



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 282 638**

⑤1 Int. Cl.:

B01D 37/00 (2006.01)

B01D 61/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/34 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **03734372 .0**

⑧6 Fecha de presentación : **04.06.2003**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1534404**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

⑤4 Título: **Uso de un modificador de clatrato para promover el paso de proteínas durante nanofiltración.**

③0 Prioridad: **14.06.2002 US 394733 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

⑦3 Titular/es: **CENTOCOR, Inc.**
244 Great Valley Parkway
Malvern, Pennsylvania 19355, US

⑦2 Inventor/es: **Rosenblatt, Barry y**
Siegel, Richard

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Uso de un modificador de clatrato para promover el paso de proteínas durante nanofiltración.

La invención se refiere al campo de purificación de proteínas, y a la recuperación de gran material proteico grande a través de filtros pequeños, de tamaño nanométrico de exclusión de poros, para retirar contaminantes tales como patógenos virales. La invención se refiere al uso de aditivos para promover la solubilidad de proteínas en soluciones que se filtran con el propósito de retirar los patógenos, particularmente los patógenos virales, y tiene aplicabilidad particular para la purificación de grandes biomoléculas proteicas, tales como inmunoglobulinas.

Antecedentes de la invención

Los procesos de separación de líquidos y gases son bien conocidos en la técnica. Los procesos más comunes de separación implican un cambio de fase, que aumenta los costes de los procesos, y requiere a menudo cambios de temperatura excesivos que pueden alterar el producto. Sin embargo, las separaciones con membrana pueden conseguir niveles deseados de separación sin cambiar la fase de las sustancias. En lo esencial, la separación con membrana fuerza selectivamente una o más sustancias a través de los poros de un filtro, dejando una o más sustancias más grandes detrás. Este proceso a menudo se repite, disminuyendo los tamaños de poro del filtro hasta que se consigue un nivel satisfactorio de separación.

El uso de la nanofiltración para retirar contaminantes tales como partículas virales de productos proteicos parenterales se basa en la capacidad de un filtro de tamaño de poro definido de permitir que una proteína soluble pase a su través rechazando el paso de partículas virales más grandes (DiLeo, AJ, *et al*, BioTechnology 1992, 10: 182, 188). La retirada de virus de biomoléculas grandes, tales como inmunoglobulinas (anticuerpos monoclonales o policlonales) por exclusión de tamaño, está impedida por la dificultad del paso de las grandes biomoléculas a través de los tamaños de poro de tamaño nanométrico, típicamente 12-15 nm. Aunque se espera que una proteína en solución, incluso una tan grande como una inmunoglobulina, tenga un radio molecular mucho más pequeño que una partícula viral, varios factores pueden conducir a una reducción eficaz del tamaño de poro y del coeficiente de tamizado. Algunos de estos factores se deben a interacciones entre la proteína y la superficie del filtro que provoca una acumulación sobre la superficie de la membrana conocida como capa de gelación o polarización. Otros factores, tales como la auto-asociación o agregación de las proteínas, causa que la proteína quede atrapada por el filtro debido a la formación de masas demasiado grandes para pasar a través de los poros del filtro o que tienen características superficiales que muestran afinidad por la superficie de la membrana o las superficies de los poros provocando que se adhieran a la membrana, en vez de atravesarla.

La solicitud de Patente Internacional WO 9600237, describe métodos para la nanofiltración satisfactoria usando tamaños de poro de tan sólo 15 nm para filtrar proteínas purificadas de peso molecular de menos de 150 kDa. El documento WO 9600237 describe el uso de concentraciones salinas que están en el intervalo de aproximadamente 0,2 M hasta la saturación de la solución en la filtración de los virus de proteínas, polisacáridos, y polipéptidos, para aumentar los coeficientes de tamizado. Los solicitantes establecen que la ventaja de la sal es porque la "proteína se contrae" y pasa más fácilmente a través del filtro. También se sugiere que el uso de un contenido salino elevado de acuerdo con este método posibilita el uso de la filtración "terminal" con membranas que tienen tamaños de poro de 5 - 30 nm. La filtración "terminal" se refiere a la práctica de usar una única bomba para forzar el fluido a través de la membrana desde la superficie. La filtración "terminal" es más sencilla y más rentable que el proceso de filtración tangencial, en el que una primera bomba mantiene un caudal constante en la superficie de la membrana y una segunda bomba extrae la proteína a través del filtro, creando una presión negativa (succión) detrás de la membrana.

