

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 100**

51 Int. Cl.:

B01D 61/18 (2006.01)

B01D 61/20 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2016** **PCT/GB2016/053981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017** **WO17118836**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2016** **E 16816370 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2023** **EP 3400092**

54 Título: **Aparato y método para procesar soluciones de biomoléculas**

30 Prioridad:

07.01.2016 GB 201600290

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

03.06.2024

73 Titular/es:

**FUJIFILM DIOSYNTH BIOTECHNOLOGIES UK
LIMITED (100.0%)
Belasis Avenue
Billingham TS23 1LH, GB**

72 Inventor/es:

**HEISE, CHARLES y
NAGY, TIBOR**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 971 100 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

Aparato y método para procesar soluciones de biomoléculas

La presente invención se refiere a un método para procesar soluciones de biomoléculas, especialmente polipéptidos y ácidos nucleicos recombinantes, y a un aparato para realizar dicho método.

5 Muchas biomoléculas, especialmente polipéptidos y ácidos nucleicos recombinantes, tales como plásmido (ADNp), han atraído mucha atención, en particular para aplicaciones terapéuticas. Dichas biomoléculas se producen comúnmente mediante el cultivo de células huésped recombinantes que se han modificado genéticamente para expresar la biomolécula deseada. A continuación, la biomolécula se recupera desde el medio de cultivo mediante métodos que comprenden típicamente centrifugación, filtración y purificación cromatográfica. La recuperación de la biomolécula comprende
10 comúnmente el ajuste de la naturaleza y de las propiedades del medio líquido en el que se disuelve o se suspende la biomolécula. Este ajuste puede facilitar la purificación de la biomolécula al descartar las impurezas y/o la formulación de la biomolécula en un medio que puede almacenarse, por ejemplo, en espera de su uso o de su eventual conversión en una formulación lista para su uso. Dicho ajuste comprende comúnmente el reemplazo de un medio líquido, comúnmente un tampón, con otro, y puede implicar o no un cambio en el volumen, en cualquier caso, implicando potencialmente también
15 un cambio en la concentración de la biomolécula.

El intercambio de líquido convencional implica el paso de un medio inicial que comprende la biomolécula a través de un dispositivo de filtración de flujo tangencial con un filtro poroso de corte de peso molecular de tamaño apropiado, en el que el punto de corte se selecciona de manera que la biomolécula se retenga en la fracción retenida, pero de manera que una parte de los componentes más pequeños del medio, por ejemplo tampón, disolvente y solutos de peso molecular por
20 debajo del punto corte pasen a través del filtro a la fracción permeada. La fracción retenida se hace recircular a un depósito de retención donde la fracción retenida se mezcla con un reemplazo, y el proceso de recirculación continúa hasta que el medio que comprende la biomolécula tiene la composición deseada. La desventaja de dicho proceso es que, a medida que aumenta la escala de fabricación de la biomolécula, aumentan también los volúmenes de líquido que se requieren, y la escala de los depósitos de almacenamiento y de mezclado hasta el punto en que el tamaño y/o los costes del equipo son prohibitivos. Como una alternativa, puede emplearse diálisis, donde una bolsa porosa que tiene el punto de corte de peso molecular requerido se almacena en un gran volumen de medio líquido de reemplazo, pero esto adolece de desventajas similares.

Otras desventajas de los procesos convencionales son que el proceso es relativamente lento y, por lo tanto, ralentiza el procesamiento de la biomolécula. Además, puede darse inestabilidad y/o insolubilidad de las biomoléculas, tal como
30 agregación y desnaturalización, debido al paso repetido de las biomoléculas a través del cabezal de la bomba y a que experimentan fuerzas de cizallamiento en un amplio intervalo de concentraciones de soluto y tampón a medida que avanza el proceso.

El documento WO2015/164511 divulga aparatos y métodos para cromatografía tangencial en contracorriente, continua. El documento WO 2015/133972 divulga aparatos y métodos para la purificación de moléculas biológicas que comprenden combinaciones de subunidades de filtración y adsorción de flujo tangencial en un único aparato. El documento US4492531 divulga métodos para generar flujos pulsados para su uso en un aparato de tratamiento de sangre. El documento US2004/256329 divulga un aparato para el tratamiento de fluidos corporales con agentes de fotoinactivación. El documento US2015/183815 divulga aparatos y métodos que usan módulos de filtración de flujo cruzado para la dilución de materiales de partida viscosos. El documento US2007/151924 divulga métodos y aparatos para el procesamiento de un líquido
40 mediante un proceso de flujo tangencial de una sola pasada sin un bucle de recirculación.

Según la presente invención, se proporciona un aparato para el intercambio de líquido de un líquido que contiene biomoléculas que comprende:

a) un primer controlador de flujo de múltiples entradas y un primer dispositivo de filtración de flujo tangencial, en el que el primer controlador de flujo de múltiples entradas comprende:

- 45 i) una primera entrada para un primer medio líquido que comprende una biomolécula que comprende una válvula de entrada de flujo intermitente que previene el flujo en una primera posición, pero permite el flujo en al menos una segunda posición;
- ii) al menos una segunda entrada para un segundo medio líquido que comprende una válvula de entrada de flujo intermitente que previene el flujo en una primera posición, pero permite el flujo en al menos una segunda posición;
- 50 iii) una salida en conexión de fluido con el primer dispositivo de filtración de flujo tangencial; y
- iv) una unidad de control programable para regular la apertura y el cierre durante al menos 10 ciclos de las válvulas de entrada de flujo intermitente de manera que, durante la operación, solo esté abierta una válvula en un momento dado con el fin de conseguir que las cantidades relativas requeridas de los líquidos de entrada fluyan a través del controlador de flujo de múltiples entradas y con un período de tiempo o una frecuencia de ciclo predeterminados
55 según la proporción requerida del tiempo de ciclo para generar una composición deseada;

b) un segundo controlador de flujo de múltiples entradas y un segundo dispositivo de filtración de flujo tangencial, en el que el segundo controlador de flujo de múltiples entradas comprende:

i) una primera entrada que está en conexión de fluido con la fracción retenida del primer dispositivo de filtración de flujo tangencial;

5 ii) al menos una segunda entrada para un tercer medio líquido; y

iii) una salida en conexión de fluido con el segundo dispositivo de filtración de flujo tangencial; y

c) un medio para impartir el flujo de los líquidos a través de los controladores de flujo y los dispositivos de filtración de flujo tangencial.

