



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0515849-4 B1**



**(22) Data do Depósito: 30/09/2005**

**(45) Data de Concessão: 30/07/2019**

**(54) Título:** PROCESSO PARA PURIFICAR UMA PROTEÍNA DE INTERESSE PROVENIENTE DE UMA MISTURA FLUIDA DE CULTURA DE TECIDO HETEROGÊNEA E APARELHO PARA SEPARAR UMA PROTEÍNA DE INTERESSE DA MISTURA FLUIDA DE CULTURA DE TECIDO HETEROGÊNEA

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/00; B01D 61/00; B01D 61/02; B01D 61/08; B01D 61/14; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 30/09/2004 US 60/614.995.

**(73) Titular(es):** BAYER HEALTHCARE LLC.

**(72) Inventor(es):** JENS HOLGER VOGEL; ROBERTO GIOVANNINI; KONSTANTIN B. KONSTANTINOV; HUONG MY NGUYEN; PAUL WU.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2005035364 de 30/09/2005

**(87) Publicação PCT:** WO 2006/039588 de 13/04/2006

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 28/03/2007

**(57) Resumo:** "DISPOSITIVOS E MÉTODOS PARA FABRICAÇÃO INTEGRADA CONTÍNUA DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS". Esta invenção se refere a um processo e um aparelho para purificar uma molécula de interesse proveniente de uma mistura fluida clarificada heterogênea. O aparelho da invenção geralmente consiste em um sistema de fermentação de perfusão contínua, um sistema de remoção contínua de partículas integrado ao sistema de fermentação de perfusão; e um sistema de purificação contínua integrado ao sistema de remoção de partículas, que é mantido sob condições estéreis. O processo consiste na filtração de uma mistura fluida clarificada e heterogênea pela ultrafiltração contínua a uma taxa de fluxo específica abaixo do ponto de transição da molécula de interesse na região de fluxo que depende da pressão em relação à curva TMP, em que a taxa de fluxo específica é mantida consideravelmente constante durante toda ultrafiltração contínua.

**PROCESSO PARA PURIFICAR UMA PROTEÍNA DE INTERESSE PROVENIENTE  
DE UMA MISTURA FLUIDA DE CULTURA DE TECIDO HETEROGÊNEA E  
APARELHO PARA SEPARAR UMA PROTEÍNA DE INTERESSE DA MISTURA  
FLUIDA DE CULTURA DE TECIDO HETEROGÊNEA**

Campo da invenção

Esta invenção se refere a um método e um sistema  
5 aperfeiçoados para purificar uma molécula de interesse de  
uma mistura heterogênea de moléculas. Mais particularmente,  
esta invenção é dirigida a métodos de purificação de uma  
proteína de interesse em um fluxo de alimentação de fluido  
de cultura de tecido proveniente de um processo de  
10 perfusão.

Antecedente da invenção

É bem conhecido por especialistas familiarizados com a  
área que, nos últimos anos, vários processos contínuos de  
cultura de célula, também chamados de processos de perfusão  
15 contínua, estabeleceram grande êxito comercial. Entretanto,  
o processo de isolamento após a fermentação da perfusão  
contínua é geralmente um processo de lote e é física e  
logisticamente separado do processo de fluxo ascendente  
contínuo. Nesses processos, a finalidade principal da etapa  
20 de isolamento é capturar o produto fora de volumes elevados  
de sobrenadante de cultura relativamente diluída. A  
concentração do produto foi enfatizada em relação a  
logística do processo e exigências de espaço, enquanto a  
remoção simultânea de contaminantes (purificação) é  
25 importante para minimizar o número exigido de etapas  
adicionais de purificação de fluxo ascendente.

A figura 1 mostra um esquema de um processo de  
isolamento inovador de uma fermentação de perfusão  
contínua, como é bem conhecido por profissionais  
30 familiarizados na área. O sistema de fermentação de  
perfusão contínua consiste em um dispositivo de retenção da  
célula (1), que mantém a maioria das células gerando o  
produto no sistema de fermentação. Um fluxo de colheita  
contínua do sistema de perfusão contínua, que contém

algumas células, fragmentos e outras partículas é bombeado usando uma bomba de colheita (2) em grandes tanques de coleta (3), como tanques de aço inoxidável. Esses tanques de armazenamento de colheita geralmente têm que ser resfriados para manter as perdas de produto em razão da degradação em um possível intervalo.

Após um determinado volume ter sido coletado, geralmente após 1-4 dias ou mais, os tanques de coleta de colheita são desconectados do tanque de fermentação estéril, e o material coletado é designado como um lote de colheita. A etapa seguinte se destina a remover células, fragmentos e partículas (etapa 2). Em escala industrial, isso geralmente é feito por meio da centrifugação (4), seguida pela filtração de membrana sem saída (5) ou pela filtração profunda sem saída (6) seguida pela filtração de membrana sem saída (7). Outra técnica ocasionalmente usada é a microfiltração de fluxo tangencial (ou "fluxo cruzado"). Em qualquer caso, o produto do processo de remoção da partícula é um lote de fluido de cultura de tecido clarificado, ou cTCF (8). Mais detalhes sobre a separação de partícula para produtos biotecnológicos podem ser encontrados nos livros de texto padrão, como Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137.

Na etapa seguinte (etapa 3), o lote de fluido de cultura de tecido clarificado é ainda processado para concentrar e, se possível, purificar o produto. Geralmente, isso é feito pela ultrafiltração de fluxo cruzado ou pela cromatografia de leito empacotado.

No caso de ultrafiltração de fluxo cruzado, o cTCF é bombeado para o tanque de reciclagem (9) do sistema. Uma bomba é usada (10) para empurrar o material por um ultrafiltrador de fluxo cruzado. O produto é retido pela membrana e reciclado como retentado no tanque de

reciclagem, enquanto a água e os contaminantes menores são empurrados através da membrana para o permeado (11) em razão da pressão da transmembrana gerada pela queda de pressão no módulo de ultrafiltração. Em cada passagem através do filtro, o cTCF se torna mais concentrado, e o volume de cTCF total é reduzido até que um fator de concentração desejado seja obtido. Depois que o fator desejado de concentração é obtido, o processo é interrompido, e o volume concentrado restante (isolado) é drenado do sistema e coletado. Mais detalhes sobre a ultrafiltração para concentração de produtos biotecnológicos podem ser encontrados nos livros de texto padrão, como *Biotechnology*, Vol. 3, *Bioprocessing*, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137.

No caso de cromatografia de leito empacotado, o cTCF é bombeado por uma coluna de cromatografia (12) que contém um leito de resina empacotado. O produto se liga à resina e é eluído na forma geralmente concentrada e purificada (isolado, 13), usando um tampão de eluição adequado (14), após o qual a coluna é limpa e regenerada, usando tampões e soluções de limpeza (14) adequados.

Outras variantes de cromatografia que foram propostas para concentração/purificação de cTCF são cromatografia de leito expandido e cromatografia de membrana. A cromatografia de leito expandido pode processar soluções que contêm partículas. Entretanto, a filtração do isolado após a cromatografia ainda é necessária, embora as áreas de filtração sejam reduzidas. A cromatografia de membrana usa pilhas de membranas de microfiltração modificadas em vez de leitos de resina empacotados. A vantagem é que a transferência de massa é amplamente convectiva, e não difusiva, o que permite separação mais rápida. Por outro lado, o processo é normalmente equivalente à cromatografia de leito empacotado padrão. Mais detalhes sobre a

cromatografia para concentração e purificação de produtos biotecnológicos podem ser encontrados em livros de texto padrão como Protein Purification, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Wiley- VCH, 2 Edition (1998), ISBN 0-471-18626-0.

Muitas vezes, o isolado de massa é congelado e armazenado para uso posterior nas etapas de purificação de fluxo descendente.

Portanto, conforme descrito acima, o processo de isolamento após é geralmente um processo de lote e é física e logisticamente separado do processo de fluxo ascendente contínuo. Além disso, embora a fermentação tenha que ser realizada de maneira estéril, o isolamento (ou seja, a remoção e a concentração/purificação de partículas) é essencialmente realizado de maneira limpa, mas não estéril.

Os processos inovadores, conforme descritos acima, têm inúmeros problemas:

P1. Perdas de rendimento e redução da qualidade potencial em razão do elevado tempo de permanência do produto. A colheita proveniente da fermentação de perfusão contínua precisa ser coletada e armazenada por períodos significativos, conforme explicado anteriormente, antes do processamento de um lote de isolamento. A colheita coletada, embora refrigerada, ainda fornece um ambiente prejudicial para produtos de proteína complexos e peculiarmente instáveis. Portanto, as perdas significativas de produto ocorrem, o que reduz a capacidade da fábrica e aumenta o custo das mercadorias. Além disso, a qualidade do produto pode ser afetada desfavoravelmente.

P2. Grandes instalações com áreas de resfriamento ou tanques refrigerados são necessárias para intermediar o armazenamento de grandes volumes de colheita, levando a custos de capital elevado e anulando a vantagem da compacidade e da mobilidade mencionada dos fermentadores de

perfusão.

P3. Tecnologias de concentração/purificação convencional (por exemplo, ultrafiltração, cromatografia de leito empacotado) têm rendimento volumétrico relativamente baixo, tempos de execução significativos e mão-de-obra relativamente intensa. Como resultado, geralmente não é realizado mais de um processo de lote por dia.

P4. Além disso, os processos e métodos de isolamento atuais têm dificuldades logísticas ao lidar com os volumes de processo variáveis nas fábricas de fermentação que envolvem mais de um fermentador. Em fábricas de perfusão contínua em larga escala, um número variável de fermentadores é operacional.

P5. Os processos de isolamento inovadores são operados de maneira limpa, mas não podem ser operados de maneira estéril. Isso sempre leva a um número significativo de lotes rejeitados em razão de questões de carga microbiana.

P6. O uso de descartáveis, como filtros descartáveis, conjuntos, bolsas, etc, embora muito desejados na produção de produtos parenterais humanos (por exemplo, para evitar a limpeza e a validação de limpeza e outras questões) é muito dispendioso e, na verdade, nem sempre é econômico.

Portanto, é um objeto desta invenção fornecer um processo de separação de proteína integrado e contínuo que seja capaz de operar por períodos sustentados sob condições estéreis.

#### Sumário da invenção

Esta invenção se destina a um novo aparelho e processo para purificar moléculas de uma mistura fluida heterogênea. Mais particularmente, a invenção se destina a um processo para purificação de uma molécula de interesse proveniente de uma mistura fluida clarificada heterogênea da qual contaminantes particulados foram removidos. O processo consiste na etapa de filtração de uma mistura fluida

clarificada e heterogênea pela ultrafiltração contínua a uma taxa de fluxo específica abaixo do ponto de transição da molécula de interesse na região de fluxo que depende da pressão em relação à curva TMP, em que a taxa de fluxo específica é mantida consideravelmente constante durante toda ultrafiltração contínua.

Em representações específicas, o processo da invenção consiste na filtração da mistura fluida clarificada através de uma membrana de ultrafiltração que tem uma área em metros quadrados aproximadamente igual a 0,1 a 2 vezes a taxa de fluxo volumétrico da mistura fluida clarificada em litros/hora. Em outra representação, o processo da invenção consiste na filtração da mistura fluida clarificada através de uma membrana de ultrafiltração que tem uma área em metros quadrados aproximadamente igual a 0,3 a 1 vez a taxa de fluxo volumétrico da mistura fluida clarificada em litros/hora.

O processo da invenção permite, de maneira vantajosa, filtrar a mistura clarificada a uma taxa de fluxo específica que produz uma concentração de parede inferior a aproximadamente 20%, inferior a 15% ou inferior a 10%, maior que a concentração de retentado, sem polarização de concentração.

Em uma representação mais específica, a invenção se destina a um processo integrado, contínuo e estéril para fermentação de perfusão contínua, remoção particulada e purificação/concentração. Em um aspecto da invenção, o processo consiste em filtração da mistura de cultura do tecido por um processo de separação que separa seletivamente a proteína de interesse da mistura em um ponto de ajuste operacional abaixo do ponto de transição da proteína na região do fluxo que depende da pressão em relação à curva TMP para produzir um produto isolado estéril, livre de partículas, concentrado e parcialmente

purificado, no qual a taxa de fluxo específica por meio do processo é mantida consideravelmente constante em um nível inferior ao do ponto de transição da proteína.

Em outro aspecto da invenção, o processo é um processo contínuo para purificar uma proteína de interesse proveniente de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea, caracterizado por:

(a) produção por um processo de fermentação de perfusão contínua de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea que contém uma proteína de interesse;

(b) transferência da mistura fluida de cultura de tecido para um processo de remoção contínua de partícula integrado ao processo de fermentação de perfusão contínua;

(c) remoção de contaminantes particulados do fluido de cultura de tecido no processo de remoção contínua de partícula para produzir um fluido de cultura de tecido clarificado que contém a proteína de interesse;

(d) transferência do fluido de cultura de tecido clarificado para um processo de purificação contínua integrado ao processo de remoção contínua de partícula; e

(e) purificação da proteína de interesse proveniente do fluido de cultura de tecido clarificado no processo de purificação contínua.

em que a taxa de fluxo específica da mistura, através do processo de fermentação de perfusão contínua, processo de remoção contínua de partícula e processo de purificação contínua, é mantida consideravelmente constante.

Em outro aspecto da invenção, o processo é um processo semicontínuo para purificar uma proteína de interesse proveniente de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea, caracterizado por:

(a) produção por um processo de fermentação de perfusão contínua de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea que contém uma proteína de interesse;



(b) transferência da mistura fluida de cultura de tecido para um processo de remoção contínua de partícula integrado ao sistema de fermentação de perfusão contínua;

5 (c) remoção de contaminantes particulados do fluido de cultura de tecido no processo de remoção contínua de partícula para produzir um fluido de cultura de tecido clarificado que contém a proteína de interesse;

10 (d) transferência do fluido de cultura de tecido clarificado para um tanque de amortecimento integrado ao processo de remoção contínua de partícula;

(e) transferência com intermitência do fluido de cultura de tecido clarificado para um processo de purificação integrado ao tanque de amortecimento; e

15 (e) purificação da proteína de interesse proveniente do fluido de cultura de tecido clarificado no sistema de purificação para produzir um produto isolado estéril, livre de partículas, concentrado e parcialmente purificado que contém a proteína de interesse;

20 em que a taxa de fluxo específica da mistura, através do processo de fermentação de perfusão contínua e processo de remoção contínua de partícula, é mantida consideravelmente constante.

25 Esta invenção também se destina a um aparelho para separar uma proteína de interesse de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea. Em um aspecto da invenção, o aparelho consiste em: (a) um sistema de fermentação de perfusão contínua; (b) um sistema de remoção contínua de partículas integrado ao sistema de fermentação de perfusão; e (c) um sistema de purificação contínua integrado ao sistema de remoção de partícula, em que o aparelho é  
30 adaptado para manter condições estéreis.

Em outro aspecto da invenção, o aparelho consiste em: (a) um sistema de fermentação de perfusão contínua; (b) um sistema de remoção contínua de partículas integrado ao

sistema de fermentação de perfusão; e (c) um sistema de purificação intermitente integrado ao sistema de remoção de partícula, em que o aparelho é adaptado para manter condições estéreis.

5 O sistema de purificação pode, por exemplo, ser um sistema de ultrafiltração ou um sistema convectivo de adsorção/dessorção, ou qualquer outro sistema capaz de purificar ou purificar parcialmente uma proteína de interesse proveniente de uma mistura heterogênea em um  
10 sistema integrado, contínuo ou semicontínuo estéril conforme descrito aqui.

O processo e o aparelho da invenção são adaptados para permitir o processamento contínuo de uma mistura fluida heterogênea, como um fluido de cultura de célula, a uma  
15 taxa de fluxo consideravelmente constante. Em um aspecto particular da invenção, o processo e o aparelho da invenção são adaptados para permitir o processamento contínuo de uma mistura fluida de cultura de célula ou de tecido heterogênea a uma taxa de fluxo consideravelmente constante  
20 abaixo do ponto de transição da proteína na região do fluxo que depende da pressão em relação à curva de TMP por um período contínuo e durante todo o processo de purificação.

Esses e outros aspectos da invenção são descritos detalhadamente a seguir, na descrição detalhada da  
25 invenção.

#### Breve descrição dos desenhos

Os desenhos anexos, e que constituem parte da especificação, ilustram as representações da invenção e, juntamente com a descrição detalhada da representação,  
30 servem para explicar os princípios da invenção e seus benefícios.

FIG. 1: esquema de processo de perfusão contínua convencional seguida por 3 etapas do processo de isolamento física e logisticamente segregado (coleta da colheita de

lote, remoção da partícula do lote e concentração/purificação do lote).

FIG. 2: representação esquemática de 2 representações do dispositivo inventivo A para fabricação contínua, integrada e estéril. Esquema da representação A1, mostrada no lado esquerdo e esquema da representação A2, mostrada no lado direito.

FIG. 3: representação esquemática de 2 representações do dispositivo inventivo B para fabricação contínua, integrada e estéril. Esquema da representação B1, mostrada no lado esquerdo e esquema da representação B2, mostrada no lado direito.

FIG. 4: esquema de uma representação de sistema inventivo de remoção contínua de partículas integrado (100), um elemento do dispositivo inventivo A e dispositivo inventivo B.

FIG. 5: representações esquemáticas de representações adicionais de dispositivo inventivo A que combinam vários elementos para aumentar a capacidade geral da fábrica (A3) ou desempenho de concentração e separação (A4).

FIG. 6: representações esquemáticas de representações adicionais do dispositivo inventivo B.

FIG. 7: representação adicional de dispositivos inventivos que combina elementos do dispositivo A e do dispositivo B em série para aumentar o desempenho geral de concentração geral e de separação.

FIG. 8: comparação de exemplo das capacidades de carga total de acordo com 10" de cápsula de filtro para o processo de lote convencional e representação de dispositivo inventivo e método para remoção contínua de partículas (processo integrado de filtração contínua) que usa cápsulas de filtro comercial idênticas. Método de exemplo de produção de Fator VIII de coagulação sanguínea recombinante mostrado.

FIG 9: exemplo de curva de pressão-fluxo (fluxo permeado específico em LMH = litros/hora/m<sup>2</sup> na pressão de transmembrana) e determinação do ponto de operação. O círculo mostra o ponto de operação comum que será ajustado por meio de TMP para processos de lote convencionais. O retângulo mostra a região operacional preferida que será ajustada por meio da bomba de permeado de acordo com o método de uso do dispositivo inventivo A.

FIG. 10: exemplo de distribuição do tempo de permanência e tempo de permanência médio do sistema UF contínuo integrado (300), de acordo com o método de uso do dispositivo inventivo A. Medido para sistema contínuo descartável com módulo de 290 cm<sup>2</sup> (62,5 cm de comprimento), fluxo cruzado de 120 LMH, fluxo retentado de 0,2 LMH, fluxo de permeado de 2 LMH.

