

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 891 728**

(51) Int. Cl.:
C12M 1/00
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2014 PCT/US2014/055897**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15039115**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2014 E 14780959 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 3047013**

(54) Título: **Métodos y sistemas para procesar un cultivo celular**

(30) Prioridad:

16.09.2013 US 201361878502 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2022

(73) Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

(72) Inventor/es:

**ZHOU, HANG;
WRIGHT, BENJAMIN;
YU, MARCELLA;
YIN, JIN y
KONSTANTINOV, KONSTANTIN**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 891 728 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y sistemas para procesar un cultivo celular

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a métodos de procesamiento de un cultivo celular y biotecnología y, más específicamente, a métodos de procesamiento continuo de un cultivo celular en un biorreactor de perfusión.

ANTECEDENTES

Las células de mamífero se usan, con frecuencia, para producir proteínas terapéuticas. En algunos métodos de procesamiento, las células de mamífero se cultivan en un biorreactor de perfusión, un volumen de cultivo celular que contiene la proteína recombinante se retira del biorreactor, y un nuevo medio de cultivo se añade para reemplazar el volumen. En dichos métodos de cultivo por perfusión, el cultivo celular retirado se filtra, con frecuencia, para retener las células de mamífero en el biorreactor para una mayor producción de proteínas recombinantes, mientras el medio de cultivo (al que a veces se hace referencia como "medio gastado") que contiene una proteína recombinante se recupera.

Los métodos y dispositivos convencionales para filtrar cultivo celular de un biorreactor tienen varias desventajas. Por ejemplo, la filtración del flujo tangencial alterno (ATF, por sus siglas en inglés) de sistema cerrado resulta en que el cultivo celular pasa un largo período fuera de las condiciones de crecimiento controladas por el biorreactor (tiempo de residencia externa largo), y la filtración del flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) unidireccional tradicional, sin flujo inverso, provoca ensuciamiento en el filtro. Como tales, los métodos de biorreactor de perfusión convencionales con frecuencia implican que el cultivo celular pase un largo período fuera de las condiciones de crecimiento controladas por el biorreactor, lo cual lleva a reducciones en la densidad celular viable, porcentaje de viabilidad y productividad volumétrica y específica del cultivo. Además, métodos previos con frecuencia resultan en una descarga incompleta de filtros de sistema, lo cual lleva a ensuciamiento del filtro.

El documento US2011/0111486 describe un biorreactor que comprende: un contenedor para contener un cultivo fluido; una primera válvula unidireccional; una segunda válvula unidireccional y una bomba de diafragma en comunicación fluida con la primera y segunda válvulas, en donde la primera válvula unidireccional permite que el cultivo fluido fluya lejos del contenedor y hacia la bomba de diafragma y la segunda válvula unidireccional permite que el cultivo fluido fluya hacia el contenedor y lejos de la bomba de diafragma.

El documento WO2014/051503, el cual se considera comprendido en la última tecnología según el Artículo 54(3) EPC, describe un sistema para el cultivo por perfusión de células que comprende a) al menos un biorreactor, b) al menos una unidad de filtro que comprende un extremo de entrada retenido, un extremo de salida retenido y al menos un puerto de salida permeado, c) al menos una bomba reciprocante conectada, de manera fluídica, al extremo de entrada retenido, en donde dicho extremo de entrada retenido se conecta, de manera fluídica, a dicho biorreactor mediante una válvula de retención de entrada dispuesta para permitir el flujo en la dirección del biorreactor al extremo de entrada retenido y para bloquear el flujo en la dirección inversa, y en donde dicho extremo de salida retenido se conecta, de manera fluídica, a dicho biorreactor mediante una válvula de retención de salida dispuesta para permitir el flujo en la dirección del extremo de salida retenido al biorreactor y para bloquear el flujo en la dirección inversa.

COMPENDIO

Los solicitantes han descubierto que un sistema de filtración de circuito abierto que provee flujo de fluido tangencial reversible a lo largo de una superficie de un filtro de flujo cruzado, en oposición a sistemas de filtración de circuito abierto unidireccionales o de circuito cerrado bidireccionales convencionales, provee densidad celular viable aumentada, porcentaje aumentado de células viables, productividad específica y/o volumétrica aumentada, consumo de glucosa específico aumentado y ensuciamiento de filtro reducido. En la presente descripción, el término recipiente se comprenderá como biorreactor.

