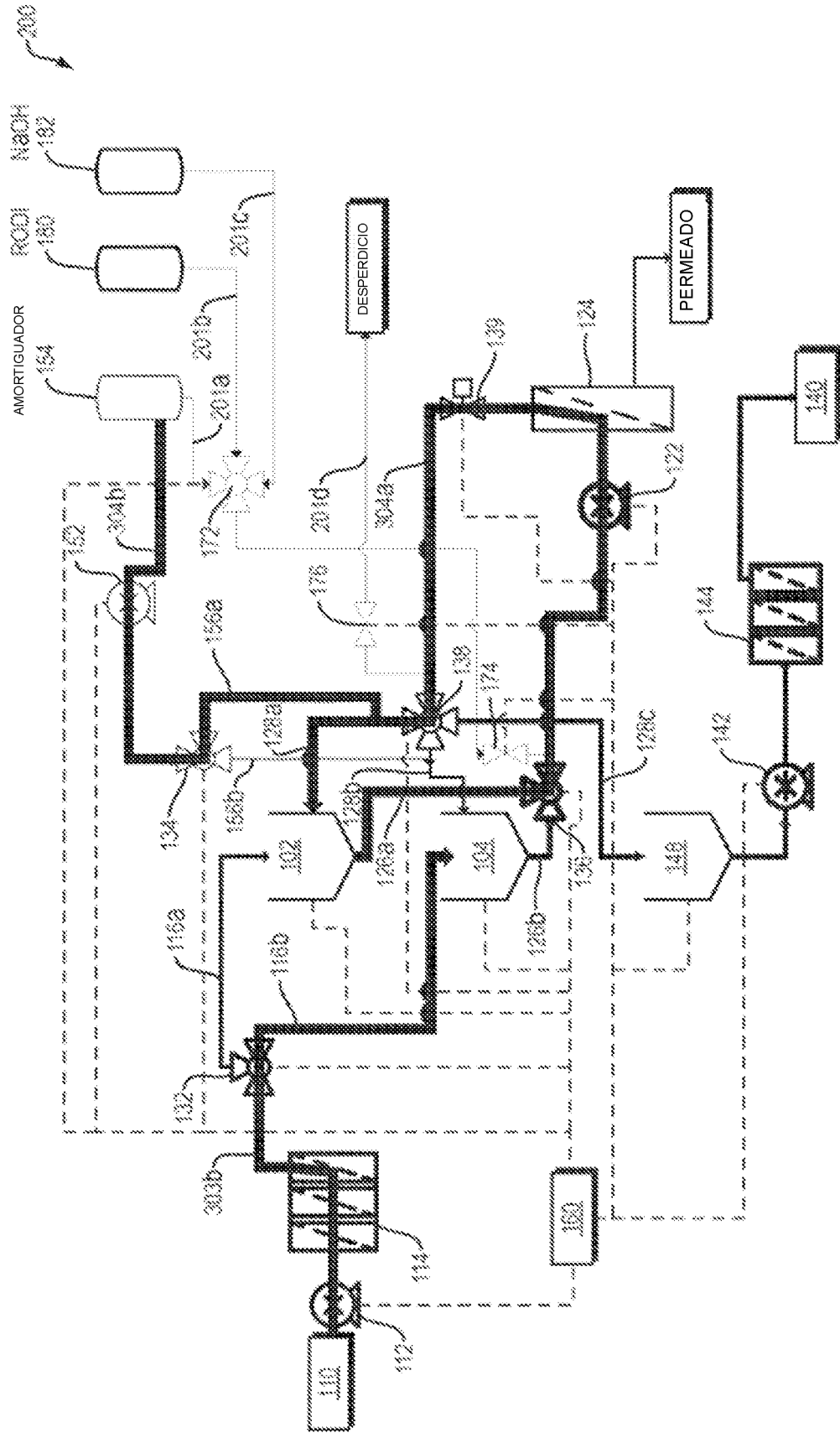


FIG. 3D

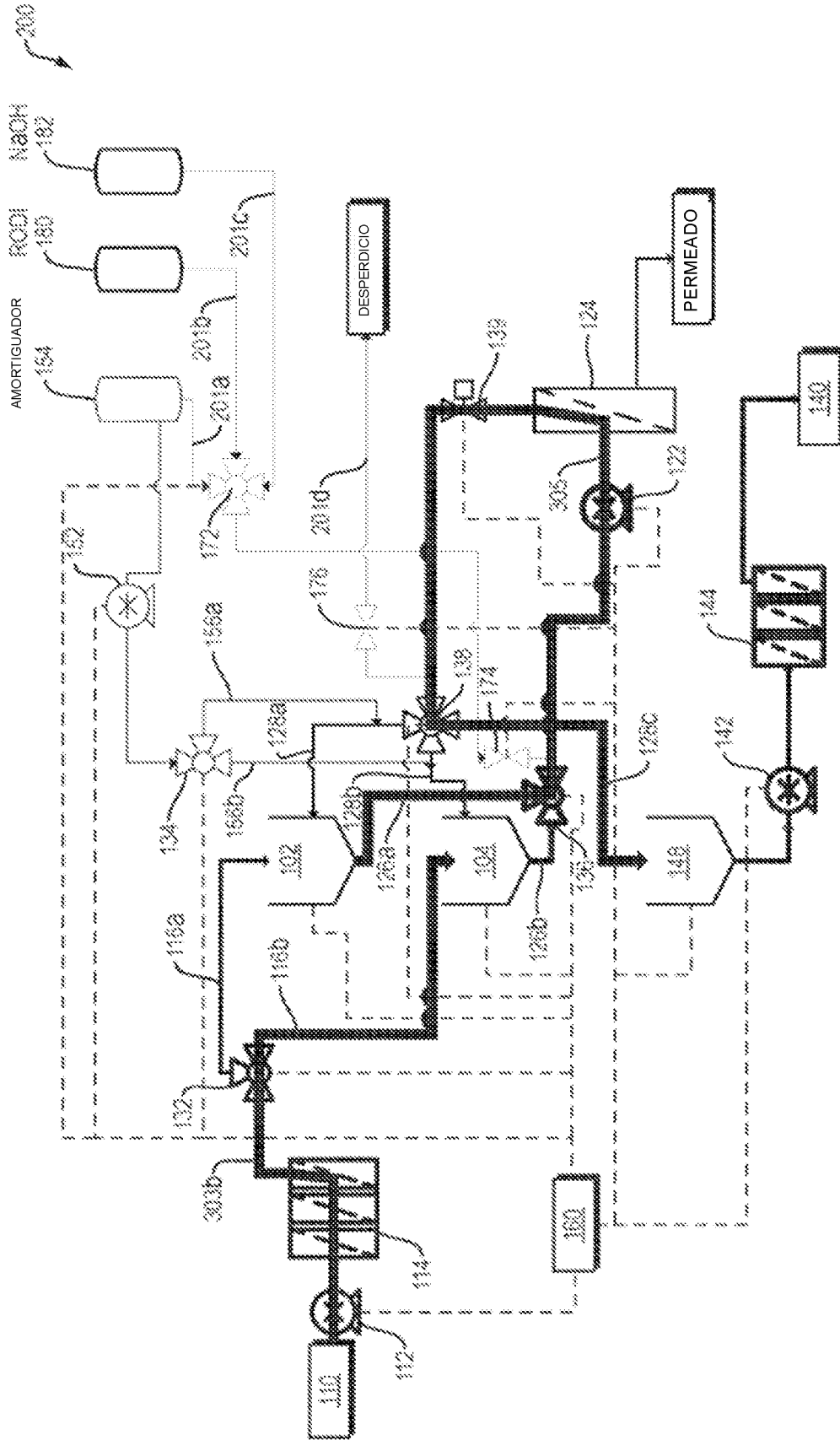


FIG. 3E

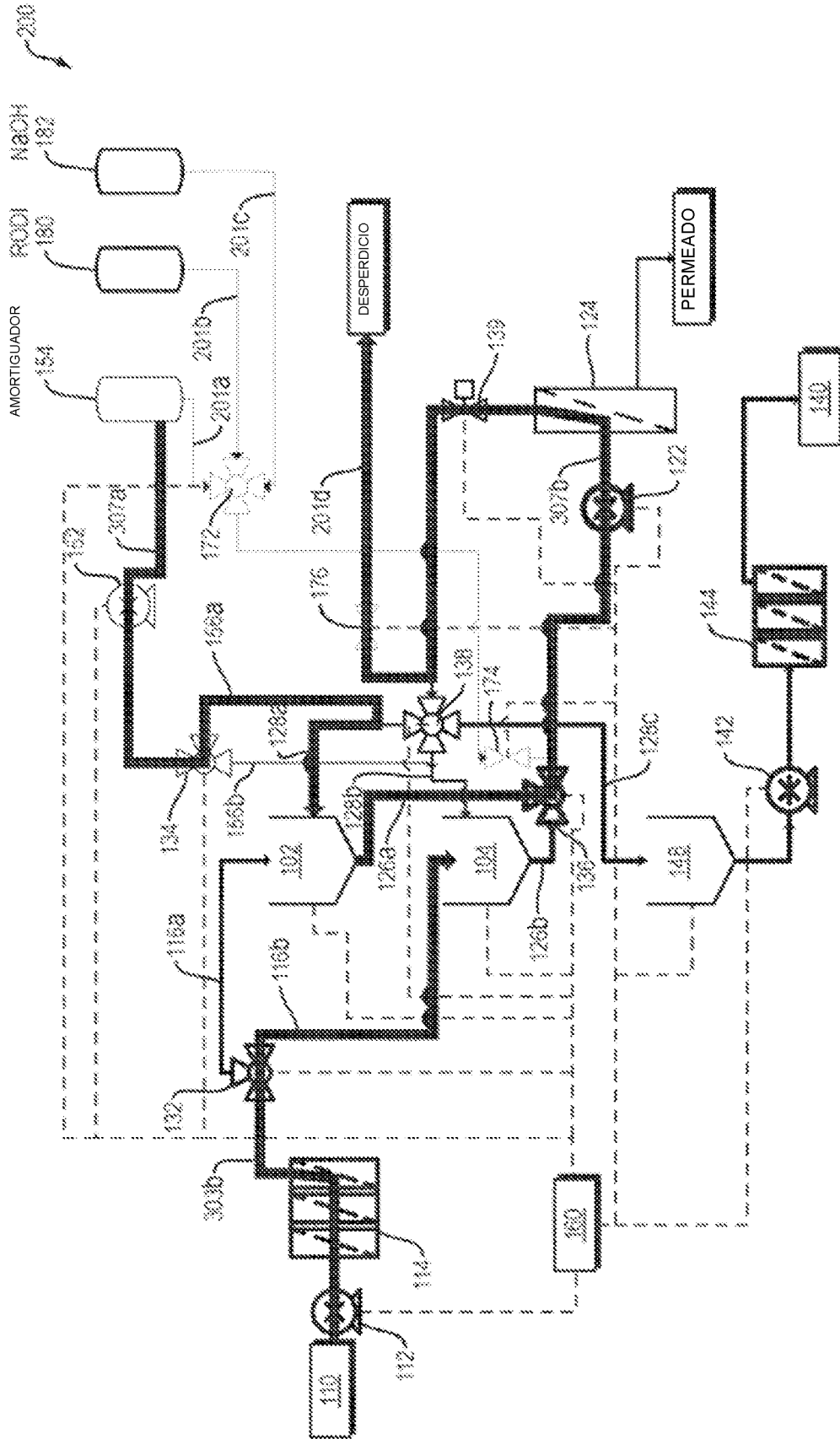


FIG. 3G

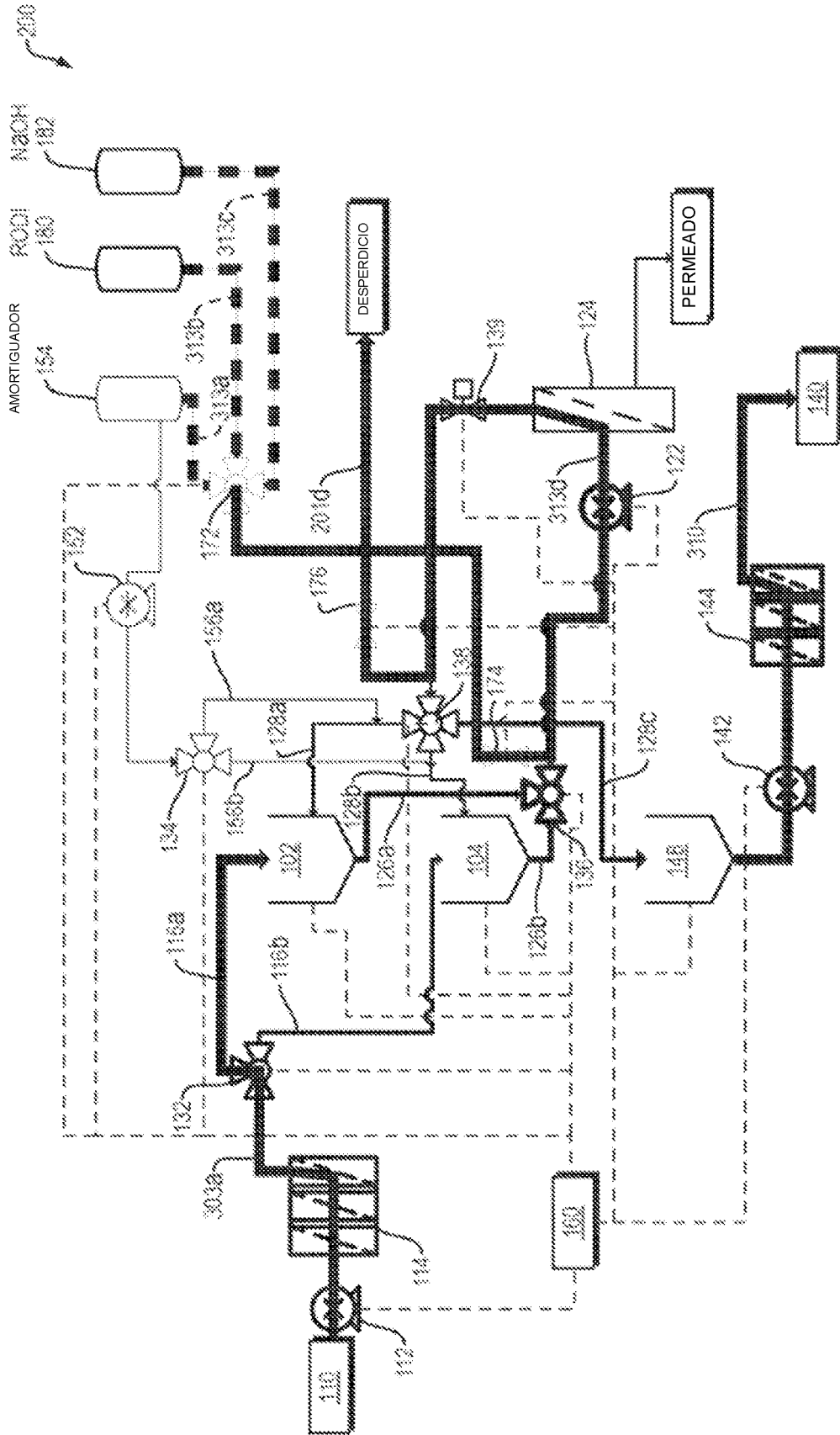


FIG. 3L