FIG. 11: exemplo de isolamento de rFVIII da fermentação de perfusão contínua livre de plasma que utiliza uma representação do dispositivo inventivo A. Comparação de produção de isolamento médio de método contínuo inventivo comparado à produção média de isolamento do lote, incluindo uma difusão de desvio padrão. Foram usados três lotes consecutivos para determinar a produção de lote, enquanto três pontos (dias) consecutivos foram usados para o processo contínuo.

FIG. 12: exemplos de desempenho de dispositivo inventivo A. Pressão de transmembrana e fluxo específico de sistema de ultrafiltração contínua integrado (300) como uma função de tempo do processo contínuo para três exemplos diferentes mostrados. Triângulos = membrana de 100 kD, Fator VIII de coagulação sanguínea recombinante (rFVIII); Quadrados = membrana de 10 kD, interleucina-2 recombinante; Círculos = membrana de 50 kD, glicoproteína geneticamente projetada (Mr > 100 kD). Todos os exemplos mostrados são de fermentação de perfusão contínua livre de proteína de

plasma.

FIG. 13: exemplo de desempenho de longo prazo de dispositivo inventivo A ligado diretamente à fermentação de perfusão contínua de dois produtos de proteína de co-expressão de linhagem celular (proteína fluorescente verde GFP e IL-2SA). Pressão da membrana e fluxo específico do sistema inventivo de ultrafiltração contínua (300) como uma função de tempo de processo contínuo mostrada. A membrana de 10kD foi usada.

FIG. 14: exemplo de desempenho de longo prazo de dispositivo inventivo A ligado diretamente à fermentação de perfusão contínua de dois produtos de proteína de co-expressão de linhagem celular (proteína fluorescente verde GFP e IL-2SA). A membrana de 10kD foi usada. Fator de concentração de produtos de proteína, conforme determinado por ensaios específicos e fator de concentração volumétrica mostrado como uma função de tempo de processo contínuo.

FIG. 15: exemplo de desempenho do dispositivo inventivo B. A produção e a pressão caem próximas a 100 ciclos de adsorção/dessorção consecutivos com adsorvente convectivo (proteína-alvo: variante do Fator FVIII de coagulação sanguínea projetada geneticamente; adsorvente convectivo: adsorvente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 16: exemplo de desempenho do dispositivo inventivo B. Perfil de UV e condutividade durante um ciclo de adsorção/dessorção comum com adsorvente convectivo (proteína-alvo: variante do Fator FVIII de coagulação sanguínea projetada geneticamente; adsorvente convectivo: adsorvente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

FIG. 17: exemplo de desempenho de dispositivo inventivo B. Gel SDS-page (mancha prata) de carga = colheita clarificada que sai continuamente do sistema de remoção de partícula (100) e carregada de modo semicontínuo

no sistema adsorvente convectivo (400) e eluado de adsorção/dessorção comum mostrado. Proteína-alvo: variante do Fator FVIII de coagulação sanguínea projetada geneticamente; adsorvente convectivo: adsorvente comercial, Mustang Q, Pall Corporation). O eluado foi diluído de volta na concentração de carga antes de ser misturado no gel.

#### Descrição detalhada da invenção

##### Definições

Exceto se definido expressamente aqui, a terminologia usada nessa aplicação é o padrão da arte. As definições a seguir de determinados termos são fornecidas aqui para garantir a clareza e a exatidão do significado das reivindicações.

As unidades, os prefixos e os símbolos podem ser denotados em sua forma aceita SI. Intervalos numéricos mencionados aqui incluem os números que definem o intervalo e incluem e sustentam cada inteiro no intervalo definido. Exceto se observado de outra maneira, os termos "um" ou "uma" devem ser interpretados como "pelo menos um de". Os títulos de seção usados aqui se destinam apenas a fins de organização e não devem ser interpretados como limitadores do objeto descrito. Todos os documentos, ou partes de documentos, citados neste requerimento, incluindo, mas não limitados a patentes, requerimentos de patente, artigos, livros e estudos, são expressamente incluídos aqui para referência integralmente para qualquer fim.

O termo "clarificação" e "clarificado" significa a remoção de matéria particulada de uma solução para que a solução restante passe através de uma membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .

O termo "fermentação de perfusão contínua" se refere a um sistema de fermentação de estado estável ou processo que opera sem interrupção e no qual as células ou microorganismos são mantidos em cultura na fase de crescimento exponencial pela adição contínua de meio fresco

que é equilibrado pela remoção de suspensão de célula do biorreator.

Os termos "cultivo", "cultura", "crescimento", "manutenção", "suporte" e "expansão" são sinônimos no significado de que as células permanecem viáveis e capazes de produzir progênie.

O termo "concentração", em sua forma verbal, significa a remoção de água de uma solução de modo que a quantidade de uma molécula de interesse por volume de solução restante aumente.

O termo "polarização de concentração" significa o acúmulo de moléculas retidas (camada de gel) na superfície da membrana causado por uma combinação de fatores: pressão da transmembrana, velocidade de fluxo cruzado, viscosidade da amostra e concentração dissolvida.

O termo "contínuo" significa período, seqüência e/ou operação ininterrupta por períodos prolongados. Conforme usados em referência à fermentação, processos de clarificação e de filtração da presente invenção, "contínuo" significa que os processos são física e logisticamente integrados de modo a permitir a operação sem interrupção por um período prolongado o suficiente para produzir um produto isolado estéril, livre de partículas, concentrado e parcialmente purificado que contém proteína de interesse. O termo contínuo, conforme usado em referência aos processos da invenção, também significa que um processo não é realizado em lote ou de maneira realmente contínua. Os processos desta invenção são capazes de realizar operação contínua, por exemplo, por períodos prolongados de 1 dia a vários meses sem interromper a operação ou seqüência do processo. Conforme usado nesta invenção, os processos são operados por um período contínuo superior a 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas ou 3, 4, 5, 6 ou mais meses.

Os termos "semicontínuo" e "intermitente" significam que um ou mais processos ou elementos de um sistema integrado operam de maneira descontínua ou em lotes, enquanto outros processos ou elementos do sistema integrado operam de maneira contínua. Por exemplo, em algumas representações da invenção, o processo de purificação é um processo de adsorção/dessorção convectivo, que geralmente requer adsorção da mistura heterogênea de um substrato de adsorção, que resulta na saturação do substrato e que requer o término do processo de adsorção e dessorção ou liberação da fração ligada. Tal processo é peculiarmente intermitente, embora capaz de ser integrado com os processos de fluxo ascendente, que são contínuos.

O termo "adsorção/dessorção convectiva" significa um processo cromatográfico em que a transferência de massa ocorre principalmente por convecção. A adsorção/dessorção convectiva é um processo no qual uma fração de uma mistura que contém uma molécula de interesse é separada de outra fração da mistura, por meio de adsorção de uma fração para um substrato, seguida pela dessorção dessa fração do substrato.

O termo "fluxo cruzado" ou "fluxo cruzado de fluido" significa o fluxo do fluido pelo topo da superfície da membrana.

O termo "integrado", conforme usado em referência a vários sistemas e/ou processos, significa que os sistemas e/ou processos são física e logisticamente conectados de modo a constituírem um sistema unificado capaz de operar continuamente. No contexto do sistema da presente invenção, que se destina a um sistema integrado contínuo ou semicontínuo para produzir uma proteína de interesse livre de partículas, concentrada e parcialmente purificada, um sistema integrado conectará diferentes componentes diretamente e de maneira suficiente para manter condições



estéreis entre os diferentes componentes do sistema. Os termos "meios" (plural) e "meio" (singular) são sinônimos e são usados de maneira intercambiável aqui, e o uso de uma forma do termo não implica na exclusão da outra forma.

5 O termo "mistura" significa combinação heterogênea de moléculas e compostos que contêm uma molécula de interesse, como uma proteína e vários contaminantes. Uma mistura preferida da invenção atual é um fluido de cultura de tecido que consiste em uma mistura heterogênea de proteínas  
10 que inclui uma proteína de exógena de interesse, que é obtida inicialmente de um processo de fermentação de perfusão contínua.

O termo "camada de gel" significa a camada microscopicamente fina de moléculas que pode formar a parte  
15 superior de uma membrana. Ela pode afetar a retenção de moléculas, obstruindo a superfície da membrana e, dessa forma, reduzir o fluxo do filtrado ou, em operação de fluxo constante, aumentar a TMP.

O termo "molécula de interesse" significa partículas  
20 ou outra espécie de molécula que deva ser separada de uma solução ou suspensão em um fluido (por exemplo, um líquido). As partículas ou moléculas de interesse são separadas do fluido e, na maioria dos casos, de outras partículas ou moléculas no fluido. O tamanho da molécula de  
25 interesse a ser separada determinará o tamanho do poro da membrana a ser utilizada. Preferencialmente, as moléculas de interesse são de origem biológica ou bioquímica ou produzidas por processos transgênicos ou in vitro e incluem proteínas, peptídeos, polipeptídeos, anticorpos ou  
30 fragmentos de anticorpos. Exemplos de origens de fluxo de alimentação preferenciais incluem cultura de célula mamífera e cultura de célula de microorganismo como bactérias, fungos e levedura. Também deve ser notado que a espécie a ser filtrada inclui polipeptídeos não desejáveis,

proteínas, componentes celulares, DNA, colóides, micoplasmas, endotoxinas, vírus, carboidratos e outras moléculas de interesse biológico, glicosiladas ou não.

5 O termo "permeado" é usado como sinônimo para filtrado.

10 O termo "produto isolado" significa um produto livre de partícula, concentrado e parcialmente purificado que contém uma proteína de interesse. Um produto isolado é um produto que atingiu um grau de purificação e concentração comparável ao atingido por um processo de ultrafiltração ou adsorção/dessorção convectiva. Um produto isolado não é necessariamente homogêneo, mas será purificado consideravelmente em relação ao produto de massa inicial produzido pelo processo de fermentação.

15 O termo "taxa de fluxo específica" é usado de modo intercambiável com o termo "fluxo do filtrado", pois se refere ao filtrado. A taxa de fluxo específica do retentado é a taxa de fluxo do retentado normalizado na área de membrana usada.

20 Como é usado em relação ao fluxo, o termo "consideravelmente constante" significa que o fluxo é mantido em um nível geralmente constante durante um período considerável no curso da filtração.

25 O termo "fluido de cultura de tecido" significa uma mistura heterogênea de componentes derivados de um meio de cultura de tecido. Em aspectos preferenciais da invenção, o fluido de cultura de tecido é derivado de um processo de fermentação de perfusão contínua. Um fluido de cultura de tecido "clarificado" é um fluido de cultura de tecido que foi pré-filtrado para remover fragmentos de célula e outras macromoléculas grandes.

30 O termo "pressão da transmembrana" e seu acrônimo "TMP" significam a pressão média aplicada do suprimento para o lado do filtrado da membrana. A TMP é calculada por

TMP [bar]=  $[(PF + PR)/ 2] - Pf$  em que PF é a pressão de suprimento, PR a pressão de retentado e Pf é a pressão do filtrado.

5 O termo "recuperação" significa a quantidade de uma molécula de interesse que pode ser recuperada após o processamento. Geralmente expressada como um percentual de material inicial ou produção.

O termo "retentado" significa uma parte da amostra que não passa pela membrana, também conhecido como concentrado.

10 O termo "ultrafiltração" significa uma forma de filtração que utiliza microporos de membranas semipermeáveis para separar preferencialmente os fluidos ou íons na base do tamanho diferencial ou peso molecular. A ultrafiltração geralmente é usada para filtrar moléculas  
15 que têm um peso molecular superior a 10.000 dáltons.

Esta invenção se destina a um processo integrado, contínuo e estéril que consiste na fermentação de perfusão contínua, remoção particulada e purificação/concentração. Em um aspecto da invenção, o processo consiste em filtração  
20 da mistura de cultura do tecido por um processo de separação que separa seletivamente a proteína de interesse da mistura em um ponto de ajuste operacional abaixo do ponto de transição da proteína na região do fluxo que depende da pressão em relação à curva TMP para produzir um  
25 produto isolado estéril, livre de partículas, concentrado e parcialmente purificado, no qual a taxa de fluxo específica por meio do processo é mantida consideravelmente constante em um nível inferior ao do ponto de transição da proteína.

Em outro aspecto da invenção, o processo é um processo  
30 contínuo que consiste em: (a) produção contínua por fermentação de perfusão contínua e mistura fluida de cultura de tecido heterogênea que contém uma proteína de interesse; (b) transferência contínua da mistura fluida de cultura de tecido para um processo de remoção de partícula

integrado ao sistema de fermentação de perfusão contínua;  
(c) remoção contínua de contaminantes particulados do  
fluido de cultura de tecido no processo de remoção de  
partículas para produzir continuamente um fluido de cultura  
5 de tecido clarificado que contém a proteína de interesse;  
(d) transferência continuamente do fluido de cultura de  
tecido clarificado para um processo de purificação  
integrado com o sistema de remoção de partícula; e (e)  
separação contínua da proteína de interesse do fluido de  
10 cultura de tecido clarificado no sistema de purificação  
para produzir continuamente um produto isolado estéril,  
livre de partícula, concentrado e parcialmente purificado  
que contém a proteína de interesse.

Ainda em outro aspecto da invenção, o processo é um  
15 processo semicontínuo que consiste em: (a) produção  
contínua por fermentação de perfusão contínua de uma  
mistura fluida de cultura de tecido heterogênea que contém  
uma proteína de interesse; (b) transferência contínua da  
mistura fluida de cultura de tecido para um processo de  
20 remoção de partícula integrado com o sistema de fermentação  
de perfusão contínua; (c) remoção contínua de contaminantes  
particulados do fluido de cultura de tecido no processo de  
remoção de partícula para produzir continuamente um fluido  
de cultura de tecido clarificado que contém a proteína de  
25 interesse; (d) transferência contínua do fluido de cultura  
de tecido clarificado para um tanque de amortecimento  
integrado com o processo de remoção de partícula; (e)  
transferência intermitente do fluido de cultura de tecido  
clarificado para um processo de purificação integrado com o  
30 tanque de amortecimento; e (e) separação da proteína de  
interesse do fluido de cultura de tecido clarificado para  
produzir um produto isolado estéril, livre de partícula,  
concentrado e parcialmente purificado que contém a proteína  
de interesse, em que a taxa de fluxo específica da mistura

através do processo de fermentação de perfusão contínua e processo de remoção contínua de partícula é mantida consideravelmente constante e em média igual ao rendimento pela média de tempo do processo de purificação integrado semicontínuo.

#### Dispositivos para prática dos métodos da invenção

Esta invenção também se destina a um aparelho para separar uma proteína de interesse de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea. Em geral, o aparelho consiste em: (a) um sistema de fermentação de perfusão contínua; (b) um sistema de remoção contínua de partículas integrado ao sistema de fermentação de perfusão; e (c) um sistema de purificação contínua integrado ao sistema de remoção de partícula, em que o aparelho é adaptado para manter condições estéreis. Em outro aspecto da invenção, o aparelho consiste em: (a) um sistema de fermentação de perfusão contínua; (b) um sistema de remoção contínua de partículas integrado ao sistema de fermentação de perfusão; e (c) um sistema de purificação intermitente integrado ao sistema de remoção de partícula, em que o aparelho é adaptado para manter condições estéreis. O sistema de purificação pode, por exemplo, ser um sistema de ultrafiltração ou um sistema convectivo de adsorção/dessorção, ou qualquer outro sistema capaz de purificar ou purificar parcialmente uma proteína de interesse proveniente de uma mistura heterogênea em um sistema integrado, contínuo ou semicontínuo estéril conforme descrito aqui.

O processo e o aparelho da invenção são adaptados para permitir o processamento contínuo de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea a uma taxa de fluxo consideravelmente constante. Em um aspecto particular da invenção, o processo e o aparelho da invenção são adaptados para permitir o processamento contínuo de uma mistura

fluida de cultura de tecido heterogênea a uma taxa de fluxo consideravelmente constante abaixo do ponto de transição da proteína na região do fluxo que depende da pressão em relação à curva de TMP por um período contínuo e durante  
5 todo o processo de purificação.

Em representações específicas, a invenção fornece dois novos dispositivos (A, B) que são compostos de três elementos distintos, mas totalmente integrados, todos com uma função essencial e que, juntos, formam uma plataforma  
10 de sistema de isolamento contínuo de proteína que soluciona os problemas com a arte antecedente descrita acima.

Os três elementos distintos de cada dispositivo são, em primeiro lugar, um sistema integrado de remoção contínua de partícula (100), em segundo lugar, um tanque de amortecimento estéril (200) e, em terceiro lugar, um  
15 sistema integrado de concentração/purificação (300, 400, respectivamente). Todos os três elementos e os dispositivos e métodos recentes desenvolvidos para uso desses dispositivos são descritos em detalhes a seguir.

Para fornecer concentração/purificação contínua ou semicontínua do produto de proteína, o dispositivo inventivo A (do qual são mostradas duas representações na Figura 2) consiste em um sistema de ultrafiltração estéril integrado contínuo (300), enquanto o dispositivo inventivo  
20 B (do qual são mostradas duas representações na Figura 3) consiste em um sistema de adsorção/dessorção integrado semicontínuo convectivo (400).

Os dispositivos da invenção estão diretamente integrados com um ou mais fermentadores de perfusão contínua e, assim,  
25 formam uma plataforma de fabricação integrada contínua.

#### DISPOSITIVO A

##### Sistema integrado de remoção contínua de partícula (100)

A figura 2 mostra duas representações do dispositivo inventivo A. O sistema integrado de remoção contínua de

partícula (100) está diretamente conectado no lado da colheita do sistema de fermentação de perfusão contínua (1).

A figura 4 mostra uma representação esquemática mais detalhada de uma representação do sistema integrado de remoção contínua de partícula (100), que consiste em uma bomba (101), um manômetro ou transmissor, respectivamente (107), um coletor (102) e um conjunto de várias séries de filtros (103). Todos os componentes estão conectados com tubulação flexível e/ou tubulação rígida.

A bomba (101) é uma bomba peristáltica, que permite bombeamento suave da colheita de cultura de célula sem qualquer parte giratória ou vedação entre em contato com o produto estéril. A bomba e a tubulação da bomba é dimensionada para fornecer a taxa de fluxo de colheita desejada do sistema de fermentação de cultura de célula, que é de até 15 volumes de biorreator por dia, por exemplo, até 9,4 litros/hora para um fermentador de 15 litros e até 125 litros/hora para um fermentador de 200 litros.