Los sistemas de filtración de circuito abierto provistos en la presente memoria proveen condiciones óptimas para la producción y rendimiento de la proteína recombinante como, por ejemplo, uno o más de volumen externo reducido de cultivo celular (fuera del recipiente), fracción de intercambio aumentada (p. ej., dentro del primer conducto, la unidad TFF, y el segundo conducto), tiempo de residencia externa reducido del cultivo celular (fuera del recipiente), tensión cortante reducida durante la filtración del cultivo celular, viabilidad celular mejorada en el cultivo celular, densidad celular viable elevada en el cultivo celular, y/o ensuciamiento de filtro reducido (debido a una mejor descarga del(de los) filtro(s)), p. ej., en comparación con otros sistemas de filtración de circuito abierto unidireccionales (p. ej., sistemas TFF unidireccionales) o sistemas de filtración de circuito cerrado bidireccionales (sistemas ATF™ de circuito cerrado). Por consiguiente, en la presente memoria se proveen sistemas de filtración de circuito abierto que incluyen un biorreactor, una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) que tiene primera y segunda entradas, un primer conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la primera entrada de la unidad TFF, y un segundo conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la segunda entrada de la unidad TFF, y al menos una bomba dispuesta dentro del sistema, de modo que el accionamiento de la al menos una bomba hace fluir el fluido de manera reversible a través

del sistema desde el biorreactor, a través del primer conducto, la unidad TFF, el segundo conducto y otra vez al biorreactor.

5 También se proveen métodos de procesamiento de un cultivo celular que incluyen (a) proveer un sistema de filtración de circuito abierto (p. ej., cualquiera de los sistemas de filtración de circuito abierto descritos en la presente memoria), (b) hacer fluir el cultivo celular desde el recipiente a través de la unidad TFF en una primera dirección de flujo durante un primer período, (c) invertir la primera dirección de flujo y hacer fluir el cultivo celular a través de la unidad TFF en una segunda dirección de flujo durante un segundo período, (d) invertir la segunda dirección de flujo y hacer fluir el cultivo a través de la unidad TFF en la primera dirección de flujo durante un tercer período, (e) repetir las etapas (c) - (d) al menos dos veces, y (f) recoger el filtrado.

10 En la presente memoria se proveen métodos de procesamiento de un cultivo celular. Dichos métodos incluyen las etapas de: (a) proveer un sistema de filtración de circuito abierto que incluye un recipiente que comprende un cultivo celular, una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) que tiene primera y segunda entradas, un primer conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la primera entrada de la unidad TFF, y un segundo conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la segunda entrada de la unidad TFF, y al menos una bomba dispuesta dentro 15 del sistema para hacer fluir fluido a través del sistema, donde el sistema se configura de modo que el fluido puede fluir de manera reversible a través del sistema desde o al recipiente y a través del primer y segundo conductos y la unidad TFF mediante la al menos una bomba, y el filtrado puede recogerse de la unidad TFF; (b) hacer fluir el cultivo celular desde el recipiente a través de la unidad TFF en una primera dirección de flujo durante un primer período, (c) invertir la primera dirección de flujo y hacer fluir el cultivo celular a través de la unidad TFF en una segunda dirección de flujo 20 durante un segundo período; (d) invertir la segunda dirección de flujo y hacer fluir el cultivo a través de la unidad TFF en la primera dirección de flujo durante un tercer período; (e) repetir las etapas (c) - (d) al menos dos veces; y (f) recoger el filtrado. En algunos ejemplos, el recipiente es un biorreactor o un tanque de retención refrigerado. En algunos ejemplos, uno o ambos del primer y segundo conductos incluyen tubería biocompatible. La unidad TFF puede incluir un solo filtro de flujo cruzado (p. ej., un filtro de flujo cruzado tubular) o puede incluir dos o más filtros de flujo 25 cruzado.

En algunos ejemplos, el sistema incluye una o más unidades TFF adicionales dispuestas en el primer conducto, el segundo conducto, o ambos. En algunos ejemplos, el(los) filtro(s) de flujo cruzado tiene(n) un tamaño de poro promedio de alrededor de 0,2 micrómetros.