10 En muchas realizaciones, cada dispositivo TFF empleado está configurado en modo de una sola pasada, en el que no se hace recircular ninguna parte de la fracción retenida.

Los medios para impartir el flujo de los líquidos son bien conocidos en la técnica, e incluyen la aplicación de presión de gas al líquido, especialmente un gas inerte, tal como nitrógeno o helio. Preferiblemente, los medios para impartir el flujo del líquido son una bomba. Las bombas que pueden emplearse incluyen bombas peristálticas, de diafragma, de lóbulos y centrífugas. Pueden emplearse diseños de bombas tanto desechables como reutilizables. Cuando se emplea una bomba, 15 en muchas realizaciones preferidas, la bomba está situada entre la salida del controlador de flujo de múltiples entradas y el dispositivo TFF. Pueden emplearse dos o más bombas, que pueden operar al mismo caudal o a caudales diferentes. En determinadas realizaciones, el mismo caudal conseguido por cada bomba puede conseguirse uniendo físicamente los cabezales de las bombas y usando el mismo tamaño de orificio de tubería o sincronizando las bombas para suministrar el mismo caudal a través de un control externo.

20 Los dispositivos TFF que pueden emplearse en el aparato son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Filtration in the Biopharmaceutical Industry, ed. T.H. Meltzer y M.W. Jornitz, 1998) e incluyen dispositivos de lámina plana, fibra hueca y enrollados anulares. Preferiblemente, el dispositivo TFF es un dispositivo de filtración de fibra hueca.

25 El dispositivo TFF se selecciona de manera que tenga un punto corte apropiado para la naturaleza de la biomolécula, de manera que la biomolécula no pase a través de una barrera, mientras que los componentes más pequeños del líquido puedan pasar a través de la barrera a la fracción permeada.

30 El controlador de flujo de múltiples entradas comprende dos o más válvulas de entrada, de flujo intermitente, que regulan el flujo de líquido a través del controlador de flujo. El controlador de flujo de múltiples entradas comprende al menos 2 válvulas de entrada y, en muchos casos, comprende hasta 8, tal como 3, 4, 5, 6 o 7, válvulas de entrada. Cada una de las válvulas de entrada puede tener las mismas dimensiones, o una o más de las válvulas de entrada pueden tener dimensiones diferentes. En determinadas realizaciones preferidas, el volumen medido desde cada válvula de entrada a la salida del controlador de flujo es el mismo para cada entrada, y es altamente preferible que tanto el volumen como la longitud de la trayectoria medida desde cada válvula de entrada a la salida del controlador de flujo sea la misma para cada entrada.

35 El controlador de flujo empleado en la presente invención comprende también al menos una salida y, aunque puede haber presentes dos o más salidas, es preferible que se emplee una única salida.

40 Las válvulas de flujo intermitente son controladas por una unidad de control programable, para regular la apertura y el cierre de las válvulas con el fin de conseguir que las cantidades relativas requeridas de los líquidos de entrada fluyan a través del controlador de flujo de múltiples entradas. Esto se consigue realizando ciclos, con un período de tiempo o frecuencia de ciclo predeterminados, a través de las válvulas de entrada en el controlador de flujo y regulando la apertura o cierre de la válvula según la proporción requerida del tiempo de ciclo para generar la composición deseada. La frecuencia de ciclo puede ser constante o variable. Más preferiblemente, se emplean válvulas de entrada de flujo intermitente, y se controlan de manera que, durante la operación, solo una válvula está abierta en un momento determinado. En muchas realizaciones, la frecuencia de ciclo del controlador de flujo de múltiples entradas se mantiene como una constante y las cantidades relativas deseadas de los líquidos de entrada permanecen constantes.

45 Se emplean al menos 10 ciclos. El número de ciclos empleados dependerá de numerosos factores, tales como la duración del proceso, el volumen de líquido que se concentra, el caudal, la máxima presión operativa del aparato, la longitud y/o el área del dispositivo TFF y el punto de corte de peso molecular para el dispositivo TFF. En ciertas realizaciones, pueden emplearse al menos 50, 100, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000, 7500, 10000 o más ciclos.

50 Se reconocerá que puede emplearse un intervalo de frecuencias de ciclo. En muchos casos, la frecuencia es inferior a 100 Hz, típicamente inferior a 50 Hz, comúnmente inferior a 10 Hz, y preferiblemente inferior a 5 Hz. En ciertas realizaciones preferidas, la frecuencia es de 2 Hz o menos, más preferiblemente de 1 Hz o menos, tal como de 0,05 a 0,5 Hz.