O manômetro ou transmissor de pressão (107) é designado de modo que possa ser esterilizado com uso de autoclave ou irradiação. No projeto atual, é usado um transmissor piezorresistivo reutilizável em um compartimento de aço inoxidável ou um manômetro reutilizável de aço inoxidável. Entretanto, aperfeiçoamentos futuros podem incluir o uso de transmissores descartáveis que podem ser facilmente esterilizados por irradiação.

Em uma representação atual o coletor de conexão (102) consiste em tubulação flexível, com braçadeiras de tubulação (ou válvulas) e conectores estéreis apropriados para permitir a conexão de conjuntos de série de filtros adicionais sem comprometer a esterilidade do sistema. Preferencialmente, os diâmetros da tubulação são

dimensionados para produzir velocidades de fluido linear de aproximadamente 2 m/s ou menos com taxas de fluxo desejadas, evitando pressões de retorno elevadas e corte. Em outra representação atual, em vez dos conectores estéreis, são usadas peças de tubulação flexível especial que podem ser soldadas com soldadores de tubulação comerciais sem comprometer a esterilidade. Essas peças de tubulação são fabricadas em PVC ou outros polímeros adequados.

O conjunto de série de filtros (103) consiste em pelo menos duas, preferencialmente várias séries de filtros idênticas (conforme mostrado no esquema), com apenas uma das séries de filtros aberta em um determinado período, conforme mostrado em um exemplo na Figura 4 (105).

Cada série de filtros consiste em pelo menos um filtro, preferencialmente um pré-filtro e um filtro final em série (conforme mostrado na Figura 4). Caso seja necessário aumentar a capacidade para uma aplicação específica, cada série de filtro (105, 106, etc.) também pode consistir em vários filtros ou séries de filtros paralelamente (não mostrados).

Em uma representação da invenção mostrada na Figura 4, a segunda série do filtro do conjunto (106) é fechada por um disco de ruptura sensível à pressão, ou pino de ruptura, respectivamente (104). Em operação, a função do disco de ruptura, ou pino de ruptura, é abrir automaticamente o caminho de fluxo para a segunda série de filtros (107) uma vez que a pressão na primeira série de filtros (105) atinge um limite especificado, assegurando a continuação ininterrupta do processo de filtração. Os discos de ruptura ou pinos de ruptura comercialmente disponíveis são utilizados no sistema inventivo, que são usados para fornecer alívio de pressão de segurança. Na representação atual, os discos de ruptura ou pinos de ruptura com um



limite de pressão de ruptura especificado de não mais que 16 PSI são usados, o que provou ser muito útil. Entretanto, um intervalo de limite de pressão especificada é possível.

5 Cada série de filtros do conjunto de série de filtros também é separada por uma válvula manual ou automática e outro disco de ruptura ou pino de ruptura. Depois que a segunda série de filtros (106) está em operação, a válvula para o próximo disco de ruptura ou pino de ruptura, respectivamente, é aberta para que a próxima série de  
10 filtros possa atuar como uma reserva e assim por diante.

Em uma representação alternativa, as válvulas operadas automaticamente são usadas exclusivamente e, em operação, um sistema de controle opera as válvulas com base na entrada de um sensor de pressão piezorresistivo (107) que  
15 também pode ser esterilizado por autoclave. Entretanto, os requerentes constataram que este projeto, que consiste no disco de ruptura ou pino de ruptura, respectivamente, fornece robustez notável em operação de longo prazo.

A classificação do filtro final é de pelo menos 3  $\mu\text{m}$  ou menor, preferencialmente 0,45  $\mu\text{m}$  e, ainda preferencialmente, 0,2  $\mu\text{m}$ . A série de filtros operacionais (6) retém todas as células restantes, bem como, fragmentos de célula relevantes e outras partículas, resultando em um fluxo de saída livre de partículas (9), o fluido de cultura  
20 de tecido clarificado (CTCF).

Diferentes materiais de filtro disponíveis comercialmente podem ser usados. No projeto atual, as cápsulas de filtro descartáveis são usadas, como cápsulas de pré-filtro Sartopure ou Sartoclear (Sartorius,  
30 Goettingen) e cápsulas de filtro final Sartobran (Sartorius, Goettingen), que podem ser esterilizadas por autoclave e irradiação.

Como exemplo de uma representação atual do dispositivo inventivo, designado para uma taxa de fluxo de 1 litro/min,

cada série de filtros (105, 106, etc.) do conjunto (103) consiste em 3 cápsulas de pré-filtro de 30" (Kleenpak Ultipleat, Pall Corp., 4,5 um classificado, 0,75 m<sup>2</sup> cada) seguido por 3 cápsulas de filtro final de 20" (Sartobran P, Sartorius, 0,45 um/0,2um classificado, 1,3 m<sup>2</sup> cada). Esta representação em particular foi considerada particularmente útil para fabricação em larga escala de Fator VIII de coagulação sangüínea recombinante, bem como variantes de FVIII geneticamente projetadas que incluem o FVIII excluído de domínio B.

Entretanto, os requerentes constataram que, ao usar o dispositivo e o método inventivos, a eficiência da remoção de partícula, com vários materiais de filtro disponíveis e configurações de diferentes fabricantes (Pall, Sartorius, Cuno), é consistente e significativamente melhorada quando comparada aos respectivos processos convencionais por lote.

Portanto, os novos dispositivo e processo inventivos também serão benéficos para uso com novos tipos e geometrias de filtro, por exemplo, com tipos de filtro que aumentem a área de filtro disponível por cápsula, bem como com tipos de filtro que forneçam um padrão de fluxo cruzado ou outros meios para minimizar o solidificado composto, como vibração ou rotação do elemento do filtro.

Em outra representação do processo inventivo, o conjunto da série de filtros (103) consiste apenas em uma série de filtros de reserva estéreis fechada por um disco de ruptura ou pino de ruptura, respectivamente, mas várias séries de filtros fixos para operação. A primeira série de filtros do conjunto é operada até que um volume de carregamento predeterminado especificado tenha sido processado, após o qual a operação é comutada (manual ou automaticamente) para a próxima série de filtros no conjunto. O volume de carregamento específico é especificado para que, sob condições operacionais normais,

o limite de pressão do disco de ruptura ou pino de ruptura não seja excedido. Entretanto, se a pressão aumentar acima do normal durante a filtração, por exemplo, em razão de uma capacidade de filtração raramente baixa da colheita, a série de filtros de reserva garante novamente a filtração contínua ininterrupta, abrindo-se, uma vez que a pressão especificada seja excedida. Após a abertura da série de filtros de reserva, a filtração é comutada para outra série de filtros do conjunto, e outra série de filtros de reserva com disco de ruptura ou pino de ruptura é instalada sem comprometer a esterilidade do sistema.

É de conhecimento por especialistas na área que, para manter os custos do filtro e os tempos de processamento para processos de remoção de partícula em lote no mínimo, as séries de filtros em lote precisam ser dimensionadas para que tenham a menor área de filtro possível necessária para fornecer a taxa de fluxo absoluta desejada (em litros/hora) e pressão máxima. A taxa de fluxo absoluta desejada, por sua vez, deve ser alta o suficiente para fornecer tempos de processamento praticáveis para o volume de lote desejado. Ela deve ser uma taxa de fluxo elevada específica (em litros/hora/m<sup>2</sup> ou área de filtro).

Em contraste a um sistema de filtração em lote otimizado comparável, o dispositivo inventivo é designado para taxa de fluxo específica várias vezes menores, que é mantida constante (em litros/hora/m<sup>2</sup> de área de filtro instalada) para que a taxa de fluxo absoluta seja igual à taxa de fluxo de colheita da fermentação de perfusão contínua.

Os requerentes constataram inesperadamente que nessas baixas taxas de fluxo específicas o volume que pode ser processado por meio de um filtro é desproporcionalmente mais alto do que as taxas de fluxo ajustadas em processos de lote.

É importante notar que em processos de isolamento de lote convencionais, essas taxas de fluxo específicas baixas não seriam praticáveis em razão de áreas de filtração extremas (e, portanto, custos extremos) ou muito baixas para uma taxa de fluxo absoluta. Isso ocorre principalmente porque, na maioria das vezes, o equipamento de remoção de partícula em lote permanece inativo enquanto a colheita é realizada para o próximo lote. Além disso, o surpreendente aumento desproporcional na capacidade de filtro que pode ser atingida do método inventivo permite uma redução significativa no consumo de filtro e, portanto, nos custos de fabricação.

#### Tanque de Amortecimento (200)

A saída do sistema integrado de remoção contínua de partículas é direta e constantemente ligada a um tanque de amortecimento (201), conforme mostrado na Figura 2. Esse tanque de amortecimento é um tanque estéril, como uma bolsa descartável ou um tanque de aço inoxidável com pelo menos uma porta de entrada e uma porta de saída, a última preferencialmente na parte inferior do tanque. Uma ampla variedade de tamanhos e projetos de tanques pode ser utilizada. Entretanto, o tanque de amortecimento é preferencialmente dimensionado para que seja pequeno se comparado ao rendimento volumétrico do sistema, para manter o tempo de permanência do produto no tanque o mínimo possível, ou seja, menos de 24 horas, preferencialmente, menos de 8 horas e, na melhor das hipóteses, menos de 4 horas.

Os requerentes constaram que esses baixos tempos de permanência do produto, exclusivamente em razão dos dispositivos inventivos, permitem o aumento significativo na produção para produtos de proteína peculiarmente instáveis, solucionando os problemas da arte antecedente.

Em algumas representações dos dispositivos inventivos,

o tanque de amortecimento está localizado em uma célula de equilíbrio ou de carga (202), conforme mostrado para o dispositivo B1 e B2 na Figura 3. Essa célula de equilíbrio ou carga fornece um sinal de peso a um sistema de controle computadorizado (não mostrado).

Além disso, em uma representação dos dispositivos inventivos (B2), um tanque de tamponamento (204) está conectado por meio de uma bomba peristáltica (203) ao tanque de amortecimento. Na operação, essa configuração é usada para ajustar as propriedades do fluxo de colheita livre de partículas, como condutividade (resistência iônica) ou pH, acrescentando tampão ou diluente adequado. Neste caso, são usados um sistema de mistura opcional (205) e sensores para monitorar a condição desejada (206), como pH ou condutividade. No projeto atual, um agitador conectado magneticamente é usado; mas outros sistemas de mistura, como dispositivos batedores ou pulsadores poderiam ser usados também.

#### Concentração/purificação contínua integrada (300)

O dispositivo A, duas representações das quais são mostradas na figura 2, consiste em um sistema de ultrafiltração contínua, estéril e integrado (300). As representações do sistema de ultrafiltração contínua estéril consistem em uma bomba de reciclagem (301) e um conjunto de reciclagem (306), um ou mais módulos de ultrafiltração de fluxo cruzado estéril (303), uma bomba de permeado (305), um tanque de recebimento de permeado estéril (307) em uma célula de equilíbrio ou carga (309) e uma bomba de retentado (311). Além disso, consiste em instrumentação na forma de um manômetro ou transmissor de entrada (302), manômetro ou transmissor de permeado (304), manômetro ou transmissor de saída (308), bem como um medidor de fluxo de reciclagem (310). Na operação, a saída do sistema (312) fornece um fluxo contínuo de produto

concentrado e parcialmente purificado, que pode ser coletado, congelado ou processado continuamente.

A representação inventiva A2 consiste ainda em um tanque de tamponamento ou diluente (314), uma bomba peristáltica de adição de tampão/diluente (313), além de  
5 sensores através de fluxo para monitorar o condicionamento do concentrado no conjunto de reciclagem, como sensores para pH e condutividade (315, 316). Na operação, essa configuração é usada para ajustar as propriedades do fluxo  
10 de colheita livre de partículas, como condutividade (resistência iônica) ou pH, acrescentando tampão ou diluente adequado. Essa configuração também pode ser usada para adicionar estabilizadores de proteína. Embora na representação inventiva A2 o próprio conjunto de reciclagem  
15 atue como uma câmara de mistura, o condicionamento também pode ser executado como alternativa, usando uma configuração de tanque de amortecimento conforme mostrada para o dispositivo B (representação B2), que consiste nos componentes (203, 204, 205, 206) conforme será descrito  
20 posteriormente nesta divulgação (consulte a descrição do dispositivo B).

As representações do dispositivo inventivo também consistem em um sistema de controle programável e de registro de dados que registra os sinais de dados de  
25 entrada provenientes dos instrumentos (como pressões, taxa de fluxo, peso do tanque, pH, condutividade, sem se limitar a eles) e controla as velocidades da bomba de acordo com o algoritmo de controle predefinido.

Todas as bombas (301, 305, 311, 313) são bombas  
30 peristálticas que permitem o bombeamento dos respectivos fluxos de fluido sem que qualquer parte giratória ou vedação entre em contato com o fluxo de produto estéril. Os requerentes constataram que esse procedimento é preferencial para fornecer operação estéril de longo prazo.

Entretanto, outros projetos de bombas estéreis podem ser principalmente utilizados. A bomba de reciclagem (301), e sua tubulação de bomba, é dimensionada para permitir ajuste rigoroso de taxas de fluxo cruzado desejadas entre 80 e 800  
5 litros/hora por  $m^2$  de área de membrana instalada, dependendo das características de transferência de massa do módulo de ultrafiltração usado. A bomba do permeado é dimensionada para permitir ajuste rigoroso e preciso de um fluxo de permeado específico entre 90% e 99% da taxa de  
10 fluxo de colheita proveniente da fermentação de perfusão contínua. A bomba do retentado é dimensionada para permitir ajuste rigoroso e preciso de um fluxo de retentado específico entre 1% e 10% da taxa de fluxo de colheita proveniente da fermentação de perfusão contínua.

15 Os módulos de ultrafiltração encapsulada (303) são usados para permitir operação estéril rigorosa e são esterilizados por autoclave ou irradiação. O corte ideal de peso molecular nominal é escolhido com base no peso molecular do produto de proteína de interesse e deve ser  
20 confirmado por experimentos padrão conhecidos por especialistas na arte. Vários materiais para membrana, como polietersulfona, polietersulfona hidrofílica ou celulose regenerada, podem ser usados, enquanto o módulo de membrana inteiro pode ser esterilizado por irradiação e/ou autoclave  
25 sem danificar a membrana. É esperado que os materiais hidrofílicos possam aumentar a eficiência em razão de suas baixas tendências de entupimento.

Os requerentes constataram que o dispositivo A será exclusivamente eficiente se a área em metros quadrados da  
30 membrana de ultrafiltração total instalada for igual a um intervalo entre 0,1 a 2 vezes a taxa de fluxo volumétrico da colheita proveniente da fermentação de perfusão contínua em litros/hora. Por exemplo, para uma taxa de fluxo de colheita de perfusão de 1 litro/hora, a área de membrana

total instalada deve estar entre 0,1 e 2 metros quadrados. Os requerentes constataram que o dispositivo A será ainda muito eficiente se a área, da membrana de ultrafiltração instalada, em metros quadrados, for igual a um intervalo  
5 entre 0,3 a 1 vez a taxa de fluxo volumétrico da colheita proveniente da fermentação de perfusão contínua em litros/hora.

Em uma representação da invenção, os módulos de membrana de fibra ocos "descartáveis" (GE Healthcare,  
10 anteriormente Amersham Biosciences) são usados. Entretanto, vários projetos de membranas e módulos encapsulados podem ser usados, como módulos enrolados espirais, cartuchos encapsulados ou cápsulas com transferência de massa aprimorada em razão de padrões de fluxo secundários (por  
15 exemplo, fluxo de vórtice), elementos giratórios (por exemplo filtros de disco dinâmicos) ou filtros de vibração. É esperado que os cartuchos de ultrafiltração encapsulados possam ser usados benéficamente nos dispositivos inventivos, pois fornecem coeficientes elevados de  
20 transferência de massa com taxa de fluxo cruzado necessária relativamente baixa, reduzindo a capacidade da bomba, enquanto mantém a complexidade do sistema e baixos custos de investimento.

O dispositivo inventivo permite operação, não apenas  
25 contínua, mas também realmente estéril, ao contrário da operação apenas asséptica. Os requerentes obtiveram isso projetando componentes de sistema de contato com o produto para resistir não apenas à limpeza, mas também à esterilização por autoclave, vapor ou irradiação gama. Nas  
30 representações atuais, os módulos encapsulados descartáveis são usados para remoção contínua de partícula (100), bem como ultrafiltração contínua (300). As bombas peristálticas são usadas para evitar que qualquer produto entre em contato com os elementos giratórios e vedações mecânicas.



Além disso, nas representações atuais, a tubulação descartável e os conjuntos da bolsa são usados no lugar da tubulação rígida. Os componentes descartáveis que entram em contato com o produto (por exemplo, tubulação, bolsa, módulos) ou grupos de componentes são pré-montados e esterilizados juntos, simplificando a inicialização e a operação. Os sistemas são projetados para manter qualquer abertura potencial do sistema estéril para o ambiente (por exemplo gabinete de fluxo laminar) como para troca de amostragem, bolsa ou instrumentação no mínimo. Nas representações presentes do dispositivo, os coletores são projetados de forma redundante para permitir a comutação de um componente estéril (por exemplo, bolsa de recebimento de produto) para o próximo sem abrir. A troca adicional de tubulação, módulos ou bolsas é preferencialmente realizada usando soldadores de tubulação estéreis, e não conectores estéreis.

Outras representações futuras de dispositivos inventivos também podem consistir em componentes como tanques de aço inoxidável, compartimentos ou tubulação de filtro que possam ser esterilizados no lugar, isoladamente ou em combinação com componentes descartáveis, para que o vigor e a esterilidade em operação de longo prazo sejam garantidos.

As representações adicionais de dispositivo inventivo A foram projetadas para processar material de vários fermentadores em fábricas maiores (A3). Um exemplo é mostrado na figura 5 em um esquema. As representações adicionais são projetadas para aumentar o fator de concentração geral e o desempenho de separação, combinando 2 estágios de sistemas de ultrafiltração contínua (300) em série (A4, mostrado no esquema da figura 5).

#### Descrição de método de uso do dispositivo A

As fermentações de perfusão contínua são operadas por

um longo período (uma campanha), geralmente entre 2 semanas e 6 meses ou mais. O fluido de cultura de tecido (TCF) que contém o produto, células e fragmentos de célula é continuamente processado, usando o dispositivo A. Um fluxo de produto estéril, livre de partículas, concentrado e parcialmente purificado (o "produto isolado") é produzido e sai continuamente do dispositivo e sua saída (312). Usando a bomba (101) do sistema de remoção contínua de partículas estéreis (100) a colheita é bombeada continuamente através do conjunto de filtração (103) na taxa de fluxo de colheita de perfusão desejada  $Q_h$  da fermentação.