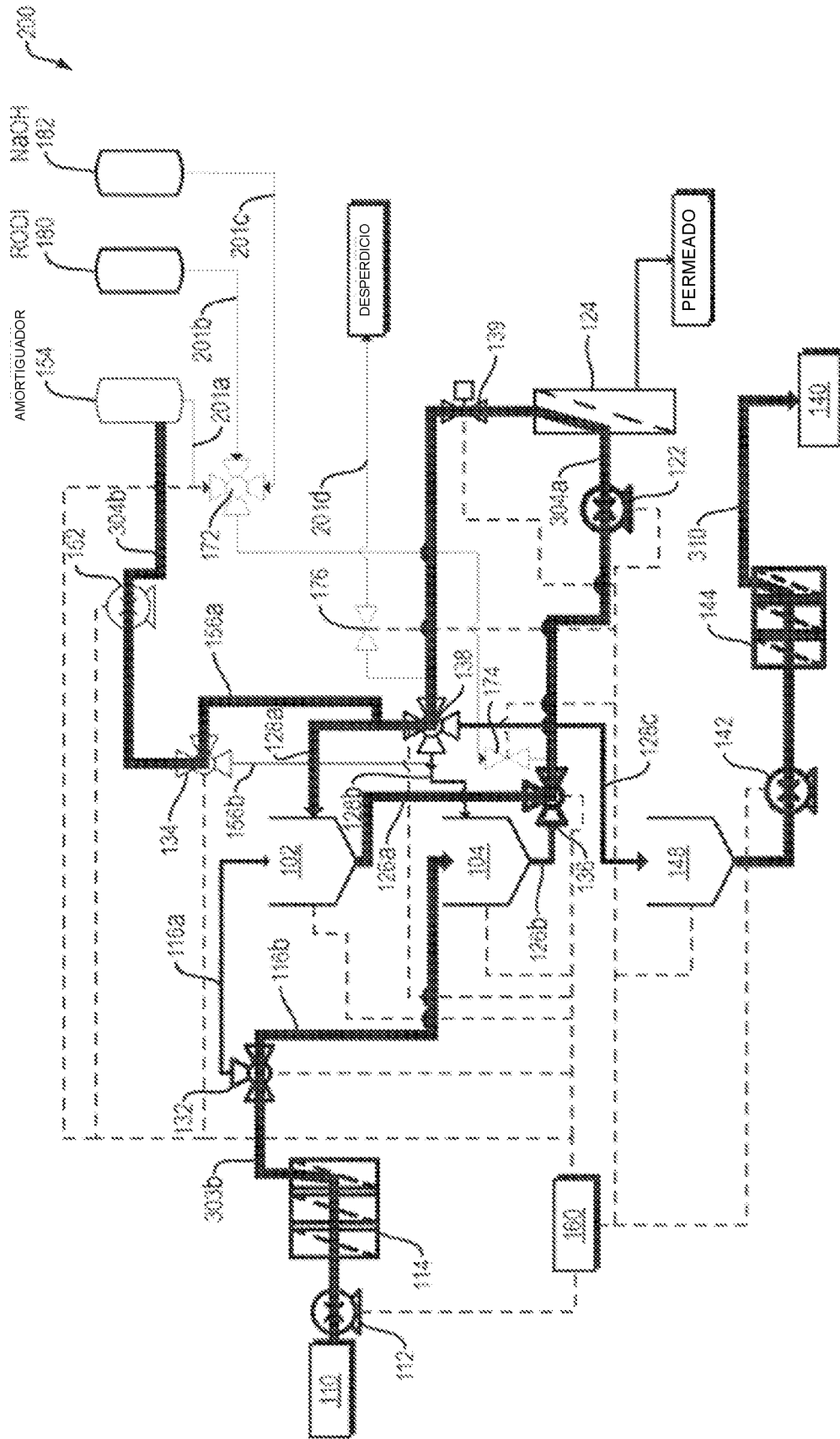


FIG. 3M

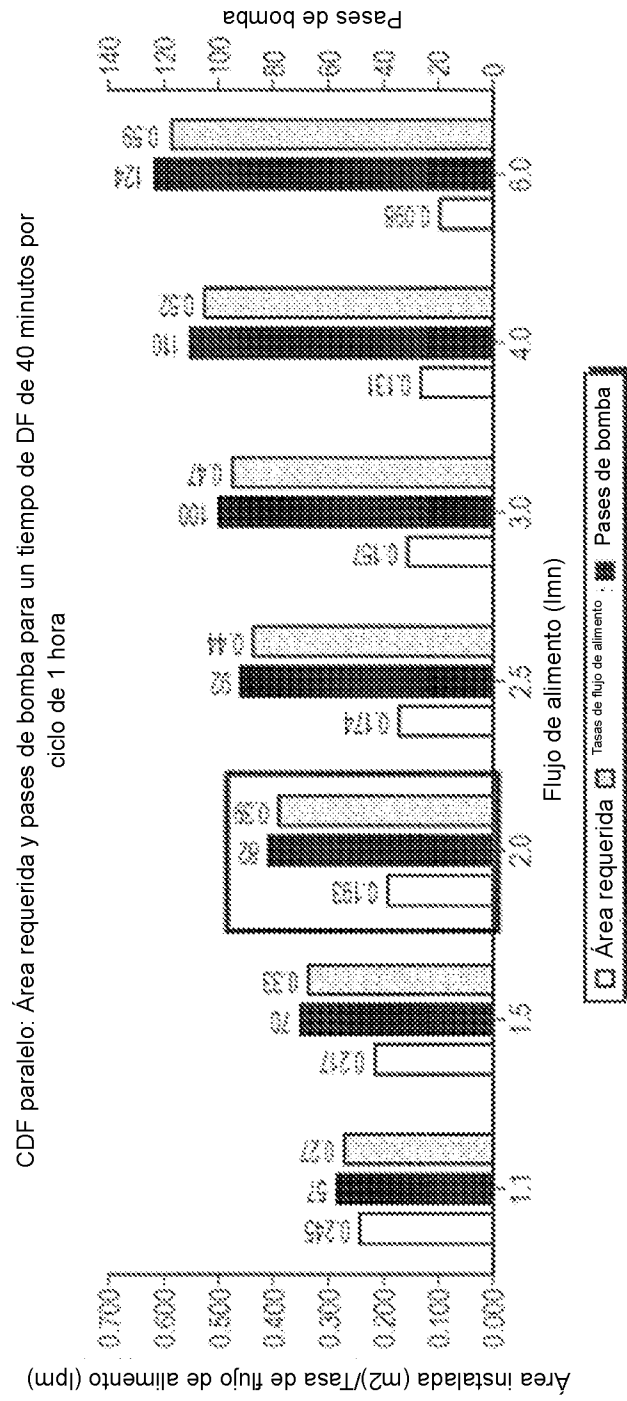


FIG. 5

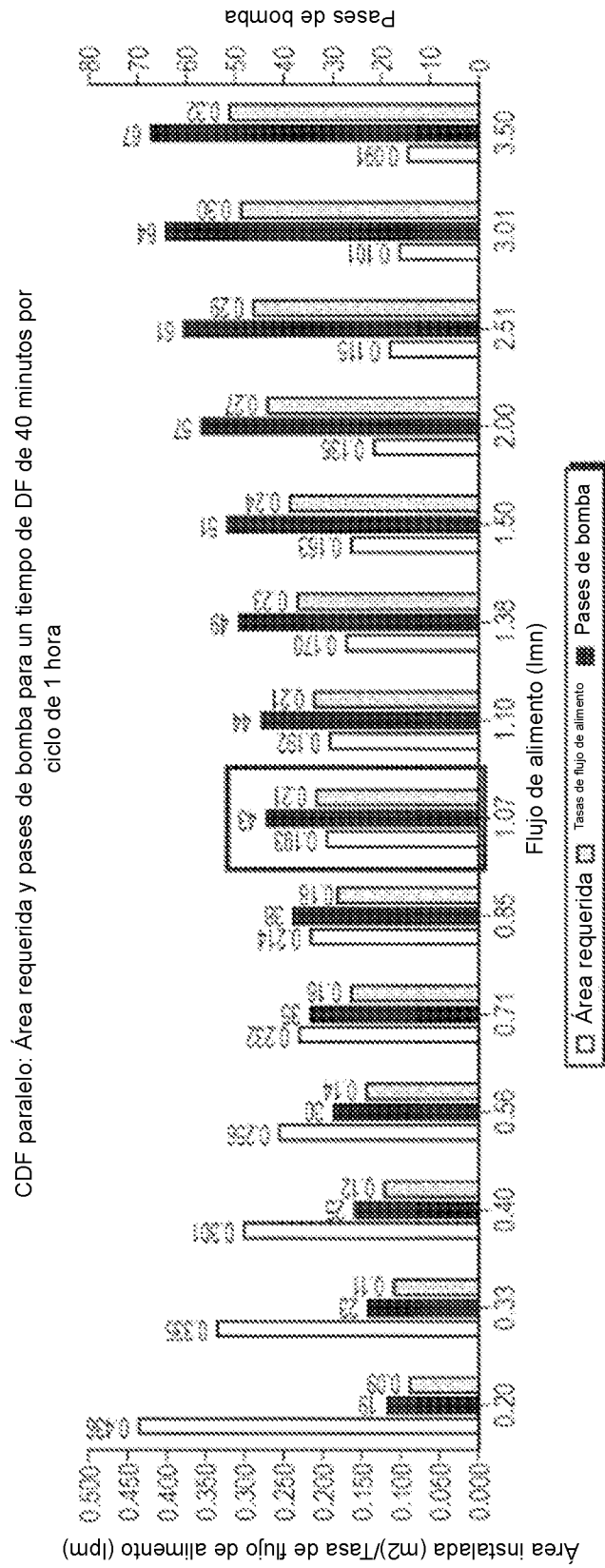


FIG. 6

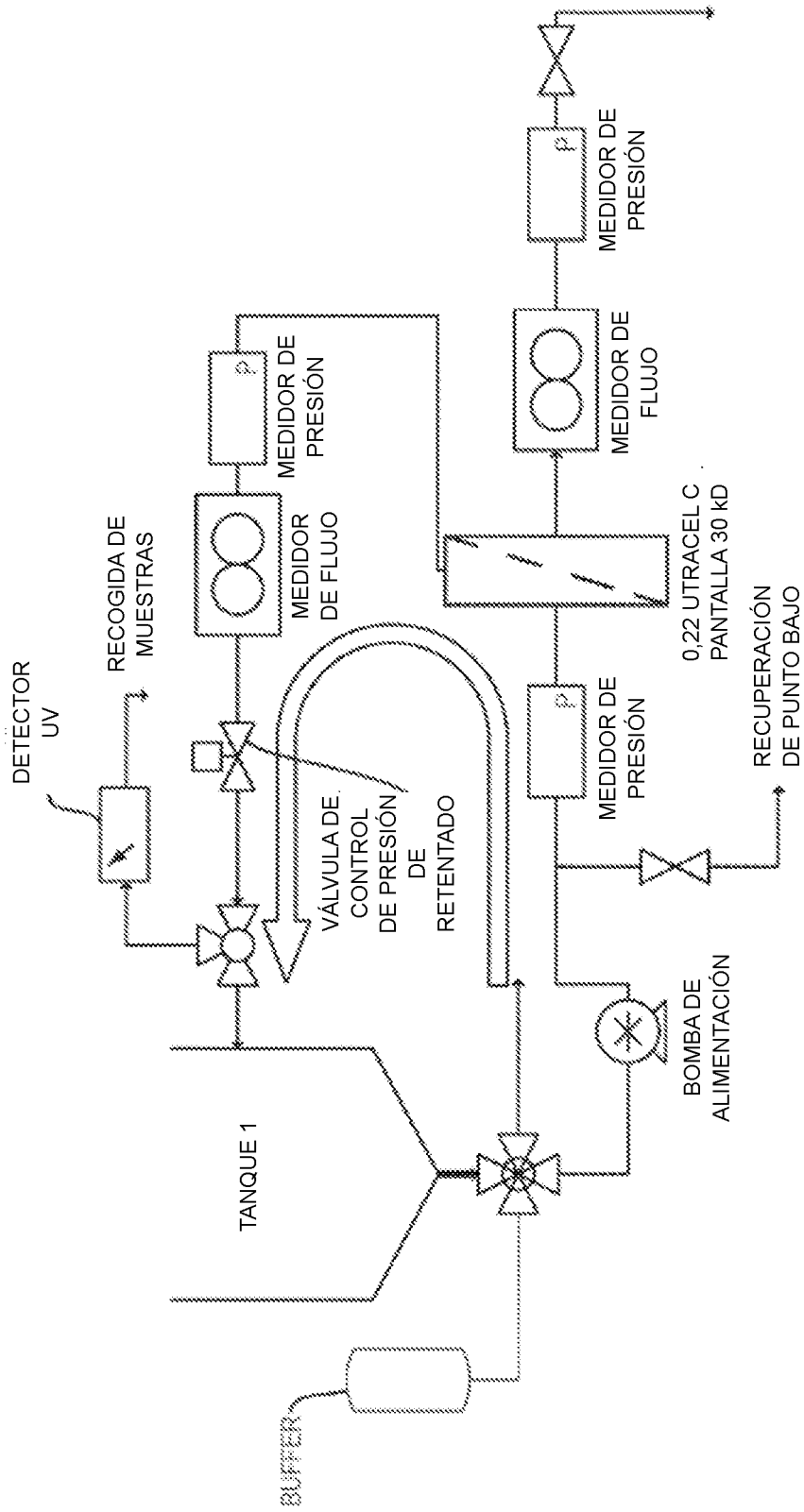


FIG. 7

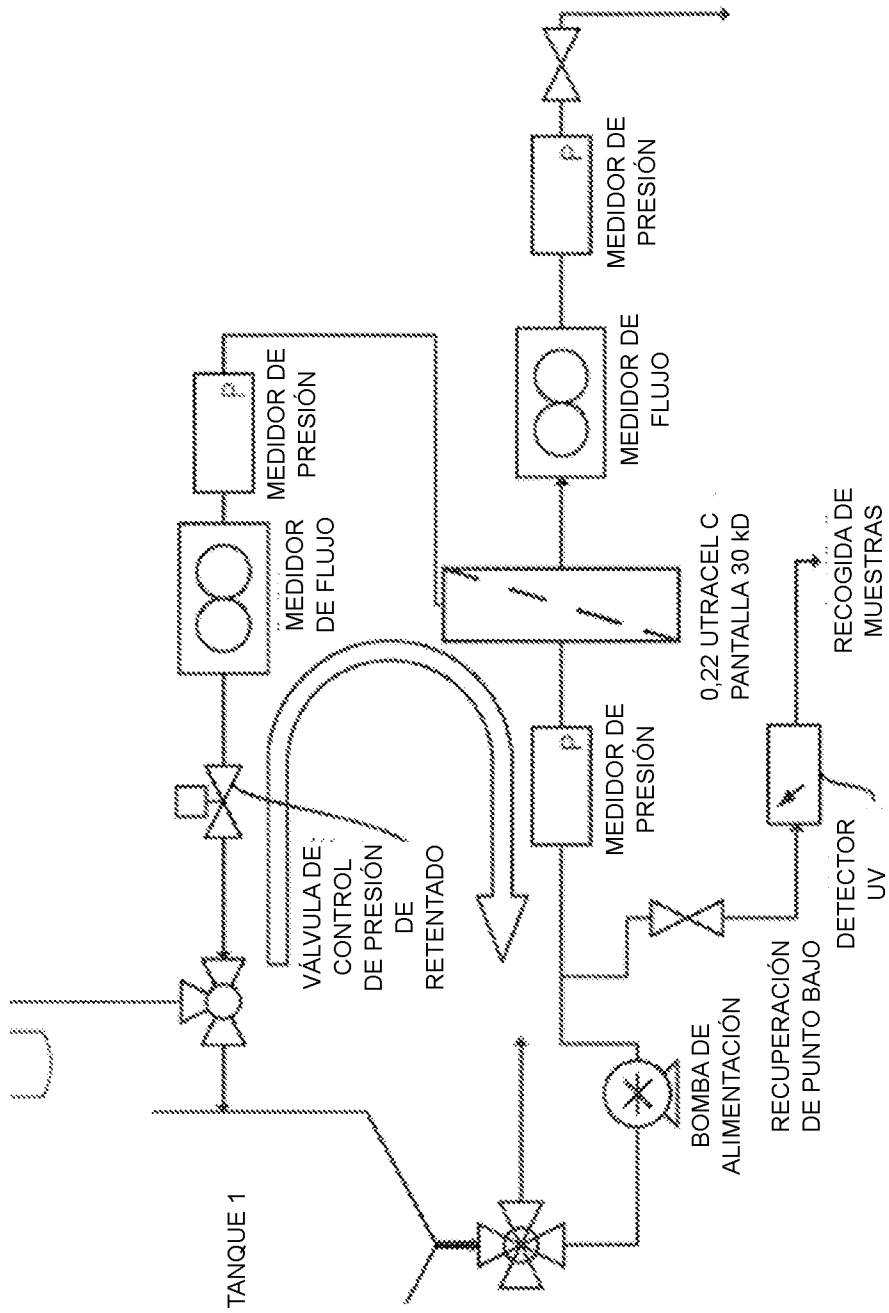