Durante la operación de un dispositivo TFF, es común que se forme una capa de gel que comprende biomoléculas en el lado de la fracción retenida de la superficie del filtro. Típicamente, esta capa de gel se elimina del dispositivo TFF mediante la inclusión de un enjuague al final de la operación, y dicha etapa de enjuague puede emplearse en el proceso de la

presente invención. Una etapa de enjuague al final de la operación puede resultar en un pico significativo en la concentración de biomolécula y, por lo tanto, puede resultar en una concentración de biomolécula más elevada de la esperada. En ciertas realizaciones de la presente invención, las etapas de enjuague se incluyen a intervalos a lo largo del proceso. Una etapa de enjuague puede comprender extender el período en el que el líquido pasa a través del dispositivo TFF a la presión más baja, y puede comprender además la prevención del flujo de fracción permeada, de manera que todo el flujo pase a la fracción retenida, tal como cerrando una válvula en la línea de fracción permeada, preferiblemente durante la duración del enjuague. La duración de una etapa de enjuague se selecciona frecuentemente para conseguir la transferencia de sustancialmente toda la capa de gel a la fracción retenida. Una etapa de enjuague al final de la operación puede comprender hacer pasar hasta cinco volúmenes de dispositivo TFF. Las etapas de enjuague incluidas a intervalos en el proceso pueden comprender el paso de volúmenes de dispositivo TFF más bajos, tales como 0,25, 0,5, 0,75 o 1 volúmenes de dispositivo TFF. En algunas realizaciones, se emplea una etapa de enjuague después de la operación de realización de ciclos para el paso de 1 volumen de dispositivo TFF, 2 volúmenes de dispositivo TFF, 5 volúmenes de dispositivo TFF, 10 volúmenes de dispositivo TFF o más, seguida de un retorno a la operación de realización de ciclos. En muchas realizaciones en las que se incorporan una o más etapas de enjuague a intervalos en el proceso de concentración, la etapa de enjuague viene acompañada por la prevención del flujo de fracción permeada, tal como cerrando una válvula en la línea de fracción permeada, preferiblemente durante la duración del enjuague.

El aparato comprende comúnmente un limitador, tal como un orificio limitador de flujo o una válvula de pinzamiento aguas abajo del dispositivo TFF. El limitador está configurado para proporcionar una restricción de flujo y, por lo tanto, una contrapresión, de manera que el líquido y los solutos con pesos moleculares menores que el punto de corte de peso molecular del dispositivo TFF pasen a través de la membrana a la fracción permeada. Preferiblemente, el limitador comprende una válvula de pinzamiento que, según un aspecto de la presente invención, puede ser controlable. En ciertas realizaciones, el limitador comprende un segundo controlador de flujo de múltiples entradas, que comprende preferiblemente válvulas de flujo variable. En algunas realizaciones, el limitador comprende una bomba aguas abajo del dispositivo TFF que está configurada para operar a un caudal menor que el caudal en el dispositivo TFF, generando de esta manera una contrapresión.

Cuando el limitador comprende un segundo controlador de flujo de múltiples entradas que comprende válvulas de flujo variable, se emplean preferiblemente ciclos. Los tiempos y las frecuencias de ciclo empleados pueden ser tal como se han descrito anteriormente para el primer controlador de flujo de múltiples entradas que comprende válvulas de flujo variable.

El aparato según el segundo aspecto de la presente invención comprende opcionalmente un mezclador en línea, que puede estar situado entre la válvula y el concentrador, y que está situado preferiblemente entre la válvula y la bomba. Los ejemplos de mezcladores en línea son bien conocidos en la técnica. Los mezcladores en línea preferidos son mezcladores estáticos, tales como mezcladores con deflectores y mezcladores de vórtice. La dimensión del mezclador se selecciona preferiblemente de manera que los líquidos de entrada se mezclen adecuadamente antes de su entrada al dispositivo TFF.

Se reconocerá que la combinación de los líquidos a través del controlador de flujo diluye la concentración de la biomolécula en el primer líquido. La extensión de esta dilución es controlada por los volúmenes relativos de los líquidos que pasan a través de las entradas y, a su vez, estos están controlados por las dimensiones relativas de las entradas y/o los tiempos relativos durante los que las entradas se mantienen a su mayor caudal y su menor caudal. La dilución de la biomolécula efectuada por el mezclado de los líquidos puede ser al menos parcialmente compensada, y puede ser completamente compensada, o incluso más que compensada por el paso de los líquidos combinados a través del dispositivo TFF. El aparato puede estar configurado de manera que la parte relativa de los líquidos combinados que pasan a través del dispositivo TFF como fracción retenida sea mayor, igual o menor que la parte que pasa a la fracción permeada. Cuando la relación del volumen del líquido que pasa a la fracción permeada al volumen que pasa como fracción retenida es igual a la relación del volumen de los líquidos segundo y adicionales combinados al volumen del primer líquido que comprende la biomolécula, la concentración de biomolécula en la fracción retenida será la misma que la concentración inicial en el primer líquido. Un aumento de la relación de volumen de la fracción permeada a la fracción retenida de manera que sea mayor que la relación de volumen de los líquidos segundo y adicionales al primer líquido aumentará la concentración de biomolécula en la fracción retenida con relación a la concentración en el primer líquido, mientras que una reducción de la relación de volumen de la fracción permeada a fracción retenida de manera que sea menor que la relación de volumen de los líquidos segundo y adicionales al primer líquido disminuirá la concentración de biomolécula con relación a la concentración en el primer líquido. Por ejemplo, cuando el primer líquido que comprende una biomolécula se diluye 10 veces con un segundo líquido mediante el uso de una relación 1:9 del primer líquido al segundo líquido, y a continuación la relación de volumen de la fracción permeada a la fracción retenida es 9:1, la biomolécula vuelve a su concentración original, consiguiéndose un aclaramiento del 90% $[(10-1)/10 \times 100]$ del primer líquido. La repetición de este proceso en una segunda etapa de intercambio proporcionaría un aclaramiento del 99% del primer líquido $[9((10 \times 10) - 1)/(10 \times 10) \times 100]$ pero conservaría la concentración original de la biomolécula. Sin embargo, si la relación de volumen de la fracción permeada a la fracción retenida es 19:1 en los concentradores y la dilución se mantiene en 1:9, la concentración de biomolécula se incrementaría dos veces mediante una primera etapa con el mismo aclaramiento del 90% del primer líquido, y cuatro veces mediante una segunda etapa con el mismo aclaramiento del 99% del primer líquido, mientras que si la relación de volumen de la fracción permeada a la fracción retenida es 4:1 en los concentradores y la dilución se mantiene en 1:9, la concentración de biomolécula se reduciría dos veces mediante una primera etapa con el mismo aclaramiento del 90% del primer líquido, y cuatro veces mediante una segunda etapa con el mismo aclaramiento del 99% del primer líquido.