O fluxo de saída do sistema de filtração contínua, ou seja o fluido de cultura de tecido clarificado (cTCF), entra continuamente no tanque de amortecimento (201). Do tanque de amortecimento, o cTCF é continuamente processado por um sistema de ultrafiltração contínua, estéril (300) a uma taxa de fluxo igual à taxa de fluxo proveniente da fermentação de perfusão contínua. Em razão do tamanho pequeno do tanque de amortecimento em relação às taxas de fluxo ajustadas, o tempo de permanência do médio do produto no tanque é mantido no mínimo, ou seja, abaixo de 12 horas, preferencialmente, abaixo de 4 horas e, na melhor das hipóteses, abaixo de 2 horas.

O fluxo cruzado adequado e a transferência de massa são ajustados no módulo de ultrafiltração por meio de bomba de reciclagem (301). A taxa do fluxo retentado é ajustada e controlada usando a bomba de retentado (311), produzindo uma taxa de fluxo constante e contínua  $Q_i$  do produto isolado concentrado que sai do dispositivo A por sua saída (312). A bomba de permeado (305) é usada para ajustar e controlar a taxa de fluxo  $Q_p$  do permeado, que é retirado continuamente pela lateral do(s) módulo(s) de ultrafiltração de permeado e que consiste em água e componentes de soluções pequenos o suficiente para passar

através da membrana de ultrafiltração (por exemplo, sais, pequenas proteínas). As taxas de fluxo de permeado ( $Q_p$ ) e de retentado/isolado ( $Q_i$ ) são cuidadosamente ajustadas e controladas para corresponder à taxa de fluxo de colheita

5  $Q_h$  da fermentação para que:

$$Q_p + Q_i = Q_h$$

Ao mesmo tempo, as taxas de fluxo são ajustadas e controladas para que um fator de concentração desejado  $cf$  seja obtido, de modo que:

10  $Q_i = 1/cf * Q_h$

Por exemplo, para atingir o fator de concentração de produto desejado de 10 vezes no isolado na concentração de colheita inicial,  $Q_i$  é controlado a  $Q_i = 1/10 * Q_h$ , usando a bomba de retentado/isolado (311), enquanto  $Q_p$  é controlado

15 a  $Q_p = 0,9 * Q_h$ , usando a bomba de permeado (305).

Visto que as taxas de fluxo de saída são controladas pelas bombas (305) e (311), o sistema de ultrafiltração retira automaticamente um fluxo de  $Q_p + Q_i$  do pequeno tanque de amortecimento (201).

20 No caso de usar a representação A2 (consulte a Figura 2 no lado direito), um fluxo estéril de tampão ou água para injeção proveniente do tanque 314 é acrescentado ao sistema de ultrafiltração contínua a uma taxa de fluxo constante  $Q_b$ , usando a bomba de adição de tampão (313). Portanto, as

25 condições do isolado podem ser livremente e continuamente ajustadas, por exemplo em termos de resistência iônica, pH, adição de estabilizadores, etc. As taxas de fluxo são controladas a

$$Q_p + Q_i = Q_h + Q_b$$

30 Além disso, as proporções da taxa de fluxo podem ser escolhidas para que um fator de concentração desejado  $cf$  seja obtido, de modo que  $Q_i = 1/cf * (Q_h + Q_b)$ . Como alternativa, este processo pode ser usado para apenas alterar condições (por exemplo, pH, condutividade),

ajustando  $Q_i = Q_h + Q_b$ .

O novo método de uso do dispositivo A também contrasta com os processos em lote UF (arte antecedente) em termos de ponto de ajuste operacional da própria ultrafiltração. Os processos UF em lote convencionais são projetados para um determinado rendimento por meio da área de membrana inferior em um curto período. O UF em lote geralmente é operado no ponto de transição de pressão dependente para a região controlada pela transferência de massa (consulte a Figura 9). Isso leva a um fluxo específico inicial desejavelmente alto, que cai significativa e rapidamente durante o curso de segundos para minutos, pois a polarização da concentração leva rapidamente à pressão de retorno osmótica e à formação de camada de gel de limitação (membrana secundária). Tal concentração elevada de macromoléculas na parede também leva a uma adsorção maior de compostos para a superfície interna e externa da membrana, ou seja para entupimento da membrana. Esse entupimento reduziria o fluxo do permeado com o passar do tempo.

Os requerentes constataram surpreendentemente que com o dispositivo A, muitas vezes, as capacidades de carregamento geral mais elevadas por área de membrana de ultrafiltração instalada são obtidas, operando-se na extremidade inferior da curva de fluxo de pressão (consulte a figura 9):

A concentração normalizada da parede  $c_{parede}$  de um componente totalmente retido pode ser descrita como segue:

$$c_{parede} = e^{\frac{J}{k_d}} \cdot c_{massa}$$

com

$J$  = fluxo de permeado específico em litros/hora/m<sup>2</sup>

$k_d$  = coeficiente de transferência de massa em

litros/hora/m<sup>2</sup>

$c_{\text{massa}}$  = concentração do componente na massa da solução

Como no UF em lote, o UF contínuo é operado no  
 5 coeficiente de transferência de massa otimizado para  
 minimizar a polarização da concentração. Entretanto, em  
 contraste com a ultrafiltração em lote, os requerentes  
 ajustam o fluxo do permeado  $J$  para a extremidade inferior  
 da curva de fluxo de pressão (consulte a Figura 9). Como  
 10 resultado da relação exponencial, a concentração da parede  
 $c_{\text{parede}}$  na superfície da membrana é significativamente  
 menor do que seria na ultrafiltração em lote. Por exemplo,  
 a presente representação do método inventivo ajusta um  
 fluxo de permeado específico de destino de aproximadamente  
 15 1/10 do coeficiente de transferência de massa que pode ser  
 obtido, ajustando uma concentração de parede de apenas 10%  
 acima da concentração de massa (ou retentado) ajustada.

A Tabela 1 a seguir mostra um exemplo de um método  
 para usar o dispositivo A (representação A1) para  
 20 isolamento contínuo de um produto de proteína de um  
 fermentador de escala de desenvolvimento:

Tabela 1

Exemplo de método para usar uma representação atual de  
 dispositivo A para isolamento contínuo de um produto de  
 25 proteína de fermentação de perfusão contínua.

| Parâmetro operacional                                                                 | Alvo                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Taxa de fluxo de colheita $Q_h$<br>de perfusão contínua<br>(controlada com bomba 101) | 5 litros/hora<br>(120 litros/dia) |
| Taxa de fluxo de permeado $Q_p$<br>(controlado com bomba 305)                         | 4,75 litros/hora                  |
| Retentado (isolado de<br>produto) taxa de fluxo $Q_i$<br>(controlado com bomba 311)   | 0,25 litros/hora                  |

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| Fluxo permeado específico J | 2 litros/hora/m <sup>2</sup> |
| Fator de concentração cf    | 20 vezes                     |

Para cada molécula de produto individual, os critérios de vida útil podem ser definidos para a configuração de ultrafiltração contínua estéril, ou seja, com base na pressão da transmembrana. Depois de exceder o limite de pressão da transmembrana, a configuração de ultrafiltração estéril contínua é intercambiada com outra configuração idêntica sem comprometer a integridade e a esterilidade do sistema. Isso pode ser feito em analogia à configuração de filtração contínua, estéril, usando os coletores e os conectores estéreis ou usando a tubulação flexível descartável e os soldadores de tubulação estéril.

#### Dispositivo B

##### Sistema integrado de remoção contínua de partícula (100)

A figura 3 mostra duas representações do dispositivo inventivo B. O sistema integrado de remoção contínua de partícula (100) está diretamente conectado no lado da colheita do sistema de fermentação de perfusão contínua (1). Essa parte do dispositivo B é idêntica ao dispositivo A (consulte a descrição detalhada do dispositivo A e a Figura 4, acima).

##### Tanque de Amortecimento (200)

A saída do sistema integrado de remoção contínua de partículas é direta e constantemente ligada a um tanque de amortecimento (201), conforme mostrado na Figura 3. Esse tanque de amortecimento é um tanque estéril, como uma bolsa descartável ou um tanque de aço inoxidável com pelo menos uma porta de entrada e uma porta de saída, a última preferencialmente na parte inferior do tanque. Uma ampla variedade de tamanhos e projetos de tanques pode ser utilizada. Entretanto, o tanque de amortecimento é preferencialmente dimensionado para que seja pequeno se comparado ao rendimento volumétrico do sistema, para manter

o tempo de permanência do produto no tanque baixo, ou seja, menos de 26 horas, preferencialmente, menos de 12 horas e, na melhor das hipóteses, menos de 4 horas.

No dispositivo B, o tanque de amortecimento está localizado em uma célula de equilíbrio ou de carga (202), conforme mostrado para as representações B1 e B2 na Figura 3. Essa célula de equilíbrio ou carga fornece um sinal de peso a um sistema de controle computadorizado (não mostrado).

Além disso, em uma representação do dispositivo inventivo (B2), um tanque de tamponamento (204) está conectado por meio de uma bomba peristáltica (203) ao tanque de amortecimento. Em operação, essa configuração é usada para ajustar as propriedades do fluxo de colheita livre de partícula, como condutividade (resistência iônica) ou pH, acrescentando componentes para modificar as propriedades do tecido clarificado cultivado, recebido do sistema de remoção de partículas, como um tampão ou diluente adequado, ou um estabilizador de proteína adequado. Neste caso, uma representação atual também consiste em um sistema de mistura (205) e sensores para monitorar a condição desejada (206), como pH ou condutividade. Na representação atual, um agitador conectado magneticamente é usado; mas outros sistemas de mistura, como dispositivos batedores ou pulsadores poderiam ser usados também.

Em outra representação do dispositivo inventivo, são usados dois tanques de amortecimento. Em qualquer período, um tanque de amortecimento é conectado diretamente ao sistema de remoção contínua de partícula (100), recebendo fluido clarificado, enquanto o outro está conectado ao sistema de concentração/purificação semicontínuo (400), alimentando um ciclo de adsorção/dessorção convectivo. A comutação entre ambos é realizada por meio de um sistema de

controle, usando o peso do tanque de recebimento para acionar uma troca depois que o volume máximo de preenchimento é atingido.

Concentração/purificação semicontínua integrada (400)

5 O dispositivo B, duas representações das quais são mostradas na figura 3, consiste em um sistema de adsorção/dessorção convectiva semicontínua integrada (400).

10 O sistema de adsorção/dessorção convectiva semicontínua integrado é projetado e dimensionado para que sua taxa de fluxo de carga ( $Q_{\text{carga}}$ ) seja significativamente mais elevado do que a taxa de fluxo do processo de colheita por perfusão contínua e filtração contínua ( $Q_h$ ), ou seja  $Q_{\text{carga}} \gg Q_h$ .

15 As representações do sistema de concentração/purificação semicontínua integrado (400) consistem em uma bomba de carga (401), um conjunto de válvula de várias portas (402) e vários tanques de tamponamento (404), uma válvula de três vias (403) conectada a um tanque de recebimento de refugo estéril (413) e um ou mais módulo adsorvente convectivo (406),  
20 manômetros ou transmissores de entrada e saída (405, 408), instrumentação adicional como sensor UV (409), sensores de pH e de condutividade (409, 410), medidor de fluxo (412), bem como outra válvula de três vias (407) conectada também  
25 ao tanque de refugo (413) e à saída de eluado do produto (414).

As representações do dispositivo inventivo também consistem em um sistema de controle programável e de registro (não mostrado) que registra os sinais de dados de  
30 entrada provenientes dos instrumentos (como pressões,  $UV_5$ , pH, condutividade, peso do tanque de amortecimento, sem se limitar a eles) e controla as válvulas e a bomba automáticas de acordo com os protocolos programados.

A bomba de carga (401) é preferencialmente uma bomba



peristáltica para evitar contato direto do produto ou dos tampões estéreis com qualquer vedação ou peça mecânica. Os requerentes constataram que esse procedimento é preferencial para fornecer operação estéril de longo prazo.

5 Entretanto, outros projetos de bombas estéreis podem ser principalmente utilizados. A bomba de carga é dimensionada, dependendo do volume matriz instalado do adsorvente convectivo (406) para permitir ajuste rigoroso de pelo menos 12 volumes/minuto da matriz. Por exemplo, em uma  
10 representação atual, as cápsulas adsorventes Mustang (Pall Corp.) da membrana são usadas para que tenham um volume matriz de aproximadamente 0,3 litros. Portanto, a bomba de carga é dimensionada para permitir as taxas de fluxo de carregamento de até 3,6 litros/minutos.

15 A função do conjunto de válvula de várias portas (402) é permitir a comutação entre a carga que contém o produto retirada do tanque de amortecimento (201) e cada um dos tampões estéreis e soluções de limpeza dos tanques de tamponamento estéreis (404). As representações atuais do  
20 dispositivo B usam uma série de válvulas de pinçamento, que pinçam a tubulação flexível conectada a cada tanque de tamponamento de fora para fechar e abrir cada linha. Os requerentes constataram que essas válvulas de pinçamento fornecem uma solução particularmente benéfica para o  
25 dispositivo B visto que evitam que qualquer produto entre em contato e, portanto, não precisa ser limpo ou esterilizado. Entretanto, uma ampla faixa de válvulas comerciais adequadas para o processamento estéril e conhecida por profissionais familiarizados com a área podem  
30 ser usadas, como válvulas atuadas de membranas.

Na representação atual, as válvulas de três vias (403, 407) são válvulas atuadas de membrana que podem ser esterilizadas por autoclave. Entretanto, várias válvulas comerciais adequadas para o processamento estéril podem ser

principalmente usadas, incluindo válvulas de pinçamento.

O módulo adsorvente convectivo (406) contém uma matriz cromatográfica com transferência de massa predominante convectiva do produto para a superfície adsorptiva e, em  
5 contraste com a cromatografia convencional, é esterilizado antes da operação por autoclave, vapor ou irradiação. A transferência de massa predominantemente convectiva permite, em contraste à cromatografia de leito empacotado convencional, tempos de ciclo de  
10 adsorção/eluição/regeneração muito baixos, que os requerentes usam no dispositivo inventivo para realizar a operação semicontínua.

Na representação atual do dispositivo inventivo, o adsorvente convectivo (406) consiste em uma ou mais cápsula  
15 adsorvente da membrana disponível comercialmente com química de troca de íons (Mustang, Pall corporation ou Sartobind, Sartorius). Entretanto, o dispositivo pode usar outros materiais e geometrias adsorventes da membrana e matrizes convectivas novas como matrizes monolíticas, visto  
20 que o contraste com a embalagem de resina de cromatografia convencional é eliminada, e as matrizes geralmente podem ser encapsuladas em módulos prontos para o uso.

Além disso, outras químicas, inclusive matrizes de afinidade convectivas que consistem em ligantes de ligação  
25 do produto, também proporcionarão desempenho benéfico exclusivo no dispositivo inventivo.

Em uma representação do dispositivo inventivo, vários módulos adsorventes convectivos são usados no dispositivo na forma de um conjunto de séries de adsorventes  
30 convectivos paralelamente, semelhante ao sistema de remoção contínua de partículas (100). O conjunto inteiro com todas as séries adsorventes é esterilizado junto, permitindo comutação de operação de uma série de adsorventes para um mais novo se o primeiro chegar ao fim de sua vida útil,

conforme determinado, por exemplo, por um critério predefinido como pressão de retorno durante o carregamento ou número máximo de ciclos operacionais realizados. Cada série de adsorventes consiste em um módulo individual ou em  
5 vários módulos adsorventes convectivos paralelamente e/ou série para aumentar a capacidade de ligação e/ou aperfeiçoar o uso da capacidade.

É importante enfatizar que o dispositivo inventivo permite operação, não apenas contínua, mas também realmente  
10 estéril, ao contrário da operação apenas asséptica. Os requerentes obtiveram isso projetando componentes de sistema de contato com o produto para resistir não apenas à limpeza, mas também à esterilização por autoclave, vapor ou irradiação gama. Nas representações atuais, os módulos  
15 encapsulados descartáveis são usados para remoção contínua de partícula (100), bem como adsorção/dessorção convectiva estéril semicontínua (400). As bombas peristálticas são usadas para evitar que qualquer produto entre em contato com os elementos giratórios e vedações mecânicas. Além  
20 disso, nas representações atuais, a tubulação descartável e os conjuntos da bolsa são usados no lugar da tubulação rígida. Os componentes descartáveis que entram em contato com o produto (por exemplo, tubulação, bolsa, módulos) ou grupos de componentes são pré-montados e esterilizados  
25 juntos, simplificando a inicialização e a operação. Os sistemas são projetados para manter qualquer abertura potencial do sistema estéril para o ambiente (por exemplo gabinete de fluxo laminar) como para troca de amostragem, bolsa ou instrumentação no mínimo. Nas representações  
30 presentes do dispositivo, os coletores são projetados de forma redundante para permitir a comutação de um componente estéril (por exemplo, bolsa de recebimento de produto) para o próximo sem abrir. A troca adicional de tubulação, módulos ou bolsas é preferencialmente realizada usando

soldadores de tubulação estéreis, e não conectores estéreis.

Outras representações futuras de dispositivos inventivos também podem consistir em componentes como tanques de aço inoxidável, compartimentos ou tubulação de filtro que possam ser esterilizados no lugar, isoladamente ou em combinação com componentes descartáveis, para que o vigor e a esterilidade em operação de longo prazo sejam garantidos.

As representações adicionais de dispositivo inventivo B foram projetadas para processar material de vários fermentadores em fábricas maiores (B3). Um exemplo é mostrado esquematicamente na figura 6. Representações adicionais do dispositivo B inventivo são projetadas para aumentar o desempenho do fator de concentração e de separação geral, combinando vários sistemas de adsorção/dessorção convectiva (400) em série, em relação aos respectivos tanques de amortecimento estéreis intercalados (200) (consulte a figura 6, B4).

Representações adicionais de dispositivos inventivos são projetadas para aumentar o desempenho do fator de concentração geral e separação, combinando um sistema de ultrafiltração contínua (300) em série com um sistema de adsorção/dessorção convectiva semicontínua (400) por meio de um tanque adicional de amortecimento. Um exemplo de uma representação é mostrado de maneira esquemática na figura 7.

#### Descrição de método de uso do dispositivo B

As fermentações de perfusão contínua são operadas por um longo período (uma campanha), geralmente entre 2 semanas e 6 meses ou mais. O fluido de cultura de tecido (TCF) que contém o produto, células e fragmentos de célula é continuamente processado, usando o dispositivo B. Um fluxo de produto estéril, livre de partículas, concentrado e

parcialmente purificado (o "produto isolado") é produzido e sai continuamente do dispositivo e sua saída (414). Usando a bomba (101) do sistema de remoção contínua de partículas estéreis (100) a colheita é bombeada continuamente através do conjunto de filtração (103) na taxa de fluxo de colheita de perfusão desejada  $Q_h$  da fermentação.