FIG. 8

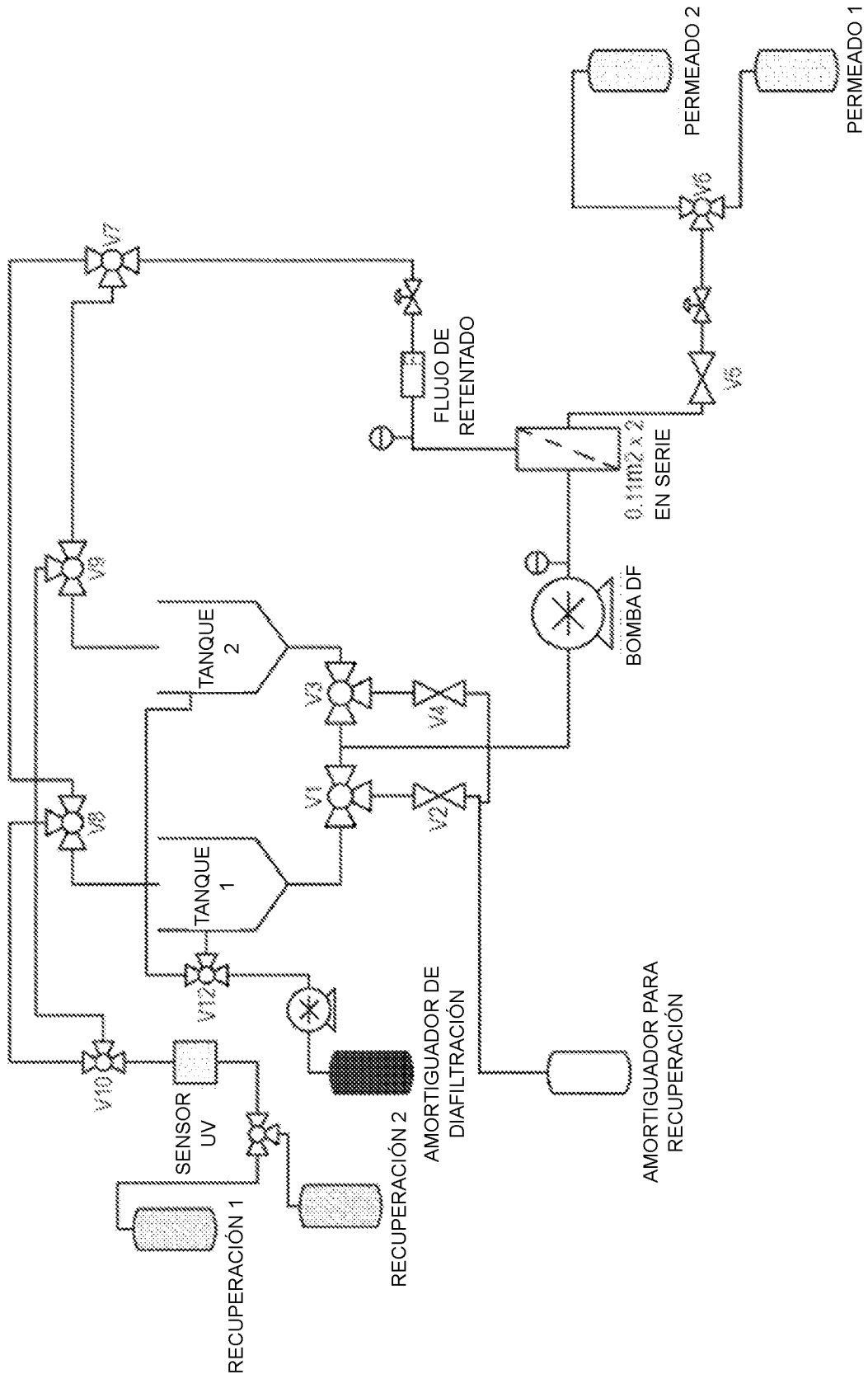


FIG. 9

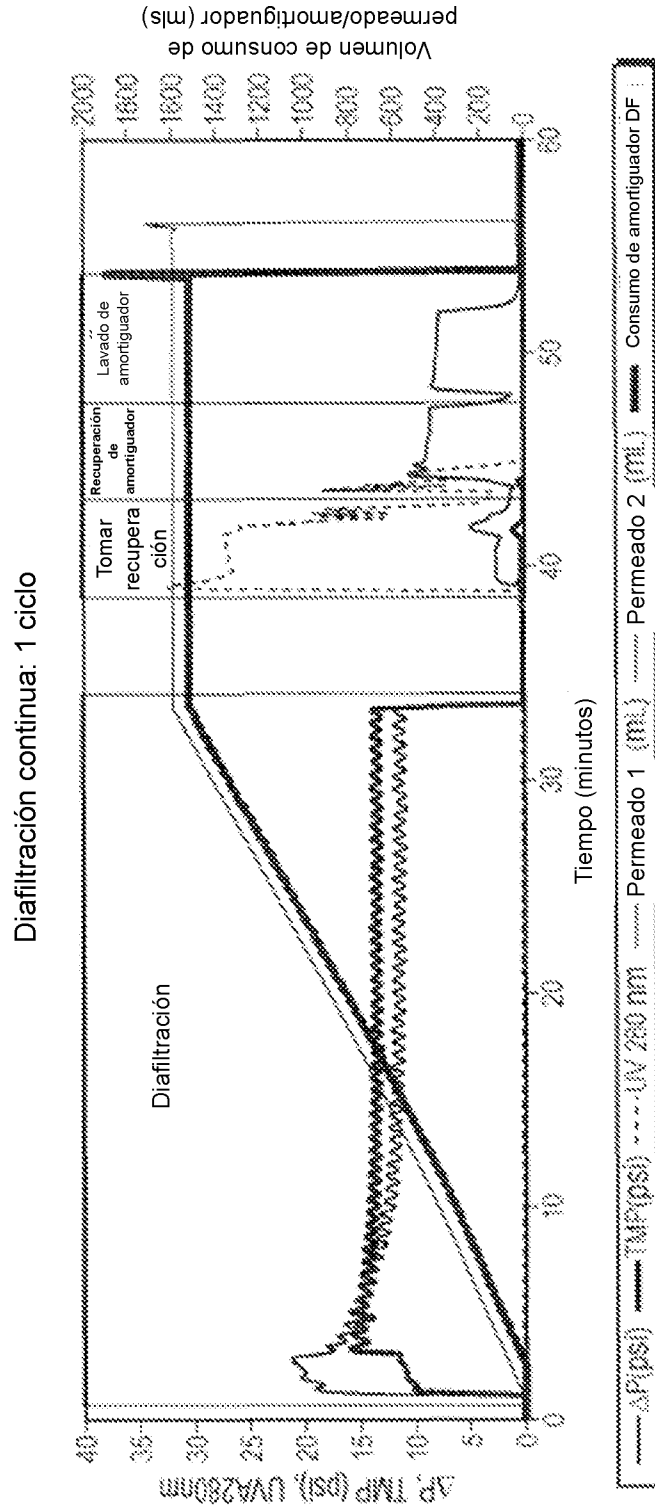


FIG. 10

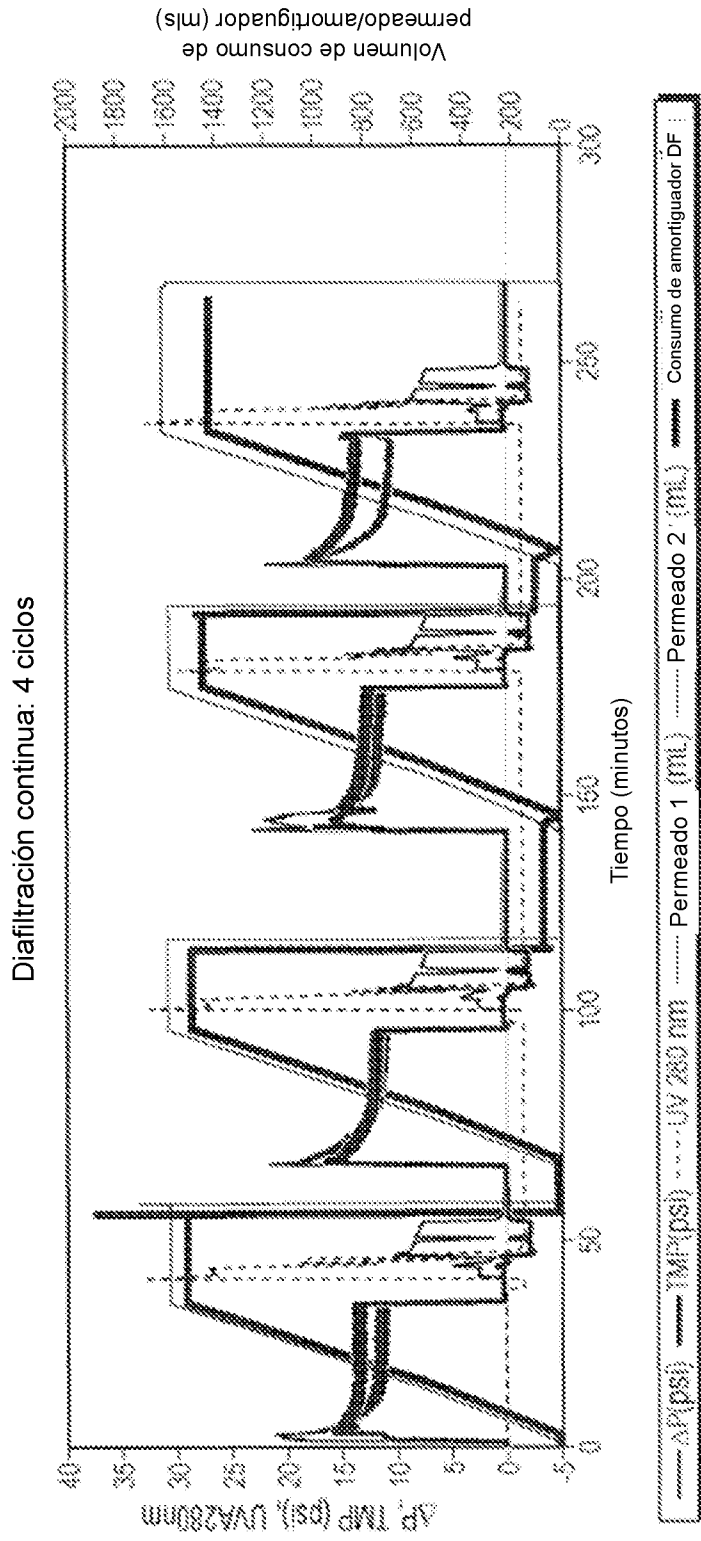


FIG. 11

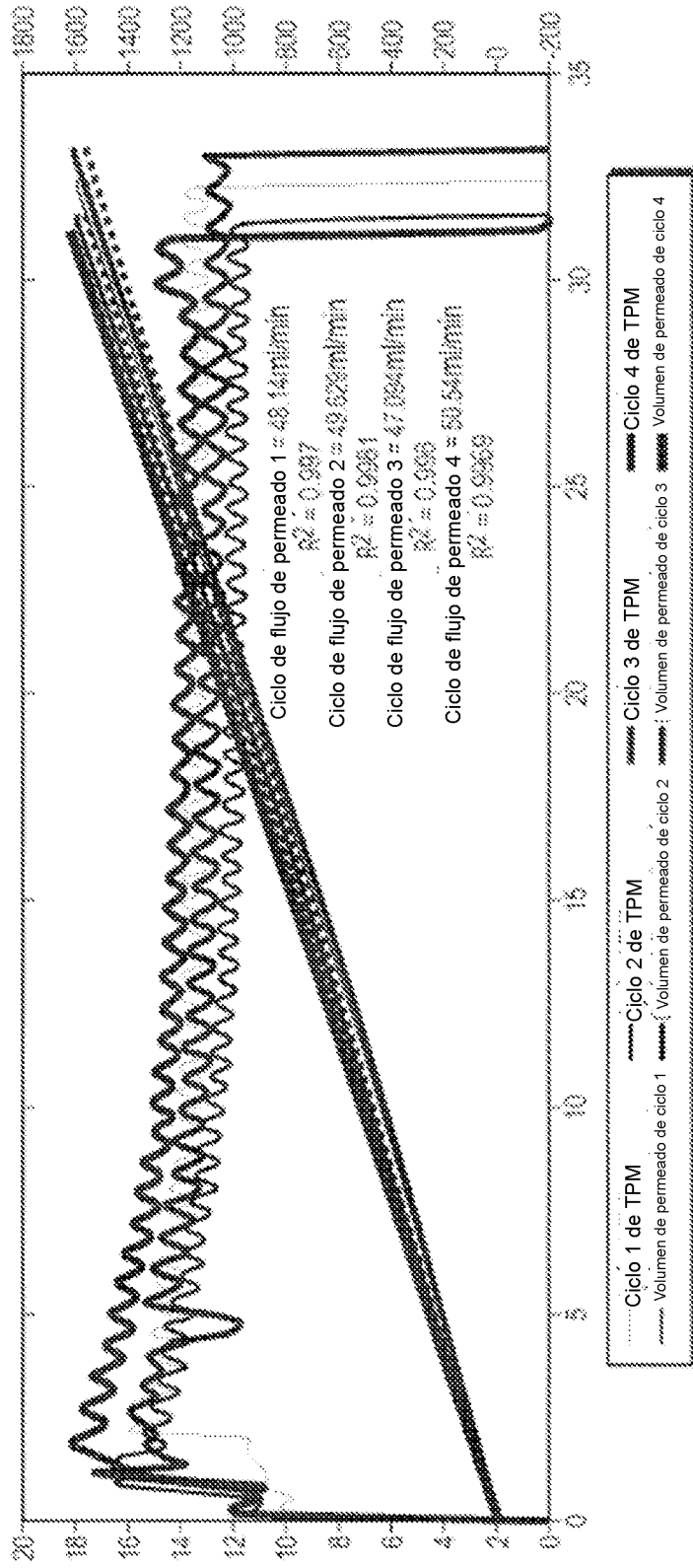