30 En algunos ejemplos, la al menos una bomba se dispone en el primer conducto o en el segundo conducto, o en ambos. En ejemplos adicionales, la al menos una bomba se dispone en el sistema entre cualesquiera dos unidades TFF. En algunos casos, la al menos una bomba se dispone en el recipiente y proximal al primer o segundo conducto de fluido. En algunas realizaciones de todos los métodos descritos en la presente memoria, la al menos una bomba es una bomba de turbulencia baja (LTP, por sus siglas en inglés) (p. ej., una bomba peristáltica). En algunos ejemplos, el sistema incluye una primera y una segunda LTP, en donde la primera LTP hace fluir el cultivo celular en la primera dirección y la segunda LTP hace fluir el cultivo celular en la segunda dirección. En algunas realizaciones, el sistema incluye una sola LTP, donde la única LTP hace fluir el cultivo celular en la primera dirección durante el primer y tercer períodos y hace fluir el cultivo celular en la segunda dirección durante el segundo período.

35 En cualquier de los métodos descritos en la presente memoria, el primer, segundo y tercer períodos son de alrededor de 30 segundos a alrededor de 15 minutos. En algunas realizaciones, el cultivo celular fluye en una o más de (a), (b) y (c) a una velocidad de entre alrededor de 0,5 L/minuto y alrededor de 80 L/minuto (p. ej., entre alrededor de 3,0 L/minuto y alrededor de 60 L/minuto).

40 La única repetición de (b) y (c) puede resultar en una fracción de intercambio de más del 50%. En algunos ejemplos, el filtrado no contiene una célula de mamífero. El cultivo celular puede contener una proteína recombinante secretada y el filtrado contiene la proteína recombinante secretada. La proteína recombinante secretada puede ser un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de aquél, un factor de crecimiento, una citocina, o una enzima, o una combinación de ellos. El método puede además incluir una etapa de aislamiento de la proteína recombinante secretada del filtrado. Por ejemplo, el aislamiento puede llevarse a cabo utilizando un proceso integrado y continuo que incluye el aislamiento a través de al menos un sistema de cromatografía multicolumna (MCCS, por sus siglas en inglés). El método puede además incluir una etapa de formular una sustancia de fármaco terapéutico mediante mezcla de la proteína recombinante aislada con un excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el cultivo celular o filtrado, o ambos, son estériles. En algunos ejemplos, el método se lleva a cabo de forma continua durante un período de entre alrededor de 14 días a alrededor de 80 días.

45 También se proveen sistemas de filtración de circuito abierto que incluyen un recipiente, una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) que tiene primera y segunda entradas, un primer conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la primera entrada de la unidad TFF, y un segundo conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la segunda entrada de la unidad TFF, y al menos una bomba dispuesta dentro del sistema, donde el accionamiento de la al menos una bomba hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente, a través del primer conducto, la unidad TFF, el segundo conducto y otra vez al recipiente. El recipiente es un biorreactor. En algunos ejemplos, uno o ambos del primer y segundo conductos comprenden tubería biocompatible. En algunos casos, la unidad TFF incluye un solo filtro de flujo cruzado (p. ej., un filtro de flujo cruzado tubular). En algunos casos, la

unidad TFF incluye dos o más filtros de flujo cruzado. En algunos ejemplos, el sistema incluye una o más unidades TFF adicionales dispuestas en el primer conducto, en el segundo conducto, o en ambos. En algunos sistemas, el(los) filtro(s) de flujo cruzado tiene(n) un tamaño de poro promedio de alrededor de 0,2 micrómetros.