El documento U.S. 6.096.872 reconoció la utilidad de añadir tensioactivos junto con tampones de elevada fuerza iónica durante la nanofiltración para retirar los virus de soluciones que contienen inmunoglobulina para reducir la dimerización, trimerización y agregación de las proteínas, cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia.

También se sabe generalmente que para reducir la interacción de una sustancia con la superficie de la membrana, el potencial "zeta" o "z" de la superficie de la membrana no debe ser atrayente eléctricamente para esa sustancia, y alterando las propiedades de carga de la membrana se puede minimizar la precipitación en la superficie. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.177.011 muestra que la neutralización de las cargas superficiales, medidas como potencial zeta puede reducir la adsorción superficial de sustancias que contaminan la membrana durante los procesos de filtración por ósmosis inversa, donde la sustancia lleva un grupo con carga. Cambios en el pH y la concentración salina son otros medios para alterar el potencial z de los solutos y la superficie de la membrana. Sin embargo, en algunos casos, la manipulación del potencial z por la adición de sal es contraproducente, provocando un aumento de la agregación soluble, y un aumento en el carácter hidrófobo de la superficie de la membrana, que puede promover la interacción con regiones hidrófobas de la proteína. Pall, *et al* (Colloids and Surface 1 (1980), 235-256) informaron de que el fenómeno de la retirada de partículas más pequeñas que los poros de un filtro se debe a la adherencia de las partículas a las paredes de los poros en condiciones en las que las partículas y las paredes de los poros tienen cargas opuestas, o alternativamente en las que el potencial zeta de las partículas y las paredes de los poros de la membrana es bajo. Zierdt (Applied and Environmental Microbiology, (1979) 38: 1166-1172) atribuyó el fenómeno mencionado anteriormente a las fuerzas electrostáticas. Además, estas modificaciones no dirigen los efectos de la geometría molecular o agregación de las proteínas en solución durante la filtración en membrana.

- Además de las consideraciones de los componentes del tampón y sus concentraciones, se debe de tener cuidado en mantener la proteína a filtrar en una concentración apropiada para mantener un buen flujo y una presión mínima transmembrana a través del filtro. El documento WO 9837086 muestra la adición del tampón al producto retenido para mantener la presión transmembrana durante el flujo tangencial de una etapa pretratamiento para retirar proteínas que tienen un peso molecular mayor que el de la proteína o de las proteínas producto. El documento WO 9837086 indica además que la nanofiltración se limita a proteínas terapéuticas que tienen un peso molecular de hasta 150 kDa. Las moléculas de inmunoglobulina G están compuestas de dos polipéptidos de cadena pesada, y dos de cadena ligera todos unidos covalentemente, y tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 180 kDa. El documento U.S. 6.096.972 pretende abordar el problema de cómo filtrar virus de los productos de IgG, incluyendo un excipiente no iónico, con un tampón de fuerza iónica fisiológica relativamente elevada (que es aproximadamente 300 mOsm). El uso de tampones de fuerza iónica elevada, sin embargo, puede conducir a agregación de proteína o a crear el problema de retirada de sales de la formulación del producto. El documento U.S. 6.096.873 muestra y reivindica una segunda etapa de nanofiltración para concentrar la inmunoglobulina y recogerla en un tampón de baja fuerza iónica.
- Estos métodos tienen diversas desventajas, particularmente en su eficacia. Por lo tanto, el objeto de la presente invención es superar los defectos de la técnica anterior, particularmente para desarrollar un sistema para filtrar de forma eficaz los virus patógenos de los productos de inmunoglobulina, proporcionando de este modo inmunoglobulina pura, libre de virus, para inyección.
- La configuración molecular, o el tamaño de una especie proteica se han predicho por cambios en el volumen específico parcial, y la auto-asociación de las proteínas. El cambio en el volumen específico parcial de las proteínas modificadas de este modo se ha demostrado por las mediciones independientes de coeficientes de sedimentación usando centrifugación analítica. El método descrito en este documento usa la adición de una sustancia modificadora de clatrato para modificar la configuración molecular de la proteína para minimizar el volumen específico y la agregación, potenciando de este modo el paso de la proteína a través de la membrana durante el proceso de nanofiltración.