En muchas realizaciones, la relación de volumen del primer líquido a los líquidos segundo y posteriores que fluyen a través

del controlador de flujo se controla controlando los tiempos de apertura de las válvulas de flujo intermitente controlables que regulan el flujo de los líquidos relevantes. Preferiblemente, una bomba situada aguas abajo del controlador de flujo controla el caudal a través del controlador de flujo y, cuando las trayectorias de flujo de las válvulas a la salida son de igual volumen, los volúmenes relativos están gobernados por los tiempos de apertura de las válvulas. En igualdad de condiciones, cuanto menor sea el tiempo durante el que la primera válvula de líquido está abierta con relación a las otras válvulas, mayor será el intercambio por los líquidos segundo y adicionales.

Un segundo dispositivo TFF está situado aguas abajo del primer dispositivo TFF. En muchos de estos casos, el controlador de flujo de múltiples entradas para el segundo dispositivo TFF sirve como un limitador para el primer dispositivo TFF. Otros dispositivos TFF, preferiblemente configurados según la presente invención, pueden estar situados aguas abajo del segundo dispositivo TFF. Para el segundo dispositivo TFF o dispositivos TFF adicionales configurados según la presente invención empleados, una entrada para el controlador de flujo de múltiples entradas está en conexión de fluido, preferiblemente en conexión directa, con la fracción retenida desde el dispositivo TFF aguas arriba. Para el segundo dispositivo TFF o dispositivos TFF adicionales configurados según la presente invención, la entrada para el segundo medio líquido correspondiente puede comprender una entrada para el mismo medio líquido que para el primer dispositivo TFF, o puede comprender una entrada para un medio líquido diferente.

El aparato según la presente invención puede emplearse para el acondicionamiento de soluciones o suspensiones de biomoléculas, por ejemplo, corrientes de alimentación, tal como para el cambio de la conductividad y/o el pH, el intercambio de tampón, el cambio de los solutos constituyentes y el cambio de los volúmenes para alterar, y preferiblemente reducir, el tiempo de procesamiento de la operación de la unidad aguas abajo, por ejemplo, los tiempos de carga para la cromatografía. En determinados casos, el aparato según la presente invención puede usarse para el replegamiento de polipéptidos o para la extracción de ADNp.

Usando el aparato según la presente invención, puede conseguirse el intercambio de líquidos sin recirculación de la fracción retenida.

Los líquidos empleados en la presente invención pueden ser eluyentes procedentes de métodos de purificación (por ejemplo, columnas de cromatografía, etapas de TFF convencionales, etapas de filtración y clarificación, sobrenadante/concentrado o suspensiones de centrifugación, etapas de acondicionamiento/dilución), salida desde biorreactores y fermentadores, y salida desde procesos de ruptura celular.

Los líquidos producidos por el aparato y por los procesos de la presente invención pueden usarse "tal cual" sin procesamiento adicional, o pueden someterse a una o más etapas de procesamiento adicionales, tales como etapas de purificación o de procesamiento, por ejemplo, etapas de cromatografía, tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad; y/o etapas de filtración, clarificación, acondicionamiento, dilución u otras etapas de formulación adicionales.

El aparato según la presente invención puede emplearse para la concentración de líquidos que comprenden biomoléculas, por ejemplo, ADNp, cuerpos de inclusión, particularmente cuerpos de inclusión que comprenden polipéptidos, y especialmente polipéptidos recombinantes.

El ADNp puede estar en una o más de entre múltiples formas, tales como isoformas superenrolladas, lineales y circulares abiertas (es decir, con hebras abiertas o relajadas). La isoforma de ADNp superenrollada tiene una forma circular cerrada covalentemente y el ADNp se superenrolla negativamente en la célula huésped por la acción de los sistemas enzimáticos del huésped. En la isoforma circular abierta, una cadena del dúplex de ADNp está abierta en uno o más sitios.

Los métodos para la producción de ADNp son bien conocidos en la técnica. El ADNp puede ser natural o artificial, por ejemplo, vectores de clonación que portan insertos de ADN exógeno. En muchas realizaciones, el tamaño del ADNp está comprendido en el intervalo de 1 kilobase a 50 kilobases. Por ejemplo, el tamaño del ADNp que codifica el ARN de interferencia expresado está comprendido típicamente en el intervalo de 3 kilobases a 4 kilobases.

Los polipéptidos, especialmente los polipéptidos recombinantes, incluyen proteínas y péptidos terapéuticos, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos similares a inmunoglobulinas, enzimas, vacunas, hormonas peptídicas, quimiocinas, receptores, fragmentos de receptores, quinasas, fosfatasas, isomerasas, hidrolasas, factores de transcripción y polipéptidos de fusión.

Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos que tienen actividad biológica, incluyendo formas multivalentes y/o multiespecíficas de cualquiera de los indicados anteriormente.

Los anticuerpos de origen natural comprenden típicamente cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable (V_H) y una región constante (C_H), la región C_H comprende en su forma nativa tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable (V_L) y una región constante que comprende un dominio, C_L .

Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas

regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Los fragmentos de anticuerpos que pueden expresarse comprenden una parte de un anticuerpo intacto, en el que dicha parte tiene una actividad biológica deseada. Los fragmentos de anticuerpos incluyen generalmente al menos un sitio de unión a antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen: (i) fragmentos Fab que tienen dominios V_L , C_L , V_H y C_H1 ; (ii) derivados Fab, tales como un fragmento Fab' que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio C_H1 , que pueden formar fragmentos bivalentes mediante puentes disulfuro entre dos derivados Fab; (iii) fragmento Fd que tiene dominios V_H y C_H1 ; (iv) derivados Fd, tales como derivados Fd que tienen uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio C_H1 ; (v) fragmentos Fv que tienen los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) moléculas de anticuerpo de cadena simple tales como anticuerpos Fv de cadena simple (scFv) en los que los dominios V_L y V_H están unidos covalentemente; (vii) polipéptido de dominio V_H o V_L sin dominios de región constante unidos a otro dominio variable (un polipéptido de dominio V_H o V_L que tiene o no dominios de región constante, (por ejemplo, V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L)) (viii) fragmentos de anticuerpo de dominio, tales como fragmentos que consisten en un dominio V_H , o un dominio V_L , y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los dominios V_H o V_L , tales como regiones CDR aisladas; (ix) los denominados "diacuerpos" que comprenden dos sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L), en la misma cadena polipeptídica; y (x) los denominados anticuerpos lineales que comprenden un par de segmentos Fd en tándem que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno.

Los cuerpos de inclusión incluyen agregados insolubles formados en el citoplasma de células bacterianas, tales como E. coli, que comprenden más comúnmente polipéptido y especialmente polipéptido recombinante.

Además de una biomolécula diana, otros componentes del líquido que contiene la biomolécula pueden incluir sales, incluyendo sales tampón, medios de cultivo y componentes de alimentación, disolventes, comúnmente agua, codisolventes, tales como polioles C_{1-6} , tales como propilenglicoles y sorbitol, líquidos iónicos, zwittergenos, tensioactivos, imidazol u otros aglutinantes de ligandos competitivos, aminoácidos, agentes caotrópicos, tales como urea, reductores, oxidantes, reactivos de conjugación de PEGilación (sustratos, subproductos y activadores), azúcares, lípidos, ácidos nucleicos, metabolitos y polipéptidos pequeños. Los líquidos mezclados con el primer líquido que contiene biomoléculas están libres de la biomolécula diana y, en muchas realizaciones, están libres de proteínas y ácidos nucleicos. Los componentes de los líquidos mezclados con el líquido que contiene biomoléculas incluyen comúnmente sales, que incluyen sales tampón, medios de cultivo y componentes de alimentación, disolventes, comúnmente agua, codisolventes, tales como polioles C_{1-6} , tales como propilenglicoles y sorbitol, líquidos iónicos, zwittergenos, tensioactivos, imidazol u otros aglutinantes de ligandos competitivos, aminoácidos, agentes caotrópicos, tales como urea, reductores, oxidantes y azúcares.

Un ejemplo del aparato divulgado se ilustra en la Figura 1. Un dispositivo TFF, 1, está situado aguas abajo de un controlador de flujo variable de múltiples entradas, 2, un mezclador estático, 3, y una bomba, 4, que suministra una alimentación de líquido al dispositivo TFF, 1. El controlador de flujo variable de múltiples entradas, 2, controla la alimentación de un primer líquido que comprende una biomolécula, 5, y un segundo líquido, 6, al dispositivo TFF, 1. Un limitador, 7, está situado en la línea de fracción retenida desde el dispositivo TFF, 1. La realización de ciclos de cada válvula de flujo intermitente en el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 2, entre las posiciones cerrada y abierta, causa la dilución de la biomolécula. Al pasar a través del dispositivo TFF, 1, la presión causada por la acción de la bomba, 4, y el limitador, 7, causa que una parte del líquido por debajo del punto de corte de peso molecular del dispositivo TFF, 1, pase a la fracción permeada, 8, resultando en un aumento en la concentración de la biomolécula en la fracción retenida, 9.

Otro ejemplo de aparato divulgado se ilustra en la Figura 2. Un dispositivo TFF, 10, está situado aguas abajo de una bomba, 11, que suministra una alimentación de líquido al dispositivo TFF, 10, y aguas arriba de un controlador de flujo variable de múltiples entradas, 12, un mezclador estático, 13, y una segunda bomba, 14. Al pasar a través del dispositivo TFF, 10, la presión causada por la acción de la bomba, 11, y el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 12, causa que una parte del líquido por debajo del punto de corte de peso molecular del dispositivo TFF, 10, pase a la fracción permeada, 15, resultando en un aumento en la concentración de biomolécula que entra al controlador de flujo variable de múltiples entradas, 12. Las válvulas de flujo intermitente en el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 12, controlan la alimentación de un primer líquido que comprende una biomolécula, 16, y un segundo líquido, 17. La realización de ciclos de cada válvula de flujo intermitente en el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 12, entre las posiciones cerrada y abierta, causa la dilución de la biomolécula concentrada mediante la acción de la segunda bomba, 14, situada en la línea de fracción retenida, 18, desde el dispositivo TFF, 10. El mezclador estático, 13, aguas arriba de la segunda bomba, 14, garantiza que la fracción retenida, 18, tenga una composición homogénea para el segundo líquido y la biomolécula.