- 5 En algunas realizaciones de los sistemas descritos en la presente memoria, la al menos una bomba se dispone en el primer conducto o en el segundo conducto, o en ambos. En algunos casos, la al menos una bomba se dispone en el sistema entre cualesquiera dos unidades TFF. En otros ejemplos, la al menos una bomba se dispone en el recipiente y proximal al primer o segundo conducto de fluido. En cualquiera de los sistemas descritos en la presente memoria, la al menos una bomba es una bomba de turbulencia baja (LTP) (p. ej., una bomba peristáltica). En algunas realizaciones, el sistema incluye una primera y una segunda LTP, donde la primera LTP se adapta para hacer fluir el cultivo celular en una primera dirección de flujo y la segunda LTP se adapta para invertir la primera dirección de flujo y hacer fluir el cultivo celular en una segunda dirección de flujo. En otras realizaciones, el sistema incluye una sola LTP adaptada para hacer fluir, de manera reversible, el cultivo celular en una primera y segunda direcciones de flujo. En algunos casos, la bomba peristáltica tiene un volumen de altura de bombeo de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 250 mL.
- 10 15 Los sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir un tanque de retención de filtrado y un conducto de filtrado en comunicación fluida entre la unidad TFF y el tanque de retención de filtrado. Algunos sistemas descritos en la presente memoria además incluyen un sistema de fabricación biológico que comprende al menos un sistema de cromatografía multicolumna (MCCS) y una entrada y una salida y un conducto de filtrado en comunicación fluida entre la unidad TFF y la entrada del sistema de fabricación biológico, en donde el dispositivo se configura de modo que el filtrado pasa hacia la entrada del sistema de fabricación biológico, a través del al menos un MCCS, y abandona el dispositivo a través de la salida del sistema de fabricación biológico. En cualquiera de los sistemas descritos en la primera memoria, la unidad TFF se dispone en una carcasa.
- 20 25 Según su uso en la presente memoria, la palabra "un/una" o "múltiples" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo particular. Por ejemplo, la frase "una célula de mamífero" representa "una o más células de mamífero", y la frase "múltiples microportadores" significa "uno o más microportadores".

El término "célula de mamífero" significa cualquier célula de o derivada de cualquier mamífero (p. ej., un humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca, o un conejo). En algunas realizaciones, la célula de mamífero puede ser, p. ej., una célula inmortalizada, una célula diferenciada, o una célula no diferenciada.

- 30 35 El término "cultivo celular" significa múltiples células de mamífero (p. ej., cualquiera de las células de mamífero descritas en la presente memoria) suspendidas en un medio de cultivo líquido (p. ej., cualquiera de los medios de cultivo líquidos descritos en la presente memoria). El cultivo celular puede tener una densidad celular de más de alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL (p. ej., de más de alrededor de 1×10^6 células/mL, de más de alrededor de 5×10^6 células/mL, de más de alrededor de 10×10^6 células/mL, de más de alrededor de 15×10^6 células/mL, de más de alrededor de 20×10^6 células/mL, de más de alrededor de 25×10^6 células/mL, de más de alrededor de 30×10^6 células/mL, de más de alrededor de 35×10^6 células/mL, de más de alrededor de 40×10^6 células/mL, de más de alrededor de 45×10^6 células/mL, de más de alrededor de 50×10^6 células/mL, de más de alrededor de 55×10^6 células/mL, de más de alrededor de 60×10^6 células/mL, de más de alrededor de 65×10^6 células/mL, de más de alrededor de 70×10^6 células/mL, de más de alrededor de 75×10^6 células/mL, de más de alrededor de 80×10^6 células/mL, de más de alrededor de 85×10^6 células/mL, de más de alrededor de 90×10^6 células/mL, de más de alrededor de 95×10^6 células/mL, o de más de alrededor de 100×10^6 células/mL). En algunos ejemplos, las células de mamífero presentes en un cultivo celular se fijan a microportadores (p. ej., cualesquiera de los microportadores descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica).
- 40 45 50 55

El término "biorreactor" es conocido en la técnica y significa un recipiente que puede incubar un cultivo celular bajo un conjunto controlado de condiciones físicas que permiten el mantenimiento o crecimiento de una célula de mamífero en un medio de cultivo líquido. Por ejemplo, el biorreactor puede incubar un cultivo celular bajo condiciones que permiten que una célula de mamífero en el cultivo celular produzca y secrete una proteína recombinante. Por ejemplo, un biorreactor normalmente incluye un rociado de O₂ y N₂, una camisa térmica, uno o más puertos de fluido, y un sistema de agitación. Ejemplos no restrictivos de biorreactores se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de biorreactores se conocen en la técnica.

- 50 55 El término "sistema de filtración de circuito abierto" significa un recipiente (p. ej., un biorreactor) y un bucle de fluido cerrado continuo que comienza y finaliza en un recipiente, e incluye una unidad TFF a través de la cual un fluido (p. ej., un cultivo celular) en el bucle de fluido cerrado puede pasar a y desde el recipiente (en una primera o segunda dirección de flujo) a través de la unidad TFF y otra vez al recipiente. El sistema de filtración de circuito abierto también incluye al menos una bomba adecuada para bombear el fluido (p. ej., cultivo celular) a y/o desde el recipiente a través de la unidad TFF y otra vez al recipiente.