Sumario de la invención

- El método de la invención maximiza el paso de proteínas durante la filtración en membrana usando aditivos de tampón dirigidos a aumentar la hidrofobicidad de la superficie de la membrana, y disminuir el radio hidrodinámico de la proteína, así como reducir la tendencia de auto-asociación de la proteína que se desea filtrar. El método de la invención, en primer lugar, maximiza el paso de proteínas, disminuyendo el pH, y las sales del tampón que aumenta la hidrofobicidad de la superficie de la membrana, y disminuye el radio hidrodinámico de la proteína. En segundo lugar, se incluye un modificador de clatrato en el tampón que disminuye el radio hidrodinámico de la proteína minimizando la tendencia de la proteína a asociarse con sí misma o el filtro de membrana. El modificador de clatrato es un azúcar de tipo poliol, o un alcohol de azúcar que tiene de 4 a 8 grupos hidroxilo. En tercer lugar, el proceso incluye opcionalmente un control en línea continuo de la filtración para mantener los parámetros anteriores de pH y constante de modificador de clatrato, manteniendo unos niveles locales bajos de proteína soluble. El uso de los métodos de la invención provoca un aumento del coeficiente de tamizado, y la capacidad de mantener una presión reducida a través de la membrana durante la filtración de las partículas de virus. El proceso es aplicable a la purificación de cualquier biomolécula proteica grande, particularmente las inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas pueden ser una inmunoglobulina monoclonal o policlonal.

- Como se ha indicado anteriormente, el modificador de clatrato de la presente invención es un azúcar de tipo poliol o alcohol de azúcar que tiene de 4 a 8 grupos hidroxilos. Ejemplos de polioles preferidos son azúcares, incluyendo monosacáridos y disacáridos, preferiblemente sacarosa. La concentración del poliol usado como modificador de clatrato será generalmente del 5% p/v o mayor. El uso de sacarosa causa una disminución en el tamaño de la molécula y una reducción en la tendencia de auto-asociación de la proteína que se desea liberar de las partículas de virus.

- De este modo, la invención contempla un método para purificar un material proteico, tal como una inmunoglobulina, que comprende las etapas de:

(a) mezclar el material proteico con:

- (i) una solución tampón de bajo pH y baja conductividad formulada para reducir el pH entre 5,0 y 6,0, y para conseguir una fuerza iónica de menos de 30 mS/cm;
- (ii) un tensioactivo no iónico; y
- (iii) el modificador de clatrato de la presente invención;

(b) realizar una nanofiltración del material proteico para obtener un material puro sustancialmente libre de partículas virales.

- El método de la invención puede también incluir realizar una etapa de filtración en línea y controlar la concentración del material instalando un monitor de control de la concentración en línea para mantener los parámetros de pH, y la concentración de proteína en los intervalos óptimos preestablecidos para el material que se está purificando.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación esquemática de los recipientes y el equipo de control usados en la nanofiltración y la dirección del flujo de fluido.

Descripción detallada

La presente invención usa una combinación de selección de tampón, tensioactivo no iónico, y el uso del modificador de clatrato de la presente invención como auxiliares de procesamiento durante la reducción viral o eliminación viral usando la nanofiltración de exclusión de tamaño, para la purificación de biomoléculas proteicas grandes. La invención permite el uso de un nanofiltro de exclusión de tamaño de poro pequeño con una molécula de proteína globular tal como una inmunoglobulina de un modo que permite un flujo eficaz, pérdida de rendimiento mínima y ningún cambio en el nivel global de caracterización o estabilidad de la inmunoglobulina.

Los virus retirados del material proteico por el método de nanofiltración de la presente invención incluyen todas las categorías potenciales de virus, tanto con envuelta (por ejemplo, VIH y Hepatitis B) como sin envuelta (por ejemplo Hepatitis A, Parvovirus B19).