Un ejemplo de la presente invención que usa dos dispositivos TFF se ilustra en la Figura 3. El primer dispositivo TFF, 19, está situado aguas abajo del primer controlador de flujo variable de múltiples entradas, 20, el mezclador estático, 21 y la bomba, 22, que suministra una alimentación de líquido al primer dispositivo TFF, 19. Un segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas, 23, está situado aguas abajo en la línea de fracción retenida desde el primer dispositivo TFF, 19. El primer controlador de flujo variable de múltiples entradas, 20, controla la alimentación de un primer líquido que comprende una biomolécula, 24, y un segundo líquido, 25, al dispositivo TFF, 19. La realización de ciclos de cada válvula de flujo intermitente en el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 20, entre las posiciones cerrada y abierta,

causa la dilución de la biomolécula. Al pasar a través del primer dispositivo TFF, 19, la presión causada por la acción de la bomba, 22, y el segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas, 23, causa que una parte del líquido por debajo del punto de corte de peso molecular del primer dispositivo TFF, 19, pase a la fracción permeada, 26, resultando en un aumento en la concentración de biomolécula que entra al segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas, 23.

Las segundas válvulas de flujo intermitente en el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 23, controlan la alimentación de la biomolécula concentrada desde el primer dispositivo TFF, 19, y un tercer líquido, 27. La realización de ciclos de cada válvula de flujo intermitente en el segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas, 23, entre las posiciones cerrada y abierta, causa la dilución de la biomolécula concentrada mediante la acción de la segunda bomba, 28, situada aguas debajo de la salida tanto de un segundo mezclador estático, 29, como del segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas, 23. La segunda bomba, 28, suministra una alimentación de líquido al segundo dispositivo TFF aguas abajo, 30. Un limitador, 31, está situado en la línea de fracción retenida desde este segundo dispositivo TFF, 30. Al pasar a través del segundo dispositivo TFF, 30, la presión causada por la acción de la segunda bomba, 28, y el limitador, 31, causa que una parte del líquido por debajo del punto de corte de peso molecular del dispositivo TFF, 30, pase a la fracción permeada, 32, resultando en un aumento en la concentración de la biomolécula en la fracción retenida, 33.

Otro ejemplo adicional de la presente invención que usa dos dispositivos TFF se ilustra en la Figura 4. El primer dispositivo TFF, 34, está situado aguas abajo de dos bombas de alimentación, 35 y 36, y un mezclador estático, 37, que suministra la alimentación de líquido al primer dispositivo TFF, 34. La primera bomba, 35, controla la alimentación de un primer líquido que comprende una biomolécula, 38, y la segunda bomba, 36, controla la alimentación de un segundo líquido, 39, al primer dispositivo TFF, 34. La acción de las dos bombas, 35 y 36, causa la dilución de la biomolécula. Un controlador de flujo variable de múltiples entradas, 40, está situado aguas abajo en la línea de fracción retenida desde el primer dispositivo TFF, 34. Al pasar a través del primer dispositivo TFF, 34, la presión causada por la acción de las bombas, 35 y 36, y el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 40, causa que una parte del líquido por debajo del punto de corte de peso molecular del primer dispositivo TFF, 34, pase a la fracción permeada, 41, resultando en un aumento en la concentración de biomolécula que entra al controlador de flujo variable de múltiples entradas, 40. Las válvulas de flujo intermitente en el controlador de flujo variable de múltiples entradas, 40, controlan la alimentación de la biomolécula concentrada desde el primer dispositivo TFF, 34, y un tercer líquido, 42. La realización de ciclos de cada válvula de flujo intermitente en el segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas, 40, entre las posiciones cerrada y abierta, causa la dilución de la biomolécula concentrada mediante la acción de la tercera bomba, 43, situada aguas debajo de la salida tanto de un segundo mezclador estático, 44, como del controlador de flujo variable de múltiples entradas, 40. La tercera bomba, 43, suministra una alimentación de líquido al segundo dispositivo TFF aguas abajo, 45. Un limitador, 46, está situado en la línea de fracción retenida de este segundo dispositivo TFF, 45. Al pasar a través del segundo dispositivo TFF, 45, la presión causada por la acción de la segunda bomba, 43, y el limitador, 46, causa que una parte del líquido por debajo del punto de corte de peso molecular del dispositivo TFF, 45, pase a la fracción permeada, 47, resultando en un aumento en la concentración de la biomolécula en la fracción retenida, 48.

Abreviaturas

DV	Diavolumenes
mPES	Polietilensulfona modificada
rhLactoferrina	Lactoferrina humana recombinante
TFF	Filtración de flujo tangencial

Modelo de proteína:

En los estudios experimentales se usó rhLactoferrina purificada a una concentración inicial de 1 mg/ml en fosfato de sodio 50 mM pH 7,5.

Tampón (A) fosfato de sodio 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,0

Tampón (B) fosfato sódico 50 mM, pH 7,5

Tampón (C) fosfato de sodio 50 mM, NaCl 0,1 M, sorbitol al 10%, pH 7,0

Tampón (D) fosfato de sodio 50 mM, NaCl 0,1 M, sorbitol al 10%, propano-1,2-diol al 6%, pH 7,0