Los términos "unidad de filtración de flujo tangencial" o "unidad TFF" son conocidos en la técnica y significan un dispositivo que incluye al menos una carcasa (como, por ejemplo, un cilindro) y al menos un filtro de flujo cruzado posicionado en la carcasa de modo que una gran porción de la superficie del filtro se posiciona paralela al flujo de un fluido (p. ej., un cultivo celular) a través de la unidad. Las unidades TFF son conocidas en la técnica y se encuentran

comercialmente disponibles. Unidades TFF comercialmente disponibles a modo de ejemplo incluyen cápsulas TFF Minimate™ (Pall Corporation), sistemas Vivaflow® 50 y 200 (Sartorius), cápsulas BioCap 25, E0170, E0340 y E1020 (3M), y filtro ATF4 (Refine Technology). La carcasa puede incluir una primera entrada/salida y una segunda entrada/salida posicionadas, p. ej., para permitir que el fluido pase a través de la primera entrada/salida, cruce el al menos un filtro de flujo cruzado, y a través de la segunda entrada/salida. En algunos ejemplos, un sistema de filtración de circuito abierto puede incluir múltiples unidades TFF, p. ej., conectadas en serie y/o en paralelo. Por ejemplo, un sistema que incluye dos o más unidades TFF puede incluir conductos de fluido que conectan, de manera fluida, pares vecinos de unidades TFF en el sistema. En otros ejemplos, un sistema puede incluir dos o más conjuntos de dos o más unidades TFF conectadas, de manera fluida, por conductos de fluido. Cualquier de las unidades TFF descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica pueden recibir fluido en una primera dirección de flujo y en una segunda dirección de flujo.

El término "filtro de flujo cruzado" es conocido en la técnica y significa un filtro diseñado de modo que pueda posicionarse en una unidad TFF de modo que una gran porción de la superficie de filtro es paralela al flujo (p. ej., primera y segunda direcciones de flujo) de un fluido (p. ej., un cultivo celular). Por ejemplo, un filtro de flujo cruzado 15 puede tener cualquier forma que permita la filtración de flujo tangencial, p. ej., una forma tubular o rectangular. Filtros de flujo cruzado particularmente útiles se diseñan para resultar en una cantidad baja de turbulencia de fluido o tensión cortante en el fluido (p. ej., cultivo celular) cuando el fluido fluye en una primera y segunda direcciones a lo largo de la superficie del filtro de flujo cruzado. Los filtros de flujo cruzado son comercializados, p. ej., por Sartorius, MembraPure, Millipore, y Pall Corporation.

20 El término "bomba de turbulencia baja" o "LTP" es conocido en la técnica y significa un dispositivo que puede mover un fluido (p. ej., un cultivo celular) dentro del sistema en una sola dirección (p. ej., una primera o segunda dirección de flujo) o hacer fluir, de manera reversible, un fluido (p. ej., un cultivo celular) en dos direcciones (una primera y segunda 25 direcciones de flujo) dentro del sistema sin inducir una cantidad sustancial de tensión cortante o turbulencia de fluido en el fluido (p. ej., cultivo celular). Cuando una LTP se usa para hacer fluir un fluido (p. ej., un cultivo celular) en una primera y una segunda direcciones de flujo alternas, la segunda dirección de flujo es aproximadamente opuesta a la primera dirección de flujo. Un ejemplo de una LTP es una bomba peristáltica. Otros ejemplos de LTP se conocen en la técnica.

30 Los términos "invertir el flujo" o "invertir la dirección de flujo" son conocidos para las personas con experiencia en la técnica. Por ejemplo, las personas con experiencia en la técnica apreciarán que la inversión del flujo de un fluido significa cambiar la dirección de flujo general de un fluido a una dirección de flujo, en general, opuesta (p. ej., dirección 35 de flujo de un cultivo celular en cualquiera de los métodos o sistemas descritos en la presente memoria).

El término "fracción de intercambio" significa el porcentaje de fluido (p. ej., cultivo celular) que retorna al recipiente 35 después de hacer fluir el fluido a través de los componentes de un sistema de filtración de circuito abierto fuera del recipiente (p. ej., a través del primer conducto, de la al menos una unidad TFF, y del segundo conducto) en una primera dirección durante un primer período y hacer fluir el fluido en una segunda dirección durante un segundo período.