O fluxo de saída do sistema de filtração contínua, ou seja o fluido de cultura de tecido clarificado (cTCF), entra continuamente no tanque de amortecimento (201).

Sempre que o tanque de amortecimento encher até um nível predefinido, um peso de sinal de nível aciona automaticamente um ciclo de adsorção/dessorção do sistema integrado de concentração/purificação semicontínua estéril. O material coletado no tanque de amortecimento é carregado rapidamente na configuração do adsorvente, ou seja, em 4 horas, preferencialmente em 2 horas e, na melhor das hipóteses, em 1 hora ou menos, esvaziando o tanque de amortecimento.

Nas representações atuais mostradas na Figura 3, a coleta do fluido de cultura de tecido clarificado livre de partículas (cTCF) continua o tempo todo, no mesmo tanque de amortecimento pequeno. O volume no tanque de amortecimento pequeno varia entre um valor mínimo e máximo. Em outra representação descrita no texto anterior, a coleta é comutada para trás e para frente entre dois tanques de amortecimento idênticos.

Enquanto o cTCF é continuamente coletado no tanque de amortecimento, o adsorvente carregado passa por mais etapas de um protocolo cromatográfico predefinido, projetado para dessorção do produto-alvo em forma concentrada, purificada e para preparar o adsorvente para o próximo ciclo de carga. Portanto, o ciclo geral consiste no carregamento, na lavagem, na eluição, na regeneração e no reequilíbrio, cada um com um ou mais tampões adequados.

Como novamente as taxas de fluxo durante essas etapas podem ser elevadas em razão da natureza de adsorventes convectivos, o tempo de ciclo total é mantido baixo, ou seja abaixo de 6 horas, preferencialmente abaixo de 3 horas e, na melhor das hipóteses, abaixo de 1,5 hora. Portanto, o sistema integrado é projetado para que a configuração do adsorvente esteja pronta para o próximo ciclo de carregamento antes de o tanque de amortecimento ser preenchido novamente, permitindo a operação semicontínua.

A TAbela 2 a seguir mostra um exemplo de um método de uso de uma representação atual do dispositivo inventivo B para isolamento do Fator VIII de coagulação sanguínea humana recombinante (dados mostrados em larga escala). O método provou ser exclusivamente benéfico. As produções e o desempenho de cada ciclo de adsorção/dessorção foram semelhantes às em lote, com a produção geral do produto aumentada em mais de 10%, em razão do baixo tempo de permanência do produto, o que minimizou a degradação do produto. O mesmo método também provou ser muito benéfico para o isolamento de variantes de FVIII geneticamente projetadas, inclusive FVIII excluído do domínio B, que é significativamente diferente do FVIII completo no tamanho e em outras características. É provável que também seja útil para produção de outras proteínas e biomoléculas.

O próprio protocolo cromatográfico (químicas de tampão e seqüência, volumes de carregamento e taxas de fluxo) pode ser desenvolvido em experimento de cromatografia de lote para cada molécula individual e pode ser prontamente transferido para ser usado com representações do dispositivo inventivo.

#### Tabela 2

Exemplo de método para usar uma representação atual de dispositivo B para isolamento contínuo de FVIII e variantes de FVIII de fermentação de perfusão contínua.

| Parâmetro                                                                                                                      | Alvo  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Taxa de fluxo da taxa de colheita $Q_h$ de perfusão contínua [l/d]                                                             | 2000  |
| Tanque de amortecimento: volume máximo de funcionamento $V_s$ [l]                                                              | 200   |
| Volume de carregamento [Volumes da matriz]                                                                                     | 600   |
| Volume de matriz de adsorvente instalado no dispositivo B [ml]                                                                 | 260   |
| Taxa de fluxo de carregamento [Volumes de matriz/min]                                                                          | 12    |
| Volume de carregamento [l]                                                                                                     | 156   |
| Tempo de carga [min]                                                                                                           | 50    |
| Tempo cromatográfico total [h] (protocolo que consiste em carga, lavagem, eluição e várias etapas de regeneração/reequilíbrio) | 1,5   |
| Tempo ocioso de adsorvente/ciclo [h]                                                                                           | 0,372 |
| Ciclos/período de 24 horas                                                                                                     | 12,8  |
| Tempo de coleta [h]                                                                                                            | 1,872 |
| Tempo médio aproximado de permanência do produto (tempo de coleta + tempo de carga + tempo de eluição)                         | 2,7   |

Para cada molécula de produto individual, um critério de vida útil é definido para a configuração de adsorvente convectivo, por exemplo, com base na pressão durante o carregamento ou recuperação. Em geral, um número máximo de 5 ciclos  $n_{max}$  é especificado e validado. Depois que a

configuração do adsorvente é usada em operação semicontínua através de ciclos  $n_{max}$ , ela é intercambiada com outra configuração de adsorvente idêntica sem comprometer a integridade e a esterilidade do sistema. Nas atuais

5 representações, isso é feito em analogia à configuração de filtração contínua, estéril, usando os coletores e os conectores estéreis ou usando a tubulação flexível descartável e os soldadores de tubulação estéril.

Ao usar a representação do dispositivo inventivo

10 mostrado na figura 3, lado direito, um fluxo estéril de tampão, solução de ajuste de pH, solução estabilizadora ou água para injeção, é acrescentado de maneira contínua ou intermitente a partir de um tanque estéril (204) que usa uma bomba de adição de tampão (203). Portanto, as condições

15 do cTCF podem ser livremente ajustadas, por exemplo, em termos de resistência iônica, pH, adição de estabilizadores, etc.

#### Benefícios da invenção

Os dispositivos inventivos e os métodos respectivos de

20 uso dos dispositivos solucionam os problemas de processos de isolamento convencional esboçados anteriormente (consulte os antecedentes gerais da invenção).

Em todas as representações dos dispositivos A e B e métodos respectivos de uso dos dispositivos, o tempo de

25 permanência do produto no ambiente potencialmente prejudicial é exclusivamente minimizado, o que aumenta significativamente a produção e a qualidade de produtos biológicos complexos peculiarmente instáveis. A capacidade da fábrica pode ser aumentada, e os custos das mercadorias,

30 reduzidos.

Além disso, os dispositivos e os respectivos métodos eliminam a necessidade de grandes instalações frias ou tanques refrigerados para intermediar o armazenamento de grandes volumes de colheita, reduzindo os custos de



investimentos da fábrica e proporcionando integralmente a vantagem da compacidade e da mobilidade da fermentação de perfusão.

5 As representações dos dois dispositivos inventivos e métodos respectivos reduzem os custos de mão-de-obra quando comparados a processamento em lote mão-de-obra intensiva em razão do alto grau de automação necessária. Os dispositivos recentes permitem operação contínua, 24 horas por dia, por longos períodos, maximizando o rendimento volumétrico e o  
10 uso do equipamento.

Além disso, os dispositivos inventivos eliminam dificuldades logísticas em fábricas de um ou vários fermentadores. As representações podem processar material de uma ou várias fermentações de perfusão contínua.

15 Como os dispositivos e os métodos recentes permitem operação completamente estéril, as emissões de carga microbiana, bem como as emissões de endotoxina são eliminadas, o que não poderia ser obtido por processamento asséptico seguido de filtração estéril simples.

20 Além disso, os dispositivos inventivos permitem evitar ou minimizar a necessidade de validação de limpeza em razão do uso de descartáveis. Por intermédio das características exclusivas dos dispositivos e métodos inventivos, os módulos descartáveis, bem como tubulação, bolsas e  
25 conjuntos podem ser usados por um longo período (até a duração total da campanha), reduzindo consideravelmente os custos e tornando o uso de descartáveis altamente atrativos sob um ponto de vista econômico.

30 As representações atuais de dispositivos inventivos A e B e métodos respectivos provaram ser especialmente úteis para fabricação de Fator VIII de coagulação sangüínea recombinante, bem como versões projetadas geneticamente de FVIII, incluindo, mas não se limitando a, FVIII excluído de domínio B. Contudo, as invenções podem ser similarmente

úteis para a produção de outras proteínas e moléculas biológicas, em determinadas proteínas complexas peculiarmente instáveis como Fator VII, Fator IX, Fator X e outras.

5        Benefícios do dispositivo A e método respectivo

A figura 8 mostra um exemplo de aumento na capacidade de filtro que os requerentes constataram para o elemento integrado de remoção contínua de partícula (100).

10        A figura 10 mostra a distribuição do tempo de permanência comum e o tempo de permanência médio do produto no sistema UF contínuo (300) de uma representação de dispositivo A inventivo, conforme determinado pela adsorção UV do retentado a 280nm, com uma proteína de modelo sob condições típicas. Como pode ser visto, o tempo de  
15        permanência médio do produto no sistema é de aproximadamente 40 minutos. Portanto, o tempo de permanência total do produto na atual representação do dispositivo A, da linha de colheita do fermentador até o final, retentado concentrado (isolado) é mantido em 1-2  
20        horas ou menos. Isso é menos do que 1/10 do tempo de permanência de 28 horas ou mais em um processo de isolamento em lote convencional, em que o produto (colheita) é coletado por pelo menos 24 horas (até vários dias), após o que o produto é processado geralmente por  
25        pelo menos 4-10 horas.

A figura 11 mostra uma comparação das produções de isolamento totais resultantes de fator de coagulação sangüínea recombinante (rFVIII) de fermentação de perfusão contínua livre de proteína de plasma para um processo de  
30        isolamento em lote convencional (filtração em lote e UF em lote) e usando o dispositivo A inventivo e o método respectivo. Como pode ser visto da figura, o processo contínuo inventivo obtém produção de produto significativamente mais alta, o que pode levar a

capacidades de fabricação elevadas e custos de fabricação reduzidos.

5 Durante o método inventivo de uso do dispositivo A, a pressão da transmembrana da ultrafiltração contínua integrada aumentará com o tempo, enquanto o fluxo de membrana específico (em litros/hora/m<sup>2</sup>/bar) diminuirá no rendimento volumétrico constante. Isso é comum a todos os processos de ultrafiltração e ocorre em razão de efeitos como polarização de concentração, formação de camada de gel e entupimento. Entretanto, em contraste com a ultrafiltração em lote, como pode ser visto no exemplo mostrado na Figura 12, as alterações da pressão e o fluxo específico são extremamente lentos com o dispositivo A, permitindo operação contínua por semanas de uma vez, antes que as membranas precisem ser limpas ou substituídas. Além disso, a taxa de alteração e de desempenho geral do sistema é quase imperceptível ao produto produzido ou à linhagem de célula usada na fermentação de perfusão contínua (figura 12). Portanto, o dispositivo inventivo A e o método respectivo também estão adaptados de modo ideal como uma plataforma genérica para produção rápida de várias proteínas, visto que é executado de maneira rigorosa e previsível com várias proteínas-alvo de diferentes linhagens de célula.

25 Surpreendentemente, os requerentes constataram que os efeitos negativos da formação da camada de gel e de entupimento na verdade são muito minimizados com o dispositivo A, que um volume total muito maior de acordo com a área de ultrafiltro instalada pode ser processado, antes da limpeza ou substituição de filtros se tornar necessária. A figura 13 mostra o desempenho rigoroso do dispositivo inventivo A em longo prazo. Depois de aproximadamente 25 dias, a pressão da transmembrana surpreendente mente pareceu estabilizar em um estado quase

fixo, sugerindo desempenho de longo termo ainda mais alto. No dia 27, a taxa de fluxo do retentado foi intencionalmente dobrada para testar o efeito de rendimento mais elevado. Depois de 34 dias, um fluxo mais curto foi realizado com NaOH 0,5 M estéril, sem abrir o sistema e enquanto eram mantidas a integridade e a esterilidade completas do sistema. Depois disso, o TMP estabilizou novamente ou pelo menos aumentou apenas a uma taxa extremamente baixa. Depois de 70 dias de operação contínua estéril, a taxa de fluxo da reciclagem foi intencionalmente reduzida pela metade para testar o efeito no desempenho do sistema. Conforme esperado, o TMP começou a aumentar com uma taxa um pouco mais alta em razão da transferência de massa reduzida e, portanto, aumentou a concentração da parede na superfície da membrana. Contudo, 95 dias de operação foram concluídos com êxito e com rigor antes de o sistema ser desativado. Um total de aproximadamente 4500 litros foi processado por  $m^2$  de área de membrana, com trabalho manual mínimo (somente amostragem diária). Em comparação, o processo de ultrafiltração em lote convencional otimizado para a mesma aplicação tem 45 vezes menos capacidade de carga, a aproximadamente 100  $l/m^2$  e requer pelo menos 1-2 operadores em tempo integral.

A seletividade do dispositivo inventivo A, em particular seu sistema integrado de ultrafiltração contínua (300), provou ser significativamente mais alta do que a seletividade de um processo em lote convencional. É bem conhecido por profissionais familiarizados com a área que, na ultrafiltração em lote convencional, uma segunda membrana é formada de macromoléculas retidas durante o estágio inicial do processo (camada de gel), que reduz o corte do peso molecular aparente. O resultado é que a molécula-alvo e as proteínas menores contaminantes são retidas, o que torna a purificação simultânea significativa

praticamente impossível. Portanto, com a ultrafiltração em lote convencional, raramente é possível separar proteínas que sejam que possuam menos de um fator 10 em termos de peso molecular. Entretanto, como pode ser visto da figura 14, com o processo integrado de ultrafiltração contínua, é possível ajustar condições para separar de maneira eficiente IL-2SA (aproximadamente 16 kD) e a proteína fluorescente verde GFP (27-30 kD). Esse alto desempenho de separação esperado permite concentração e purificação simultâneas.

#### Benefícios do dispositivo B e método respectivo

A figura 15 ilustra o desempenho do dispositivo inventivo B. Usando um adsorvente convectivo comercial (Mustang Q, Pall Corporation, módulo de 15 camadas), quase 100 ciclos consecutivos de adsorção/dessorção foram executados, concentrando e purificando uma variante de FVIII recombinante de cultura de perfusão contínua. A produção média obtida foi de aproximadamente 95% (resultados expandidos de variação de ensaio), enquanto a pressão permaneceu relativamente constante durante todo o número de ciclos executados. Portanto, pode ser especificado que pelo menos 100 ciclos consecutivos podem ser executados antes de trocar a configuração do adsorvente.

Como foi mostrado na descrição detalhada do método de uso do dispositivo inventivo B, o tempo de permanência médio total do produto em uma representação atual é inferior a 3 horas, portanto, ele é eluído na forma concentrada, purificada e estabilizada em um tampão apropriado. Esse tempo é significativamente inferior ao tempo de permanência de 24 horas em um processo de isolamento em lote convencional desempenhado diariamente e, portanto, resulta em produções significativamente mais elevadas dos produtos de proteína peculiarmente instáveis.

Em uma representação atual descrita anteriormente, aproximadamente 13 ciclos são executados por dia, o que significa, no contexto da figura 15, que o conjunto de adsorvente semicontínuo precisaria ser intercambiado  
5 somente a cada 7-8 dias, o que é feito sem comprometer a esterilidade e a continuidade da operação.

A figura 16 mostra um exemplo do perfil de UV e de condutividade em um ciclo simples comum de adsorção/dessorção e regeneração com o dispositivo B. Pode  
10 ser notado que mais de 450 volumes de adsorvente (CVs) podem ser carregados, enquanto o produto elui em um pico muito acentuado. Os contaminantes são removidos significativamente no fluxo durante a fase de carregamento, bem como durante a lavagem e a retirada (fase de  
15 regeneração).

A figura 17 ilustra o desempenho de purificação do processo inventivo que consiste em adsorção/dessorção convectiva semicontínua. Como exemplo, o gel SDS-page de um isolado de variante de FVIII é mostrado. Como pode ser  
20 visto, as frações do eluado, que incluem 95% da variante de FVIII carregada (conforme determinado pelo ensaio de atividade separada), contêm significativamente menos proteína do que a carga e, portanto, são purificadas. Nenhuma faixa de degradação é visível no eluado (isolado),  
25 o que indica excelente qualidade de produto.

Resumindo, o dispositivo inventivo B é capaz de obter desempenho de purificação similar quando comparado aos processos em lote, enquanto ao mesmo tempo minimiza as perdas de produção para produtos de proteína peculiarmente  
30 instáveis, bem como problemas de qualidade do produto, em razão da minimização do tempo de permanência do produto. Ao mesmo tempo, os custos de mão-de-obra são reduzidos consideravelmente em razão do alto grau de automação do processo inventivo, que exige intervenção mínima do

operador.

5 Embora a invenção anterior tenha sido descrita com alguns detalhes por meio da ilustração e do exemplo para fins de compreensão, será aparente para os especialistas na arte que determinadas alterações e modificações poderão ser praticadas. Portanto, a descrição e os exemplos não devem ser considerados limitadores do escopo da invenção, que é representada pelas reivindicações anexas.

10 Conseqüentemente, deve ser compreendido que as representações da invenção que fornecem um método aperfeiçoado de filtração para gerar uma produção elevada de uma molécula de interesse de um fluxo de alimentação determinado são simplesmente ilustrativas para a aplicação dos princípios da invenção. Será evidente, com base na  
15 descrição anterior, que as alterações na forma, nos métodos de uso, e nas aplicações dos elementos da divulgação podem ser aplicadas sem se afastarem dos princípios da invenção ou do escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para purificar uma proteína de interesse proveniente de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea, caracterizado por compreender:

(a) produção por um processo de fermentação de perfusão contínua de uma mistura fluida de cultura de tecido heterogênea que contém uma proteína de interesse;

(b) transferência da mistura fluida de cultura de tecido para um processo de remoção contínua de partícula integrado ao processo de fermentação de perfusão contínua;

(c) remoção de contaminantes particulados do fluido de cultura de tecido no processo de remoção contínua de partícula para produzir um fluido de cultura de tecido clarificado que contém a proteína de interesse;

(d) transferência do fluido de cultura de tecido clarificado para um processo de purificação contínua integrado ao processo de remoção contínua de partícula, em que o processo de purificação contínua é ultrafiltração e o fluido de cultura de tecido clarificado é filtrado a uma taxa de fluxo específica que produz uma concentração de parede inferior a 20% maior do que a concentração de retentado; e

(e) purificação da proteína de interesse proveniente do fluido de cultura de tecido clarificado no processo de purificação contínua,

em que a taxa de fluxo específica da mistura, através do processo de fermentação de perfusão contínua, processo de remoção contínua de partícula e processo de purificação contínua, é mantida consideravelmente constante.