Ejemplo 1

Una solución madre de al menos 400 ml de 1 mg/ml de rhLactoferrina a pH 7,5 se diluyó volumétricamente 4 veces con tampón (A) usando un gradiente del 25% de rhLactoferrina en la bomba B1 de un sistema GE Healthcare ÄKTA™ Explorer, mientras se alimentaba el tampón (A) a través de la bomba A1 (75%) a un caudal constante de 15 ml/min. A continuación, la rhLactoferrina diluida se dirigió en modo de flujo descendente a través de la posición 2 en la válvula ÄKTA™ Explorer V2 a una fibra hueca mPES Spectrum Labs MidiKros™ de 65 cm de largo y 10 kDa con un área de superficie de 370 cm². A su vez, la línea de fracción retenida de la fibra hueca se conectó directamente a un controlador de flujo variable de

múltiples entradas aguas abajo. El controlador de flujo variable de múltiples entradas comprende un colector de dos válvulas de plástico hecho a medida (Gemü) con una sola salida que tiene un orificio interior de 2 mm con un actuador de solenoide de acción rápida bajo el control de un miniordenador Raspberry Pi, que controla el flujo de líquido a través del colector. El colector está configurado de manera que tenga los mismos volúmenes de trayectoria de flujo desde la válvula a la salida. El tiempo de ciclo del controlador de flujo variable de múltiples entradas se estableció a 2 segundos y la válvula de control de la fracción retenida se abrió durante el 25% del ciclo para conseguir el factor de concentración volumétrica de 4 veces requerido para obtener el volumen de partida inicial de la solución de rhLactoferrina. La segunda posición de la válvula en el controlador de flujo de múltiples entradas estuvo abierta durante el 75% del ciclo cuando se cerró la primera válvula, para permitir una segunda dilución de 4 veces de la fracción retenida de la fibra hueca con tampón (B). La salida desde el controlador de flujo variable de múltiples entradas pasó a través de un mezclador estático de 10 cm de longitud y 5 mm de diámetro antes de volver a la válvula V3, posición 2 en el ÄKTA™ Explorer para recopilar datos de conductividad, pH y absorbancia a 280 nm. La línea de salida F8 de la válvula V4 del ÄKTA™ Explorer se conectó a la línea de alimentación A11 de la bomba A1 de un segundo sistema GE Healthcare ÄKTA™ Explorer que funcionaba también a 15 ml/min. A su vez, este sistema se conectó a una segunda fibra hueca mPES Spectrum Labs MidiKros™ de 65 cm de largo y 10 kDa con un área de superficie de 370 cm² a través de la válvula de columna V2 del ÄKTA™ Explorer, nuevamente en la posición 2. La fracción retenida de la fibra hueca se alimentó directamente a un segundo controlador de flujo variable de múltiples entradas de diámetro de orificio interior de 10 mm. Esta válvula usó un tiempo de ciclo de 10 segundos con la válvula de control de la fracción retenida abierta durante el 4% del ciclo para obtener el factor de concentración volumétrico de 4 veces con el fin de obtener una vez más el volumen de partida inicial de la solución de rhLactoferrina. La salida desde el controlador de flujo variable de múltiples entradas se dirigió a través de un segundo mezclador estático de 10 cm de longitud y 5 mm de diámetro antes de volver al explorador ÄKTA™ en la válvula V3, posición 2 para la recopilación de datos de conductividad, pH y absorbancia a 280 nm. La solución de rhLactoferrina intercambiada con un tampón en línea se recogió a través de la línea de salida F8 en la válvula V4 del ÄKTA™ Explorer. Los datos desde el primer sistema ÄKTA™ Explorer demostraron un intercambio de tampón rápido y exitoso usando un sistema en línea, mientras que la traza del segundo sistema ÄKTA™ Explorer mostró que se mantuvo la concentración de proteína con relación a la alimentación.

Las trazas de absorbancia, conductividad y pH de la rhLactoferrina intercambiada con tampón en línea demuestran que el uso de dos diluciones y concentraciones de 4 veces resultó en un intercambio de -95% de tampón (A) por tampón (B). La conductividad del tampón (B) 6,9mS/cm y pH 7.47 era similar a la Lactoferrina intercambiada con tampón final con una conductividad de 7,2mS/cm y pH 7,43. La concentración de proteína se mantuvo a aproximadamente 45 mAU.

Ejemplos 2 a 8

El método del Ejemplo 1 se repitió, pero con las condiciones variadas tal como se indica en la Tabla 1 para investigar el efecto de invertir el intercambio de tampón o la adición de componentes de tampón que cambian la viscosidad del tampón (10% de sorbitol y/o 6% de propan-1,2-diol) en el tiempo de operación y diferentes relaciones de concentración/dilución entre los concentradores 1º y 2º. Los Ejemplos 2 y 3 usaron tampón (A) para el diluyente, el Ejemplo 4 usó tampón (B), los Ejemplos 5, 6 y 7 usaron tampón (C) y el Ejemplo 8 usó tampón (D).

A partir de los resultados proporcionados en la Tabla 1, puede observarse que la dilución y concentración en serie consigue intercambios de tampón equivalentes a hasta 3 diavolúmenes en un sistema TFF por lotes de recirculación convencional. Pueden conseguirse mayores eficiencias de intercambio de tampón funcionando a mayores tasas de dilución, tal como se observa en los Ejemplos 6 y 7.

Tabla 1

Ej.	Relación de dilución combinada	Conductividad					Alimentación (ml)	Fracción retenida (ml)
		Alimentación (mS/cm)	Tampón (mS/cm)	Fracción retenida (mS/cm)	Eficiencia (%)	DV equivalente		
1	1:16	3,57	16,49	16,14	97,9	3,9	65,7	243
2	1:16	3,64	16,49	14,48	87,8	2,1	67,5	48
3	1:16	3,64	16,49	14,76	89,5	2,3	345	550
4	1:16	14,20	7,02	7,96	86,6	2,0	350	770
5	1:16	9,34	15,15	14,70	97,0	3,5	159	220
6	1:16	9,42	15,54	14,63	94,1	2,8	154	224
	1:32			14,90	95,9	3,2		
7	1:12	9,42	15,54	14,36	92,4	2,6	242	251
	1:16			14,64	94,2	2,8		
	1:24			14,88	95,8	3,2		
	1:32			14,99	96,5	3,4		
8	1:16	14,82	11,44	12,56	-	-	126	157