40 El término "sustancialmente libre" significa una composición (p. ej., un líquido o sólido) que es al menos o alrededor de 90% libre (p. ej., al menos o alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos o alrededor de 99% libre, o alrededor de 100% libre) de una sustancia específica (p. ej., una célula de mamífero o proteína de célula de mamífero huésped o ácido nucleico). Por ejemplo, un filtrado generado mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria 45 puede ser sustancialmente libre de una célula de mamífero o un microportador. En otro ejemplo, una proteína recombinante aislada mediante el uso de cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria puede ser sustancialmente libre de una proteína de célula de mamífero huésped, ácido nucleico y/o un virus contaminante.

50 El término "cultivo" o "cultivo celular" significa el mantenimiento o crecimiento de una célula de mamífero en un medio de cultivo líquido bajo un conjunto controlado de condiciones físicas.

45 El término "medio de cultivo líquido" significa un fluido que contiene suficientes nutrientes para permitir que una célula de mamífero crezca en el medio *in vitro*. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido puede contener uno o más de: aminoácidos (p. ej., 20 aminoácidos), una purina (p. ej., hipoxantina), una pirimidina (p. ej., timidina), colina, inositol, tiamina, ácido fólico, biotina, calcio, niacina, piridoxina, riboflavina, timidina, cianocobalamina, piruvato, ácido lipoico, magnesio, glucosa, sodio, potasio, hierro, cobre, zinc, selenio, y otros metales traza necesarios, y bicarbonato de sodio. Un medio de cultivo líquido puede contener suero de un mamífero. En algunas instancias, un medio de cultivo líquido no contiene suero u otro extracto de un mamífero (un medio de cultivo líquido definido). Un medio de cultivo líquido puede contener metales traza, una hormona de crecimiento de mamíferos, y/o un factor de crecimiento de mamíferos. Ejemplos no restrictivos de medio de cultivo líquido se describen en la presente memoria y ejemplos adicionales son conocidos en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles.

55 El término "microportador" significa una partícula (p. ej., un polímero orgánico) que tiene un tamaño de entre 20 µm a alrededor de 1000 µm que contiene una superficie que es permisiva o promueve la fijación de una célula de mamífero (p. ej., cualquiera de las células de mamífero descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica). Un microportador puede contener uno o más poros (p. ej., poros con un diámetro promedio de alrededor de 10 µm a alrededor de 100 µm). Ejemplos no restrictivos de microportadores se describen en la presente memoria. Ejemplos

adicionales de microportadores se conocen en la técnica. Un microportador puede contener, p. ej., un polímero (p. ej., celulosa, glicol de polietileno, o ácido poli-(láctico-co-glicólico)).

El término "medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animal" significa un medio de cultivo líquido que no contiene componentes (p. ej., proteínas o suero) derivados de un animal.

5 El término "medio de cultivo líquido libre de suero" significa un medio de cultivo líquido que no contiene suero animal.

El término "medio de cultivo líquido que contiene suero" significa un medio de cultivo líquido que contiene suero animal.

El término "medio de cultivo líquido químicamente definido" significa un medio de cultivo líquido en el cual sustancialmente todos los componentes químicos son conocidos. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido químicamente definido no contiene suero fetal bovino, albúmina de suero bovino, o albúmina de suero humana, dado que dichas preparaciones contienen, normalmente, una mezcla compleja de albúminas y lípidos.

10 El término "medio de cultivo líquido libre de proteínas" significa un medio de cultivo líquido que no contiene proteínas (p. ej., cualquier proteína detectable).

El término "inmunoglobulina" significa un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 15 aminoácidos (p. ej., al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos) de una proteína de inmunoglobulina

15 (p. ej., una secuencia de dominio variable, una secuencia de estructura, o una secuencia de dominio constante). La inmunoglobulina puede, por ejemplo, incluir al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena ligera y/o al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena pesada. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo aislado (p. ej., IgG, IgE, IgD, IgA o IgM). La inmunoglobulina puede ser una subclase de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). La inmunoglobulina puede ser un fragmento de anticuerpo, p. ej., un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, o

20 un fragmento scFv. La inmunoglobulina puede ser también un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico, o un dímero, trímero, o anticuerpo multímero, o un diacuerpo, Affibody®, o Nanobody®. La inmunoglobulina puede también ser una proteína diseñada que contiene al menos un dominio de inmunoglobulina (p. ej., una proteína de fusión). Ejemplos no restrictivos de inmunoglobulinas se describen en la presente memoria y ejemplos adicionales de inmunoglobulinas se conocen en la técnica.