2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela mistura de cultura de tecido clarificada ser filtrada a uma taxa de fluxo específica que produz uma concentração de parede inferior a 15% maior do que a concentração de retentado.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela mistura de cultura de tecido clarificada ser filtrada a uma taxa de fluxo específica que produz uma concentração de parede inferior a 10% maior do que a concentração de retentado.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela mistura de cultura de tecido clarificada ser filtrada através de uma membrana de ultrafiltração que tem uma área em metros quadrados entre 0,1 a 2 vezes a taxa de fluxo volumétrico da fermentação de perfusão contínua em litros/hora.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela mistura de cultura de tecido clarificada ser filtrada através de uma membrana de ultrafiltração que tem uma área em metros quadrados entre 0,3 a 1 vezes a taxa de fluxo volumétrico da fermentação de perfusão contínua em litros/hora.

6. Aparelho para separar uma proteína de interesse da mistura fluida de cultura de tecido heterogênea, caracterizado por compreender:

- (a) um sistema de fermentação de perfusão contínua;
- (b) um sistema de remoção contínua de partícula integrado com o sistema de fermentação de perfusão; e
- (c) um sistema de purificação contínua, que é

ultrafiltração, integrado com o sistema de remoção de partícula;

em que o aparelho é mantido sob condições estéreis.

7. Aparelho, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por compreender:

(a) um sistema de fermentação de perfusão contínua adaptado para produzir continuamente um fluido de cultura de tecido que contém uma proteína de interesse a uma taxa de fluxo volumétrico consideravelmente constante;

(b) um sistema de remoção contínua de partícula integrado a, e adaptado para receber continuamente, o fluido de cultura de tecido do sistema de fermentação de perfusão e produzir continuamente o fluido de cultura de tecido clarificado; e

(c) um sistema de purificação contínua, que é ultrafiltração, integrado ao, e adaptado para receber continuamente, o fluido de cultura de tecido clarificado do sistema de remoção de partícula e produzir continuamente um produto isolado que contém a proteína de interesse;

em que o aparelho é mantido sob condições estéreis.

8. Aparelho, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo sistema de ultrafiltração compreender uma membrana de ultrafiltração que tem uma área, em metros quadrados, entre 0,1 a 2 vezes a taxa de fluxo volumétrico da fermentação de perfusão contínua em litros/hora.

9. Aparelho, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo sistema de ultrafiltração compreender uma membrana de ultrafiltração que tem uma área, em metros quadrados, entre 0,3 a 1 vezes a taxa de fluxo volumétrico

da fermentação de perfusão contínua em litros/hora.

Figura 1: esquema de processo de perfusão contínua convencional seguida por 3 etapas do processo de isolamento física e logisticamente segregado (coleta da colheita de lote, remoção da partícula do lote e concentração/purificação do lote).

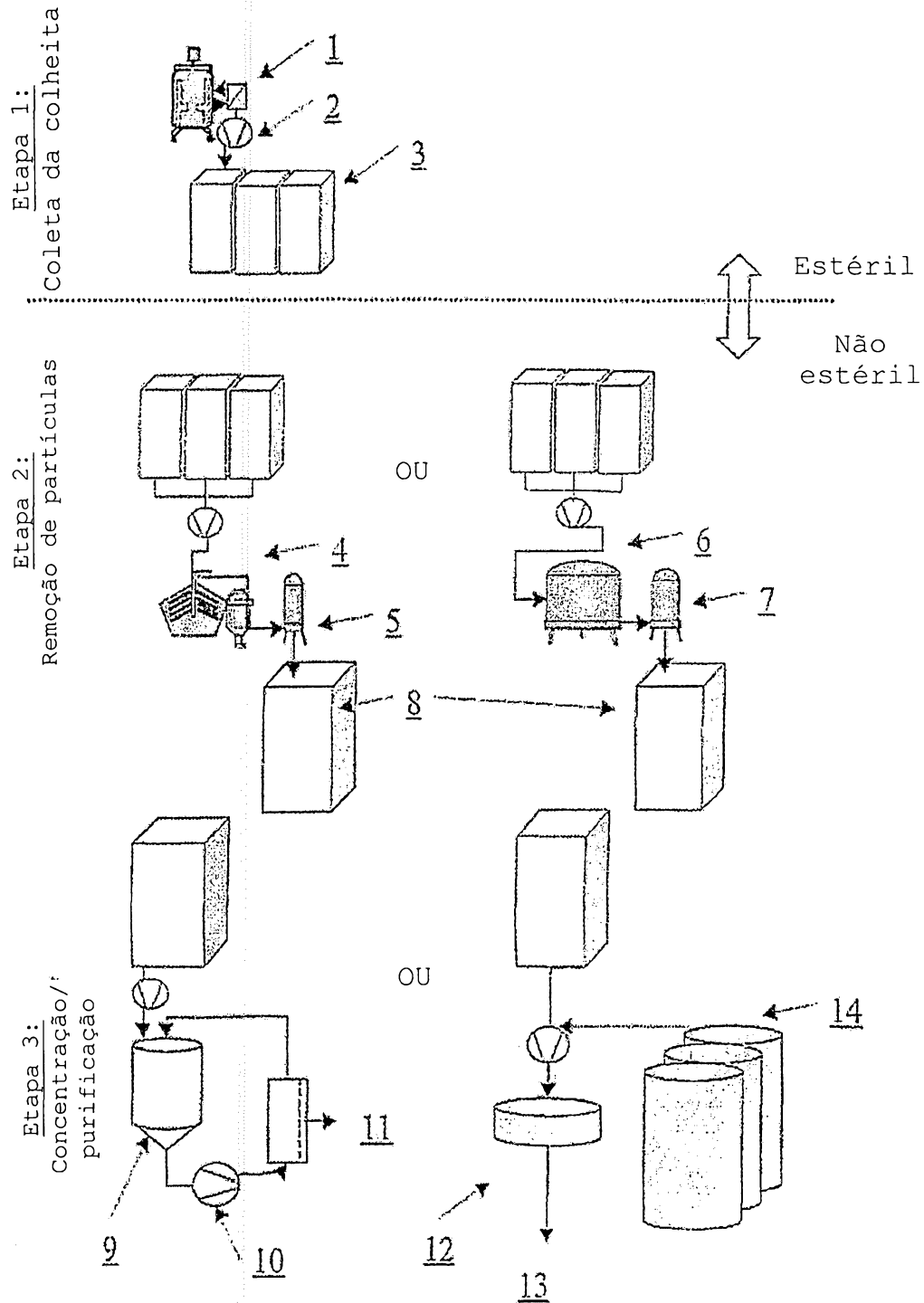


Figura 2: representação esquemática de 2 representações do dispositivo inventivo A para fabricação contínua, integrada e estéril. Esquema da representação A1, mostrada no lado esquerdo e esquema da representação A2, mostrada no lado direito.

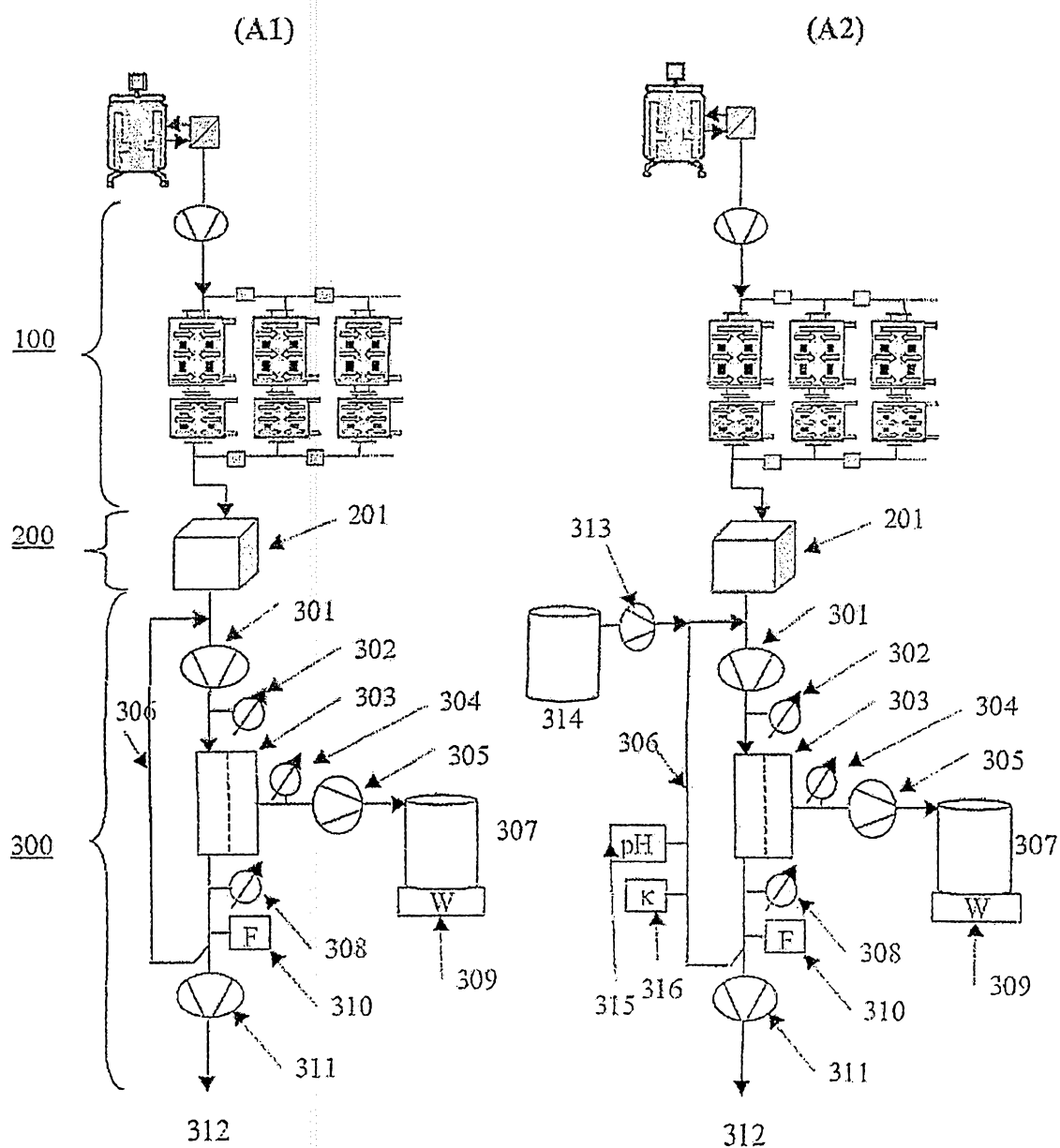


Figura 3: representação esquemática de 2 representações do dispositivo inventivo B para fabricação contínua, integrada e estéril. Esquema da representação B1, mostrada no lado esquerdo e esquema da representação B2, mostrada no lado direito.

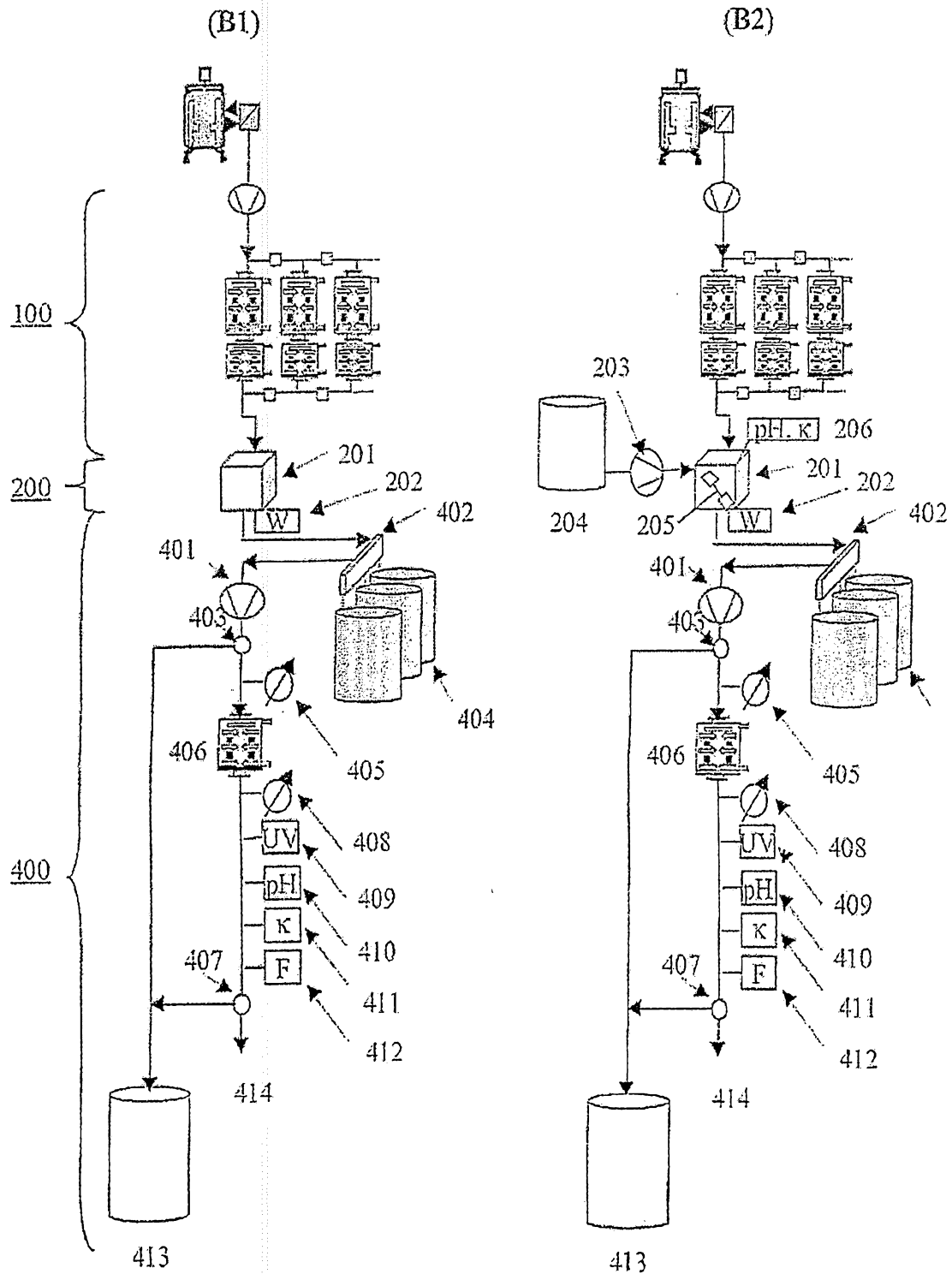


Figura 4: esquema de uma representação de sistema inventivo de remoção contínua de partículas integrado (100), um elemento do dispositivo inventivo A e dispositivo inventivo B.

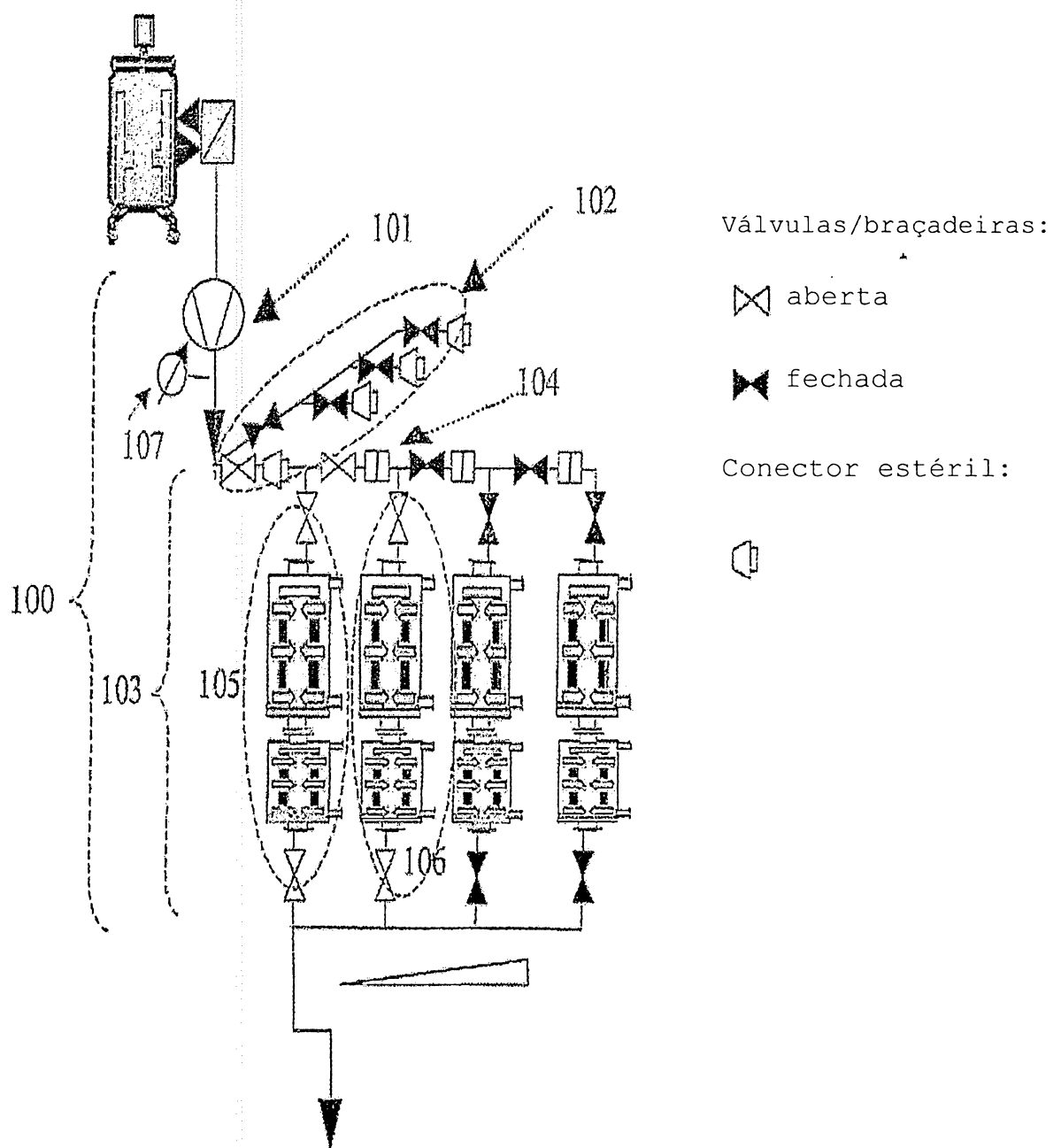


Figura 5: representações esquemáticas de representações adicionais de dispositivo inventivo A que combinam vários elementos para aumentar a capacidade geral da fábrica (A3) ou desempenho de concentração e separação (A4).