Las ventajas del uso de los auxiliares de procesamiento y el método de la presente invención incluyen:

(1) la reducción del tiempo de procesamiento, y aumento en el rendimiento, ya que las condiciones empleadas aumentan la hidrofobicidad de la superficie de la membrana y reduce el volumen específico y agregación del material proteico;

(2) la capacidad de usar nanofiltros de tamaño de poro más pequeño, asegurando de este modo la retirada de partículas virales de tamaño más pequeño;

(3) el proceso puede estar automatizado para el control continuo que permite la eficacia máxima y el rendimiento de producto más elevado por área de filtro;

(4) las características esenciales del material proteico no están afectadas por el proceso, manteniendo la integridad y la calidad del producto final.

En sentido amplio, un clatrato es una asociación molecular en cuyo resultado puede formar una partícula. Los clatratos se incluyen entre aquellos complejos en los que un componente (la matriz) forma una cavidad, o en el caso de un cristal, una red cristalina que contiene espacios en forma de largos túneles o canales en los que se localizan entidades moleculares de una segunda especie química (el huésped). No hay enlaces covalentes entre huésped y la matriz debiéndose la atracción generalmente a fuerzas van der Waals. Si los espacios en la red de la matriz están cerrados por todos los lados de modo que la especie huésped esté “atrapada” como en una jaula, dichos compuestos se conocen como “clatratos” o “compuestos jaula”. Las fuerzas de van der Waals e interacciones hidrófobas unen el huésped con la molécula de matriz en los clatratos y los compuestos de inclusión. Ejemplos de moléculas con enlaces de hidrógeno que forman clatratos son hidroquinona y agua, y las moléculas de matriz de compuestos de inclusión, urea o tiourea.

Como se usa en este documento, el término “modificador de clatrato” significa una sustancia que es capaz de modificar la estructura de clatrato de una proteína en un ambiente acuoso, y reducir su volumen específico global. Sustancias tales como proteínas globulares grandes son buenos candidatos para ser modificadores de clatrato debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno en un entorno acuoso. El modificador de clatrato de tipo poliol de la presente invención modifica el complejo de clatrato del material proteico, reduciendo de este modo su volumen específico, y permitiendo una reducción del tiempo de procesamiento, y un mayor flujo en el proceso de nanofiltración.

En esta memoria descriptiva por “azúcares de tipo poliol y alcoholes de azúcar” se entiende un grupo de polioles que tienen de 4 a 8 grupos hidroxilo. Ejemplos de polioles preferidos son azúcares, incluyendo monosacáridos y disacáridos, y alcoholes de azúcar así como derivados de los mismos, que tienen de 4 a 8 grupos hidroxilo.

Ejemplos de monosacáridos que tienen 4 grupos hidroxilo son arabinosa, ribosa y xilosa. Un ejemplo de un alcohol de azúcar que tiene 4 grupos hidroxilo es el alcohol de azúcar derivado de la eritrosa, es decir eritritol.

Ejemplos de monosacáridos que tienen 5 grupos hidroxilo son galactosa, fructosa, glucosa y sorbosa. Un ejemplo de un alcohol de azúcar que tiene 5 grupos hidroxilo es el alcohol de azúcar derivado de xilosa, es decir, xilitol.

Ejemplos de alcoholes de azúcar que tienen 6 grupos hidroxilo son aquellos derivados de glucosa y sorbosa así como los productos de hidrólisis de la sacarosa, por ejemplo, sorbitol y manitol.

Ejemplos de disacáridos son maltosa, lactosa y sacarosa, siendo preferido el último, todos los cuales tienen 8 grupos hidroxilo.

El material proteico grande que puede procesarse de acuerdo con la presente invención incluye proteínas globulares grandes tales como inmunoglobulinas (por ejemplo IgG) y fragmentos de las mismas, factores de coagulación de la

sangre, hormonas de crecimiento, apolipoproteínas, enzimas y biomoléculas proteicas similares, sean de origen natural o se hayan producido por ingeniería genética.

La expresión “potencia z”, como se usa en este documento significa carga superficial. La carga superficial de una partícula se menciona a veces como potencial z, una medida de carga que disminuye con la distancia. El potencial z está en correlación directa con la polaridad o carga neta de una compuesto.