25 El término "fragmento de proteína" o "fragmento de polipéptido" significa una porción de una secuencia de polipéptidos que es al menos o alrededor de 4 aminoácidos, p. ej., al menos o alrededor de 5 aminoácidos, al menos o alrededor de 6 aminoácidos, al menos o alrededor de 7 aminoácidos, al menos o alrededor de 8 aminoácidos, al menos o alrededor de 9 aminoácidos, al menos o alrededor de 10 aminoácidos, al menos o alrededor de 11 aminoácidos, al menos o alrededor de 12 aminoácidos, al menos o alrededor de 13 aminoácidos, al menos o alrededor de 14 aminoácidos, al menos o alrededor de 15 aminoácidos, al menos o alrededor de 16 aminoácidos, al menos o alrededor de 17 aminoácidos, al menos o alrededor de 18 aminoácidos, al menos o alrededor de 19 aminoácidos, al menos o alrededor de 20 aminoácidos de longitud, o más de 20 aminoácidos de longitud. Un fragmento de proteína recombinante puede producirse usando cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

30 35 El término "proteína diseñada" significa un polipéptido que no se codifica naturalmente por un ácido nucleico endógeno presente en un organismo (p. ej., un mamífero). Ejemplos de proteínas diseñadas incluyen enzimas (p. ej., con sustituciones, eliminaciones, inserciones, o adiciones de uno o más aminoácidos que resultan en un aumento de estabilidad y/o actividad catalítica de la enzima diseñada), proteínas de fusión, anticuerpos (p. ej., anticuerpos divalentes, anticuerpos trivalentes, o un diacuerpo), y proteínas de unión al antígeno que contienen al menos una secuencia de andamiaje recombinante.

40 45 El término "aislar" o "que aísla(n)" en ciertos contextos significa purificar o purificar al menos parcialmente (p. ej., al menos o alrededor de 5%, p. ej., al menos o alrededor de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos o alrededor de 95% puro en peso) una proteína recombinante de uno o más componentes diferentes presentes en el filtrado (p. ej., un filtrado generado utilizando los métodos descritos en la presente memoria), por ejemplo, uno o más componentes de ADN, ARN y/u otras proteínas presentes en el filtrado. Métodos no restrictivos para aislar una proteína de un filtrado se describen en la presente memoria y otros se conocen en la técnica.

50 El término "proteína secretada" o "proteína recombinante secretada" significa una proteína o una proteína recombinante que originalmente contenía al menos una secuencia de señales de secreción cuando se traduce dentro de una célula de mamífero, y a través de, al menos en parte, clivaje enzimático de la secuencia de señales de secreción en la célula de mamífero, se libera al menos parcialmente hacia el espacio extracelular (p. ej., un medio de cultivo líquido).

55 La frase "perfusión de gradiente" se conoce en la técnica y se refiere al cambio incremental (p. ej., aumento o reducción) en el volumen de medio de cultivo retirado y añadido a un volumen de cultivo inicial en períodos incrementales (p. ej., un período de alrededor de 24 horas, un período de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 24 horas, o un período de más de 24 horas) durante el período de cultivo (p. ej., la velocidad de realimentación del medio de cultivo de forma diaria). La fracción de medios retirados y reemplazados cada día puede variar dependiendo

de las células particulares que se estén cultivando, la densidad de siembra inicial, y la densidad celular en un momento particular.

"Tasa de productividad específica" o "SPR", por sus siglas en inglés, según su uso en la presente memoria, se refiere a la masa o actividad enzimática de una proteína recombinante producida por célula de mamífero por día. La SPR para un anticuerpo recombinante se mide, en general, como masa/célula/día. La SPR para una enzima recombinante se mide, en general, como unidades/célula/día o (unidades/masa)/célula/día.