REIVINDICACIONES

1. Aparato para aplicar un intercambio de líquido a un líquido que contiene biomoléculas que comprende:

a) un primer controlador de flujo de múltiples entradas (20) y un primer dispositivo de filtración de flujo tangencial (19), en el que el primer controlador de flujo de múltiples entradas comprende:

- 5 i) una primera entrada para un primer medio líquido que comprende una biomolécula (24) que comprende una válvula de entrada de flujo intermitente que previene el flujo en una primera posición, pero permite el flujo en al menos una segunda posición;
- 10 ii) al menos una segunda entrada para un segundo medio líquido (25) que comprende una válvula de entrada de flujo intermitente que previene el flujo en una primera posición, pero permite el flujo en al menos una segunda posición;
- 15 iii) una salida en conexión de fluido con el primer dispositivo de filtración de flujo tangencial (19); y
- iv) una unidad de control programable para regular la apertura y el cierre durante al menos 10 ciclos de las válvulas de entrada de flujo intermitente de manera que, durante la operación, solo una válvula esté abierta en un momento dado para conseguir las cantidades relativas requeridas de los líquidos de entrada que fluyen a través del controlador de flujo de múltiples entradas y con un período de tiempo o frecuencia de ciclo predeterminados según la proporción requerida del tiempo de ciclo para generar una composición deseada;

b) un segundo controlador de flujo de múltiples entradas (23) y un segundo dispositivo de filtración de flujo tangencial (30), en el que el segundo controlador de flujo de múltiples entradas comprende:

- 20 i) una primera entrada que está en conexión de fluido con la fracción retenida desde el primer dispositivo de filtración de flujo tangencial (19);
- ii) al menos una segunda entrada para un tercer medio líquido (27); y
- iii) una salida en conexión de fluido con el segundo dispositivo de filtración de flujo tangencial (30); y

c) unos medios para impartir flujo de los líquidos a través de los controladores de flujo y los dispositivos de filtración de flujo tangencial.

25 2. Aparato según la reivindicación 1, en el que los medios para impartir flujo comprenden bombas (22, 28) situadas entre la salida de los controladores de flujo de múltiples entradas (20, 23) y los dispositivos de filtración de flujo tangencial (19, 30).

3. Aparato según la reivindicación 2, que comprende además mezcladores en línea (21, 29), preferiblemente mezcladores estáticos, situados entre los controladores de flujo de múltiples entradas (19, 23) y las bombas (22, 28).

30 4. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un limitador (31) aguas abajo de los dispositivos de filtración de flujo tangencial (19, 30).

5. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo controlador de flujo de múltiples entradas (23) funciona como un limitador para el primer dispositivo de filtración de flujo tangencial.

35 6. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segundo controlador de flujo de múltiples entradas (23) comprende además dos o más válvulas de entrada de flujo intermitente que previenen el flujo en una primera posición, pero permiten el flujo en al menos una segunda posición.

7. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el volumen medido desde cada válvula de entrada a la salida del controlador de flujo es el mismo para cada entrada.

40 8. Aparato según la reivindicación 7, en el que la longitud de la trayectoria medida desde cada válvula de entrada a la salida del controlador de flujo es la misma para cada entrada.

9. Método para la preparación de una biomolécula, que comprende procesar un medio líquido que comprende la biomolécula mediante intercambio de líquido empleando un aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Método según la reivindicación 9, en el que se emplean al menos 50 ciclos.

45 11. Método según las reivindicaciones 9 o 10, en el que la frecuencia del ciclo es inferior a 100 Hz, y preferiblemente de 0,05 a 0,5 Hz.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el procesamiento comprende el intercambio de tampón.

Figura 1

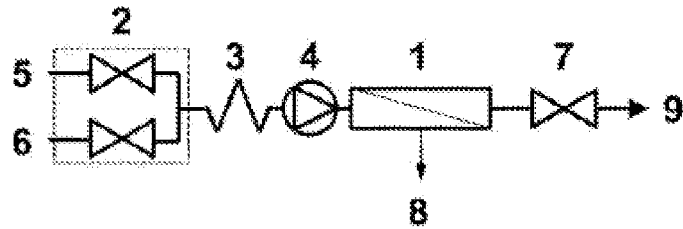


Figura 2

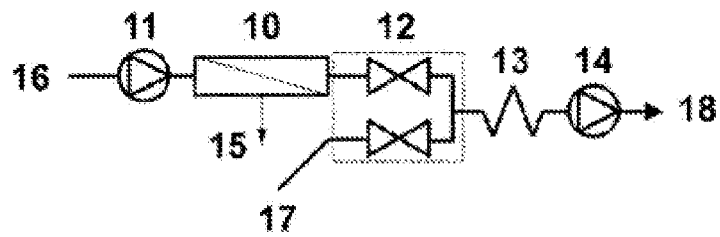


Figura 3

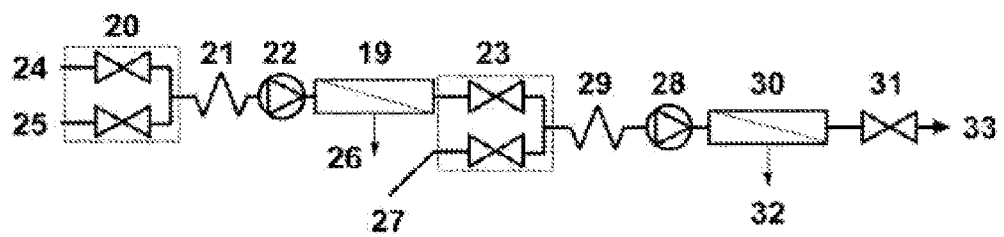


Figura 4