Como se usa en este documento, el término “nanofiltración” se refiere a la filtración usando un medio de exclusión de tamaño, en el que el tamaño de poro es de tamaño nanométrico. En general, el tamaño de poro de las unidades de nanofiltración, también mencionados como filtros UF, empleados en la producción de productos de inmunoglobulina sustancialmente puros, libres de virus de la presente invención, es menor de 30 nm, más preferiblemente menor de 15 nm. Sin embargo, cualquier membrana que tenga un índice de límite de filtración suficiente para reducir o retirar virus sin envuelta de una solución proteica puede emplearse en los métodos de procesamiento de la invención. Por ejemplo, puede emplearse la unidad VIREOLVE® 180 SYSTEM Ultrafiltration System (Millipore Corporation, Bedford, Mass.) teniendo dicha unidad un índice de tamaño de poro de menos de 180 KD de peso molecular, o aproximadamente 12 nm.

Los tensioactivos no iónicos, o detergentes que se pueden usar en la presente invención incluyen detergentes de polioxietileno no iónicos, por ejemplo, los polisorbatos, TWEENS; polímeros de vinilo, PLURONICS; polímeros o copolímeros de polioxietileno-polipropileno; Brij, Sterox-AG, y Tritons. El más preferido es el monooleato de polioxietilensorbitán, polisorbato 80 (TWEEN 80).

El tampón empleado en la invención se selecciona entre cualquier tampón de pH bajo, de baja conductividad adecuado tal como tampones fosfato, tampones citrato, tampones borato, tampones acetato, y tampones glicina, a un pH de aproximadamente 5,0. El tampón se emplea para mantener el pH por debajo de 6 y reducir la agregación de la proteína permitiendo de este modo un flujo más eficaz a través del nanofiltro. Preferiblemente, se emplea un tampón con una fuerza iónica de 50 mM +/- 20%, por ejemplo un tampón acetato sódico, pH 5,0.

El método implica transferir la proteína de interés a un tampón de pH bajo (pH 5,0-6,0), conductividad baja (10-20 mS/cm), que contiene un detergente no iónico, tal como TWEEN 80 a una concentración del 0,01% y sacarosa a una concentración entre el 5 y el 10% p/v. El aparato de flujo tangencial está en comunicación fluida con varios recipientes diferentes: un tanque de producto, un tanque de tampón, y un tanque de suministro/recirculación equipado con un agitador. La relación entre estos recipientes y el flujo de fluido entre ellos se muestra en la Fig. 1.

La concentración de proteína usada en el procesamiento de la presente invención está en el intervalo de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 1% en peso. Cuando la proteína es monomérica o monoclonal, se puede usar hasta aproximadamente el 1%. Para inmunoglobulinas tales como una IgG1 monoclonal quimérica, la concentración inicial de proteína usada para el procesamiento es de aproximadamente 1 a 10 mg/ml.

Durante el procesamiento y la filtración, la concentración de proteína se controla preferiblemente para mantener niveles óptimos. Como se muestra en la Fig. 1, esto puede conseguirse por la instalación de un monitor de concentración en línea. Puede colocarse un prefiltro terminal en línea entre el tanque de suministro/recirculación y el filtro UF. Se coloca un monitor UV en línea entre el filtro UF y el tanque de recirculación, en la línea de producto retenido para proporcionar una retroalimentación a los tanques de suministro y adición de tampón para permitir el mantenimiento de la concentración de proteína diana. El ajuste de la solución que contiene el producto prefiltrado se consigue mediante la adición de tampón en el tanque de suministro/recirculación para conseguir el pH, conductividad, y concentración de detergente y concentración de sacarosa deseados. La Fig. 1 muestra el flujo de fluido desde el tanque de suministro/recirculación. Durante la filtración, la concentración del producto retenido se mantiene constante mediante la adición de tampón para minimizar la interacción proteína-proteína. En el ejemplo mostrado, esto se consigue por el control de las bombas que suministran el producto en el tanque de recirculación. Aumentando/disminuyendo la velocidad de la bomba, la concentración puede mantenerse en un estrecho intervalo especificado. Se usa una célula de carga debajo del tanque de recirculación como retroalimentación de adición a la bomba de tampón para evitar el rebosamiento del tanque.