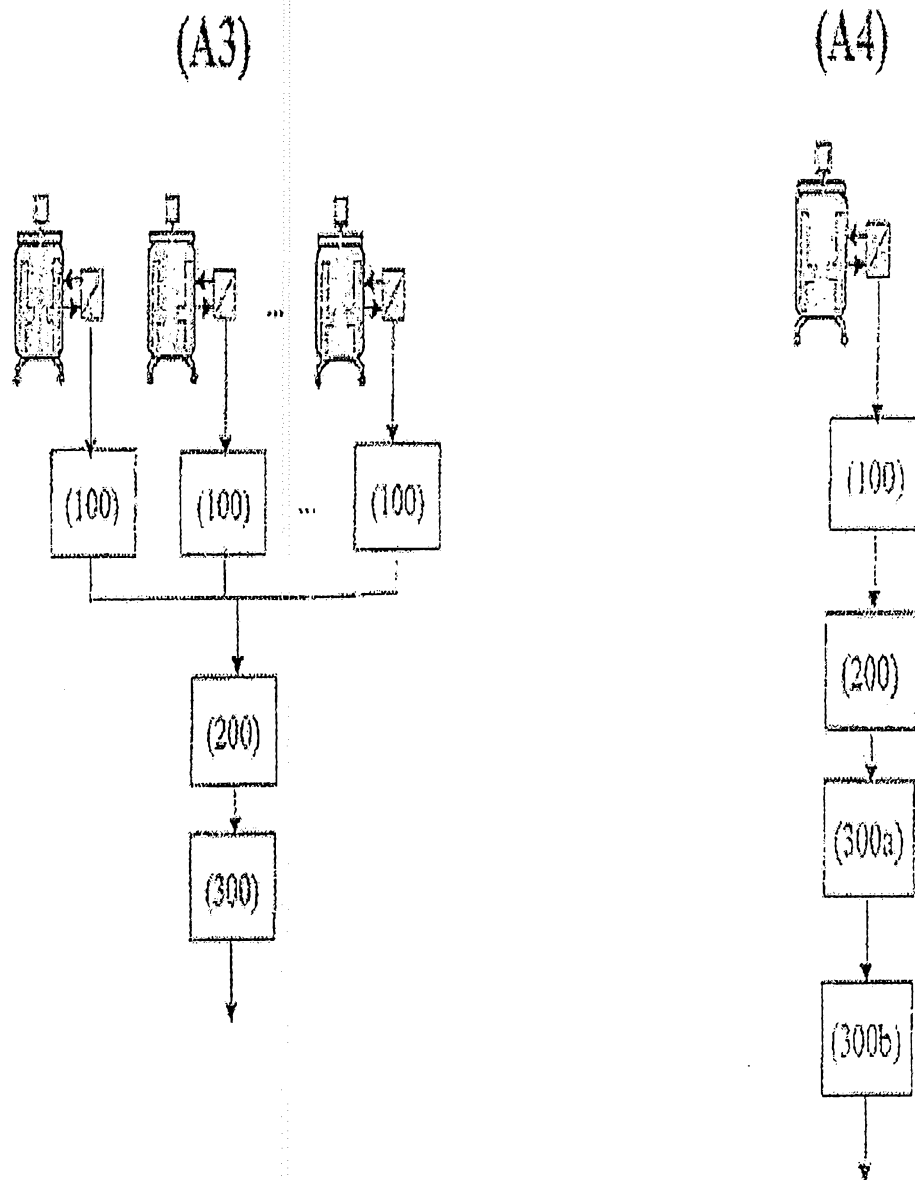
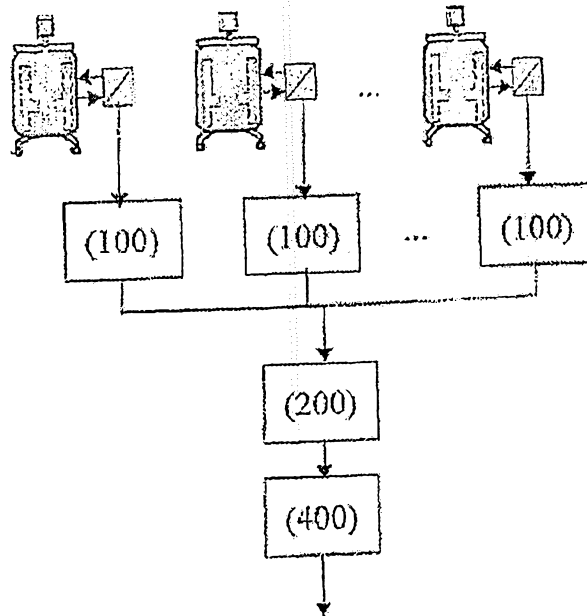




Figura 6: representações esquemáticas de representações adicionais do dispositivo inventivo B.

(B3)



(B4)

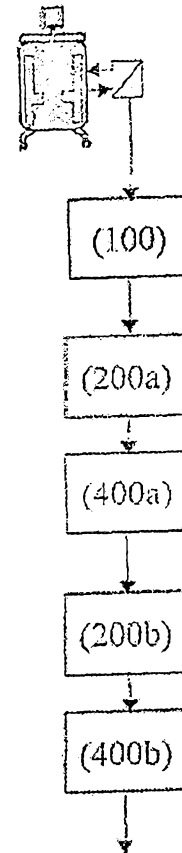
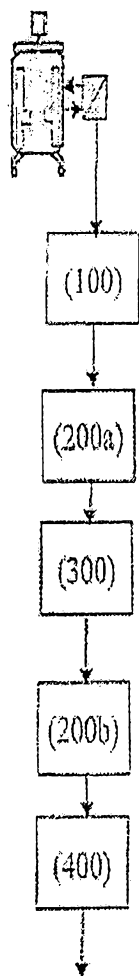
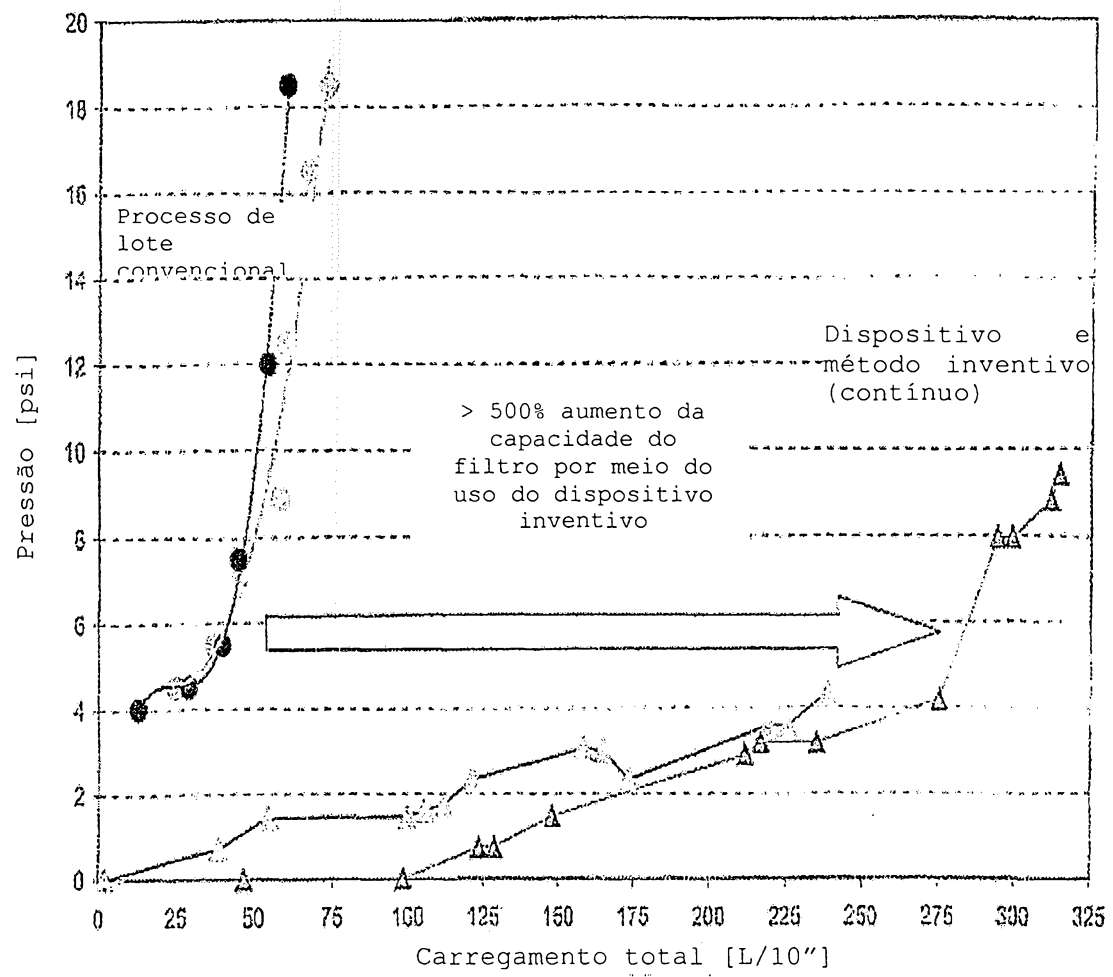


Figura 7: representação adicional de dispositivos inventivos que combina elementos do dispositivo A e do dispositivo B em série para aumentar o desempenho geral de concentração geral e de separação.



8/17

Figura 8: comparação de exemplo das capacidades de carga total de acordo com 10" de cápsula de filtro para o processo de lote convencional e representação de dispositivo inventivo e método para remoção contínua de partículas (processo integrado de filtração contínua) que usa cápsulas de filtro comercial idênticas. Método de exemplo de produção de Fator VIII de coagulação sanguínea recombinante mostrado.



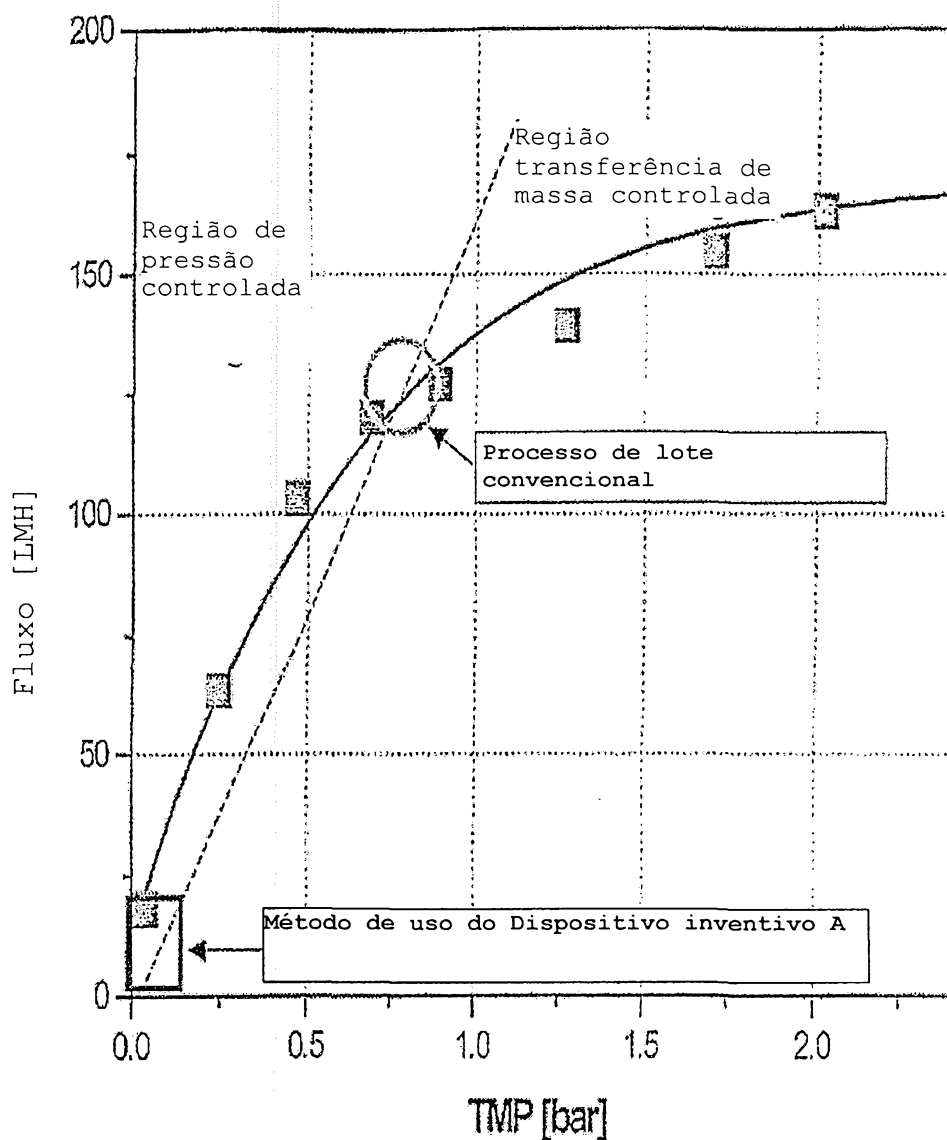


Figura 9: exemplo de curva de pressão-fluxo (fluxo permeado específico em LMH = litros/hora/m<sup>2</sup> na pressão de transmembrana) e determinação do ponto de operação. O círculo mostra o ponto de operação comum que será ajustado por meio de TMP para processos de lote convencionais. O retângulo mostra a região operacional preferida que será ajustada por meio da bomba de permeado de acordo com o método de uso do dispositivo inventivo A.

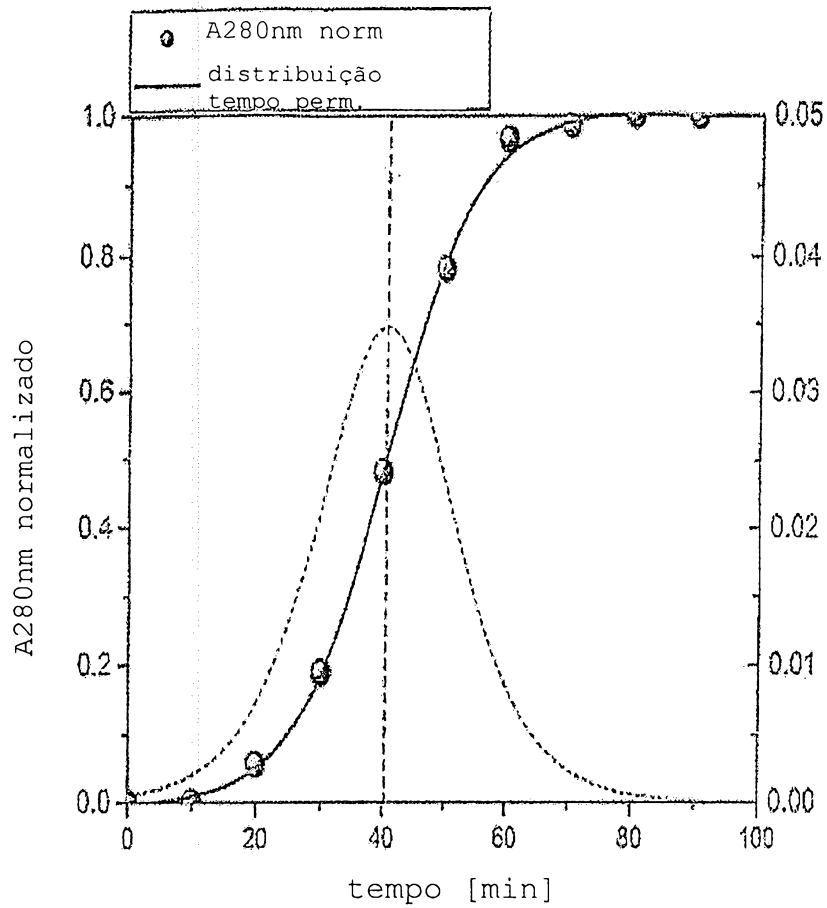


Figura 10: exemplo de distribuição do tempo de permanência e tempo de permanência médio do sistema UF contínuo integrado (300), de acordo com o método de uso do dispositivo inventivo A. Medido para sistema contínuo descartável com módulo de 290 cm<sup>2</sup> (62,5 cm de comprimento), fluxo cruzado de 120 LMH, fluxo retentado de 0,2 LMH, fluxo de permeado de 2 LMH.

11/17

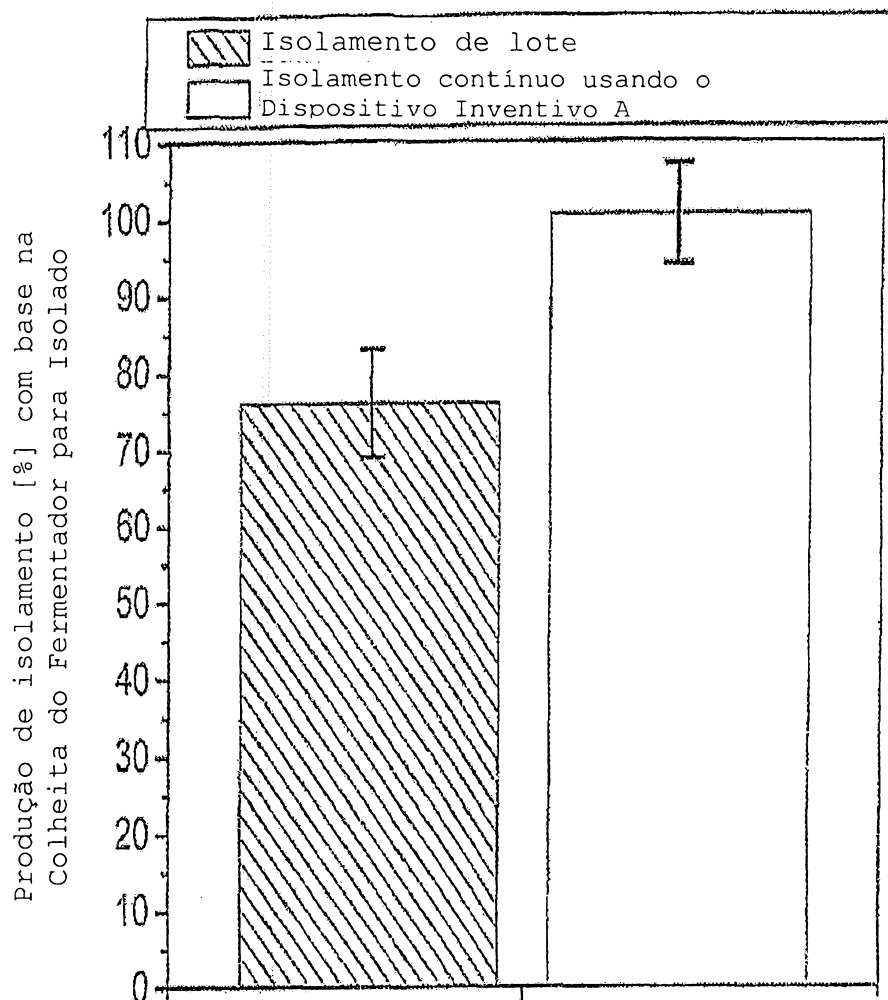


Figura 11: exemplo de isolamento de rFVIII da fermentação de perfusão contínua livre de plasma que utiliza uma representação do dispositivo inventivo A. Comparação de produção de isolamento médio de método contínuo inventivo comparado à produção média de isolamento do lote, incluindo uma difusão de desvio padrão. Foram usados três lotes consecutivos para determinar a produção de lote, enquanto três pontos (dias) consecutivos foram usados para o processo contínuo.