FIG. 12

Variables	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Tiempo de DF (min)	32.4	31.5	33.0	30.7
Volume de DF (L)	1520	1519	1525	1525
Volume de permeado (ml)	1611	1593	1614	1611
Retención de sistema	90	74	89	86
Flujo de permeado (LMH)	13.6	13.8	13.3	14.3
Flujo de alimentación (LMH)	60	60	60	60
Flujo de alimentación (lmm)	1	1	1	1
Conversion	23%	23%	22%	24%
TMP promedio (psi)	13.4	12.5	12.8	14.5

FIG. 13

Número de ciclo	Alimentación		Recuperación de producto (tanque+recuperación de amortiguador)		Residuo del tanque		Rendimiento (%)	Lavado de amortiguador		Permeado		Balance de masa
	Volume (ml)	Concentración (g/L)	Volume (ml)	Concentración (g/L)	Volume (ml)	Concentración (g/L)		Volume (ml)	Concentración (g/L)	Volume (ml)	Concentración (g/L)	
1	195.8	73.1	295.4	47.0	NA	NA	98.5%	197.6	0.21	1610.6	0.02	99.0%
2	195.5	73.1	296.1	47.1	NA	NA	99.0%	198.3	0.27	1593.1	0.03	99.6%
3	196.7	73.1	296.1	47.9	2	110.7	98.6%	193.8	0.20	1613.8	0.02	99.1%
4	196.2	73.1	294.9	48.0	2	104	98.7%	195.9	0.19	1610.7	0.03	99.2%

FIG. 14

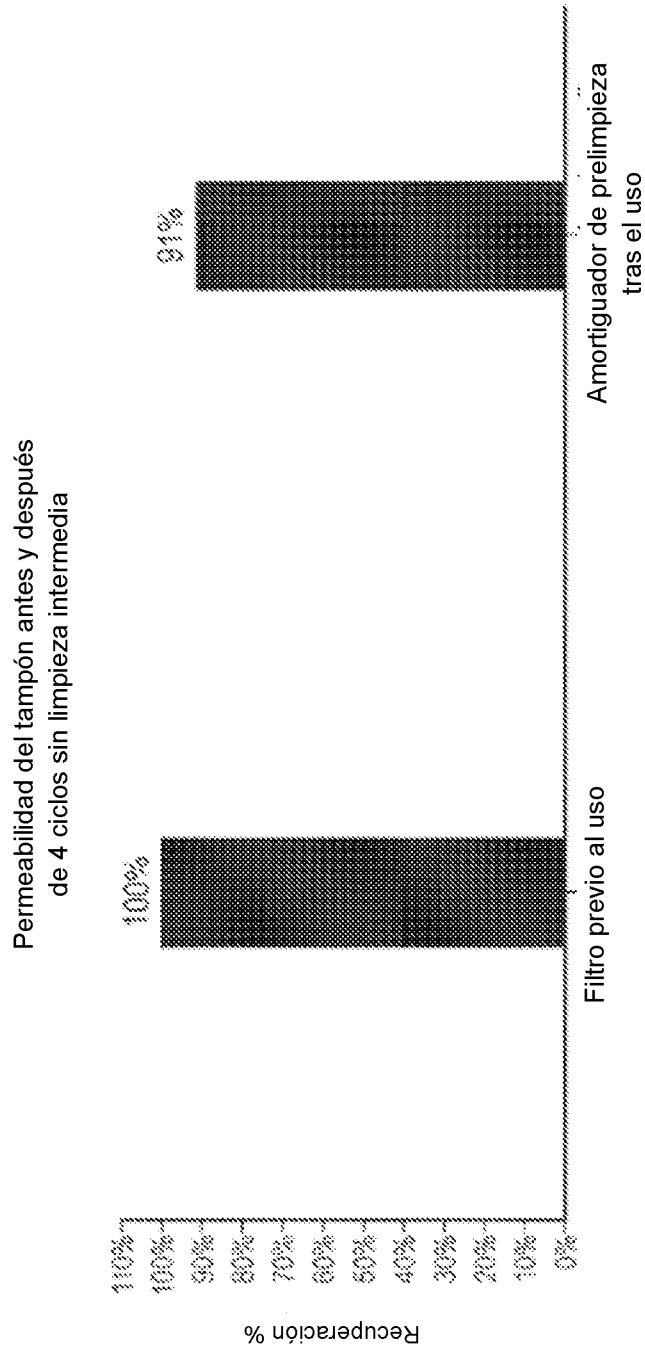


FIG. 15