Durante la filtración, la presión a través la membrana está preferiblemente en el intervalo de 0,2 a aproximadamente 2,0 bar, más preferiblemente mantenida a menos de aproximadamente 1,0 bar. El coeficiente de tamizado estará preferiblemente en el intervalo del 75-95% con desviaciones no inferiores del 60%.

Ejemplo

Un ejemplo práctico de esta invención se demuestra en la producción de una IgG1 quimérica humana/de ratón. La proteína se coloca en el tanque de producto, después de la elución de una columna de intercambio catiónico a pH 5,0. El tanque de tampón se llena con acetato sódico 50 mM, sacarosa al 6%, polisorbato al 0,01% (Tween 80). La proteína y el tampón se mezclan para conseguir una concentración final de proteína de 2,0-0,2 mg/ml en el tanque de suministro. Se inicia la filtración con un caudal de xx ml/min/cm² y un índice de penetración de no más de yy ml/min/cm². La presión a través de la membrana y la concentración de producto retenido se controlan para asegurar que el proceso permanece en los límites prescritos. Una vez que el tanque de producto se ha vaciado, los filtros se aclaran con 3 veces el volumen de mantenimiento del sistema para maximizar el rendimiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar un material proteico, que comprende las etapas de:

(a) mezclar el material proteico con:

- (i) una solución de tampón de bajo pH, baja conductividad formulada para reducir el pH entre 5,0 y 6,0, y para conseguir una fuerza iónica de menos de 30 mS/cm;
- (ii) un tensioactivo no iónico; y
- (iii) un azúcar de tipo poliol o alcohol de azúcar que tiene de 4 a 8 grupos hidroxilo;

y

(b) realizar una nanofiltración del material proteico para obtener un material purificado sustancialmente libre de partículas virales.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el material proteico es una inmunoglobulina.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que el poliol es un monosacárido o un disacárido.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el poliol es sacarosa.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la concentración del poliol es de aproximadamente el 5% p/v o mayor.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

a) mezclar el material proteico con una solución de tampón;

b) ajustar el pH y la fuerza iónica del tampón, de modo que el pH sea 5,0-6,0 y la fuerza iónica sea menor de 30 mS/cm;

c) añadir un tensioactivo al tampón para minimizar las interacciones proteína-proteína, y proteína-membrana;

d) añadir un azúcar de tipo poliol o un alcohol de azúcar, que tiene de 4 a 8 grupos hidroxilo, en el que el azúcar de tipo poliol o alcohol de azúcar

i) reduce el radio hidrodinámico de la proteína y

ii) minimiza la auto-asociación de la proteína;

e) instalar un prefiltro en línea al sistema;

f) instalar un monitor de control de la concentración en línea al sistema; y

g) usar información del monitor de control de la concentración en línea para mantener los parámetros de pH del tampón y la concentración de proteína en el intervalo de pH 5,0-6,0 y la fuerza iónica menor de 30 mS/cm.

Viresolve y Proceso de Concentración/Diafiltración

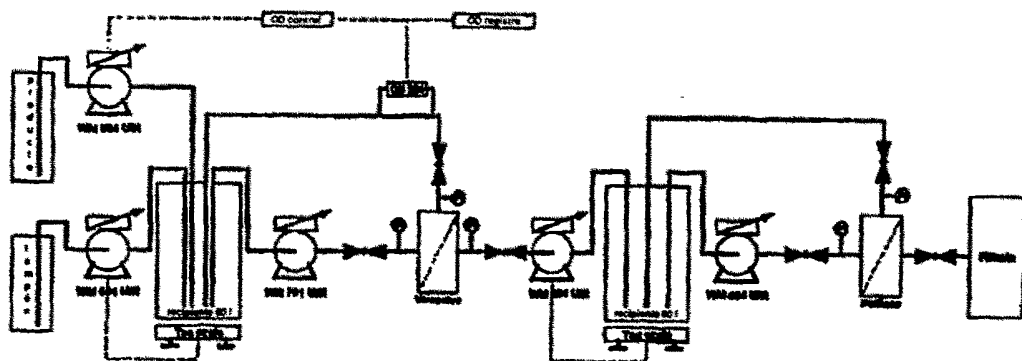


Figura 1