12/17

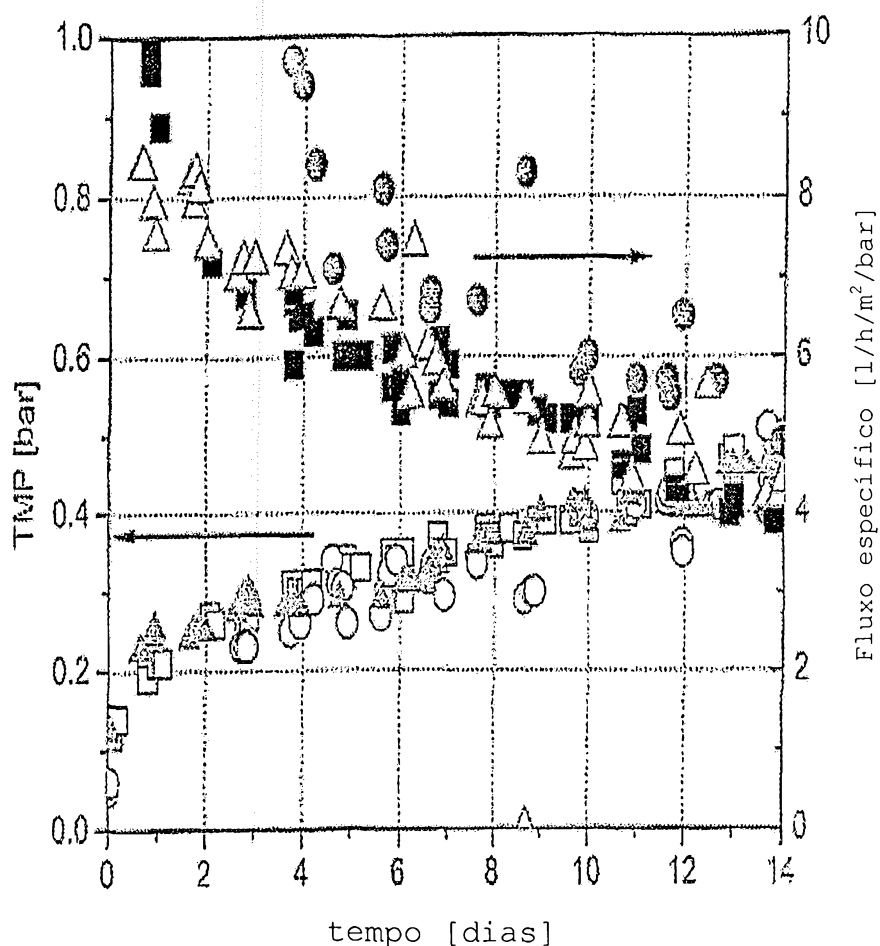


Figura 12: exemplos de desempenho de dispositivo inventivo A. Pressão de transmembrana e fluxo específico de sistema de ultrafiltração contínua integrado (300) como uma função de tempo do processo contínuo para três exemplos diferentes mostrados. Triângulos = membrana de 100 kD, Fator VIII de coagulação sanguínea recombinante (rFVIII); Quadrados = membrana de 10 kD, interleucina-2 recombinante; Círculos = membrana de 50 kD, glicoproteína geneticamente projetada ( $M_r > 100$  kD). Todos os exemplos mostrados são de fermentação de perfusão contínua livre de proteína de plasma.

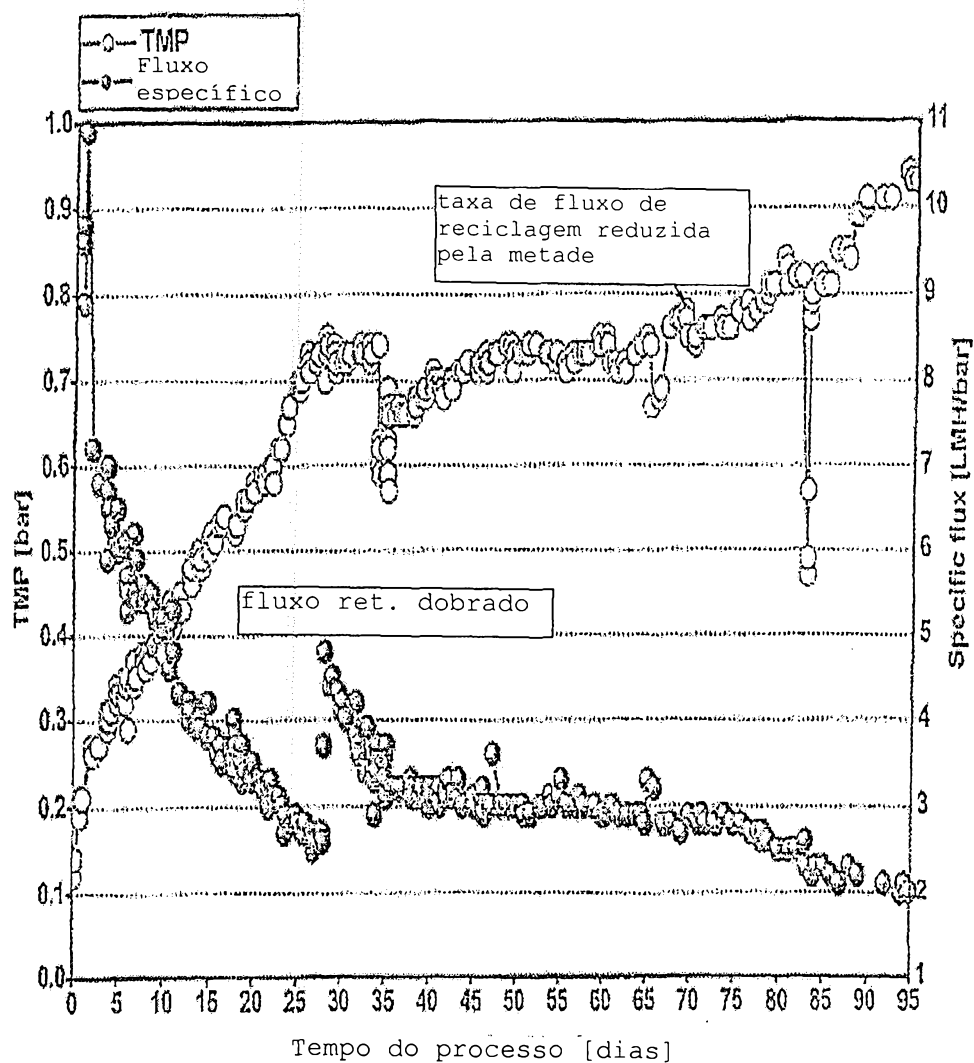


Figura 13: exemplo de desempenho de longo prazo de dispositivo inventivo A ligado diretamente à fermentação de perfusão contínua de dois produtos de proteína de co-expressão de linhagem celular (proteína fluorescente verde GFP e IL-2SA). Pressão da membrana e fluxo específico do sistema inventivo de ultrafiltração contínua (300) como uma função de tempo de processo contínuo mostrada. A membrana de 10kD foi usada.



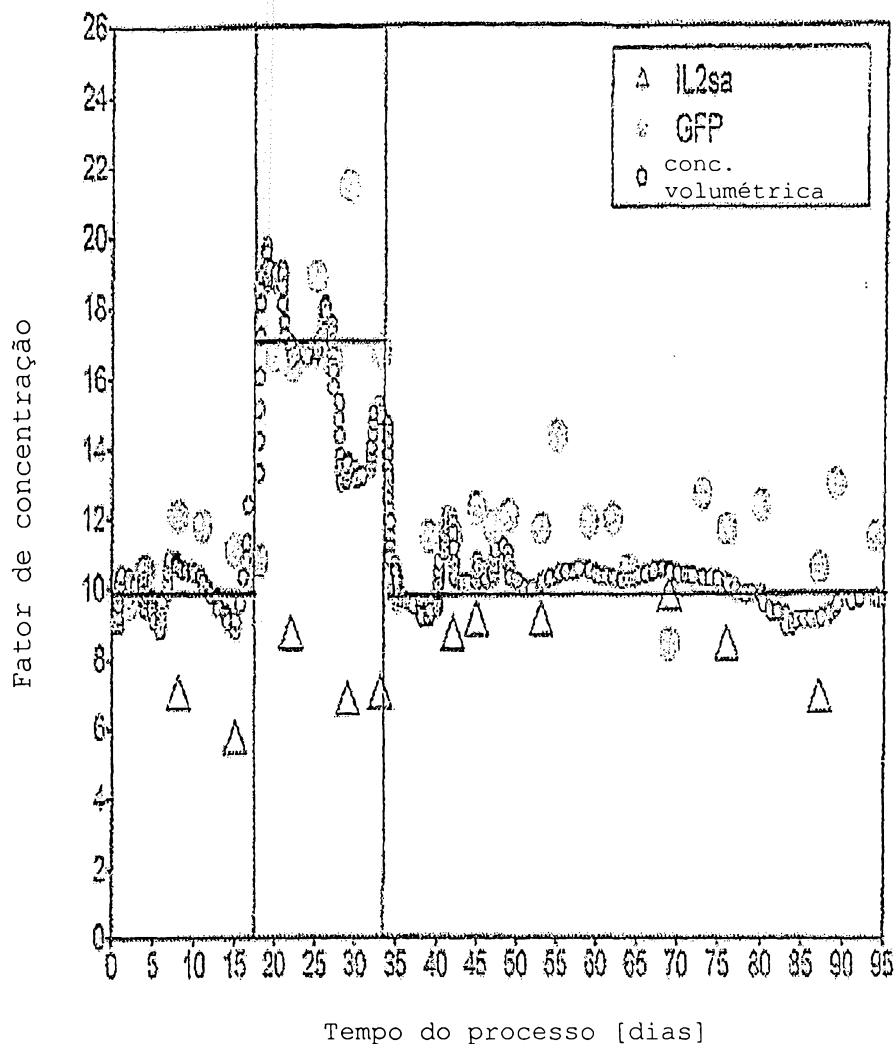


Figura 14: exemplo de desempenho de longo prazo de dispositivo inventivo A ligado diretamente à fermentação de perfusão contínua de dois produtos de proteína de co-expressão de linhagem celular (proteína fluorescente verde GFP e IL-2SA). A membrana de 10kD foi usada. Fator de concentração de produtos de proteína, conforme determinado por ensaios específicos e fator de concentração volumétrica mostrado como uma função de tempo de processo contínuo.

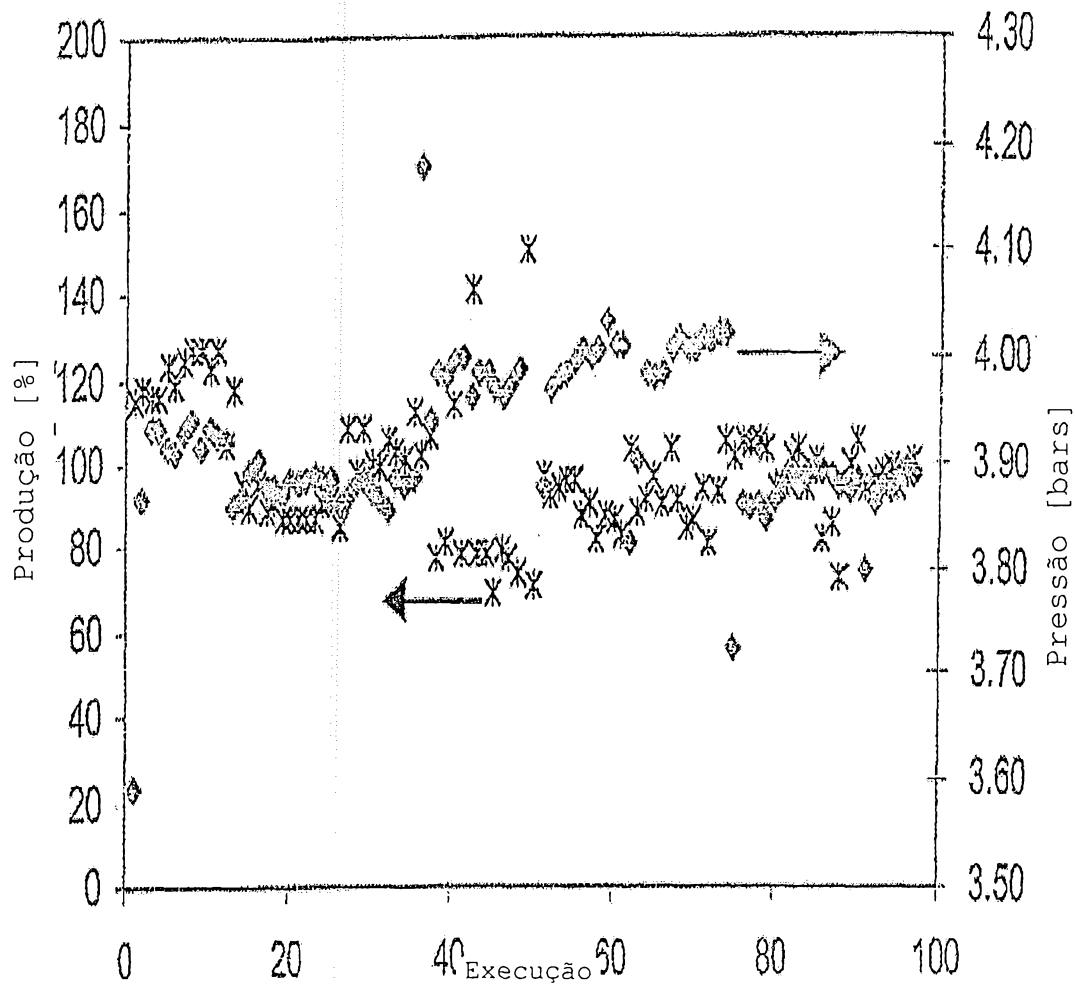


Figura 15: exemplo de desempenho do dispositivo inventivo B. A produção e a pressão caem próximas a 100 ciclos de adsorção/dessorção consecutivos com adsorvente convectivo (proteína-alvo: variante do Fator FVIII de coagulação sanguínea projetada geneticamente; adsorvente convectivo: adsorvente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

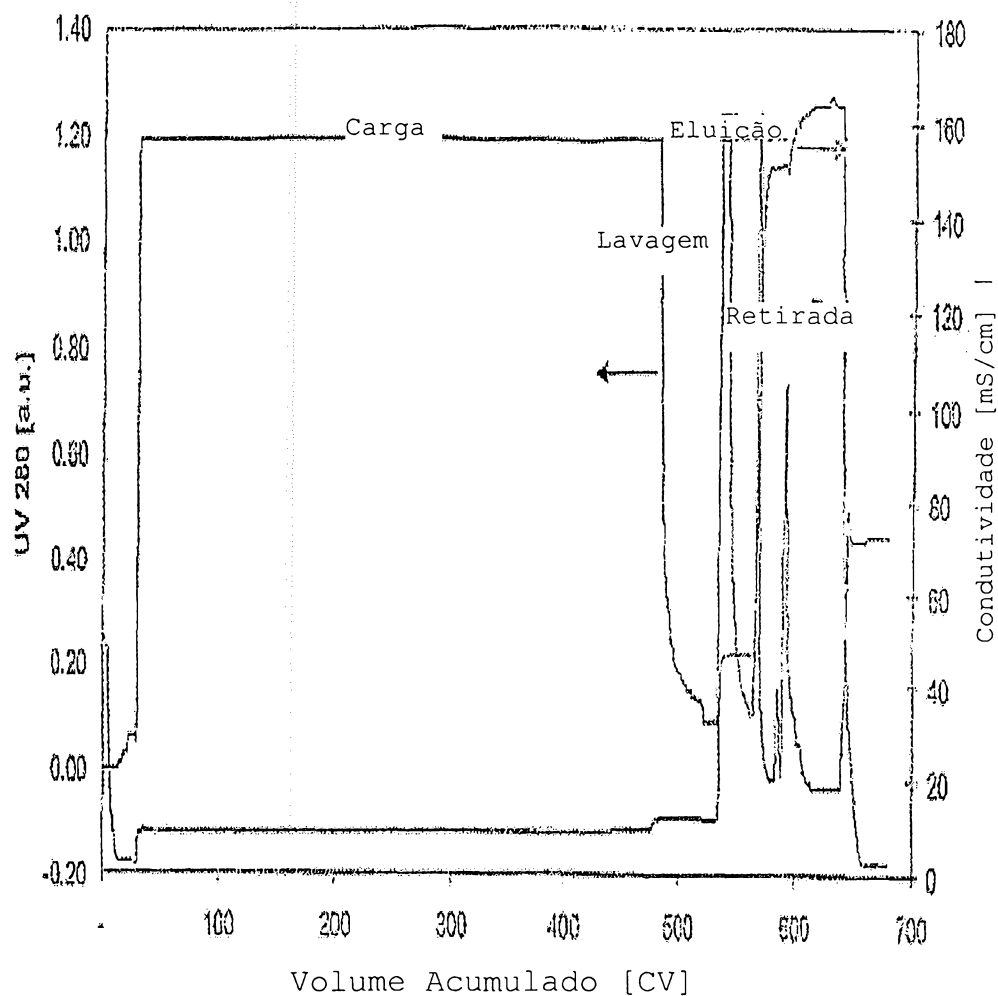


Figura 16: exemplo de desempenho do dispositivo inventivo B. Perfil de UV e condutividade durante um ciclo de adsorção/dessorção comum com adsorvente convectivo (proteína-alvo: variante do Fator FVIII de coagulação sanguínea projetada geneticamente; adsorvente convectivo: adsorvente comercial, Mustang Q, Pall Corporation).

Figura 17: exemplo de desempenho de dispositivo inventivo B. Gel SDS-page (mancha prata) de carga = colheita clarificada que sai continuamente do sistema de remoção de partícula (100) e carregada de modo semicontínuo no sistema adsorvente convectivo (400) e eluado de adsorção/dessorção comum mostrado. Proteína-alvo: variante do Fator FVIII de coagulação sanguínea projetada geneticamente; adsorvente convectivo: adsorvente comercial, Mustang Q, Pall Corporation). O eluado foi diluído de volta na concentração de carga antes de ser misturado no gel.