"Tasa de productividad de volumen" o "VPR", por sus siglas en inglés, según su uso en la presente memoria, se refiere a la masa o actividad enzimática de proteína recombinante producida por volumen de cultivo (p. ej., por L de biorreactor, recipiente, o volumen de tubo) por día. La VPR para un anticuerpo recombinante se mide, en general, como masa/L/día. La VPR para una enzima recombinante se mide, en general, como unidades/L/día o masa/L/día.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente se les da por cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Los métodos y materiales se describen en la presente memoria para su uso en la presente invención; otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica pueden también usarse. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser restrictivos. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, secuencias, entradas de bases de datos y otras referencias descritas en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones, prevalecerá.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, así como a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que puede usarse para procesar un cultivo celular. El sistema que se muestra incluye una sola bomba 8 dispuesta en un primer conducto 6.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que incluye una sola bomba 8 dispuesta en un segundo conducto 7.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que incluye una sola bomba 8 dispuesta en un recipiente 2 (p. ej., un biorreactor) y proximal a un primer conducto 6.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que incluye dos unidades TFF 3 que incluyen, cada una, dos filtros de flujo cruzado 12, donde las dos unidades TFF 3 se conectan, de manera fluida, por un tercer conducto 14, y una sola bomba 8 se dispone en el tercer conducto 14.

La Figura 5 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que incluye una sola bomba 8 dispuesta en un segundo conducto 7, e incluye varios sensores de presión 14, y un flujómetro 15.

La Figura 6 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que incluye una bomba 8 dispuesta en el primer conducto 6 y una bomba 8 dispuesta en un segundo conducto 7.

La Figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo que incluye un recipiente 2 y un primer y segundo subsistemas 19.

La Figura 8 es un diagrama esquemático que muestra la primera dirección de flujo en un sistema a modo de ejemplo.

La Figura 9 es un diagrama que muestra el flujo de un cultivo celular durante un primer período en una primera dirección de flujo, una inversión de la primera dirección de flujo durante un período (t_{r1}), el flujo del cultivo celular durante un segundo período en una segunda dirección de flujo (t_2), la inversión de la segunda dirección de flujo durante un período (t_{r2}), y el flujo del cultivo celular durante un tercer período en la primera dirección de flujo (t_3). En el diagrama, F representa la velocidad de flujo del cultivo celular (L/minuto).

La Figura 10 es un gráfico de la densidad celular viable en un cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (GC2008 Set6 TFF V24; gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (GC2008 Set5 ATF™ V21; negro).

La Figura 11 es un gráfico del porcentaje de células viables en un cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

La Figura 12 es un gráfico de la capacitancia (pF) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

La Figura 13 es un gráfico del diámetro medio de células viables del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

5 La Figura 14 es un gráfico de la inmunoglobulina secretada (IgG) detectada en el cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

La Figura 15 es un gráfico de la productividad volumétrica (g/L/d) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

10 La Figura 16 es un gráfico de la productividad específica (pg/célula/día) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

La Figura 17 es un gráfico del coeficiente de tamizado porcentual del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

15 La Figura 18 es un gráfico del consumo de glucosa específico (ng/célula/día) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (GC2008 Set6 TFF V24) (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

La Figura 19 es un gráfico de la producción de lactato específica (ng/célula/día) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

20 La Figura 20 es un gráfico del consumo de glucosa aeróbico específico (cpmol/célula/hora) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

La Figura 21 es un gráfico del rendimiento de lactato a partir de glucosa (mol/mol) del cultivo celular procesado mediante el uso de los métodos provistos en la presente memoria (gris) o mediante el uso de la filtración ATF™ (Refine Technology) (negro).

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente memoria se proveen sistemas de filtración de circuito abierto que incluyen un recipiente, comprendido como un biorreactor en la presente descripción, una unidad TFF que tiene primera y segunda entradas, un primer conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la primera entrada de la unidad TFF, y un segundo conducto en comunicación fluida entre el recipiente y la segunda entrada de la unidad TFF, y al menos una bomba dispuesta dentro del sistema, en donde el accionamiento de la al menos una bomba hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente, a través del conducto de fluido, la unidad TFF, el segundo conducto y otra vez al recipiente. También se proveen métodos de procesamiento de un cultivo celular que incluyen utilizar un sistema de filtración de circuito abierto (p. ej., cualquiera de los sistemas de filtración de circuito abierto descritos en la presente memoria). Los sistemas y métodos descritos en la presente memoria proveen, por ejemplo, alta viabilidad celular y/o porcentaje de viabilidad celular durante el procesamiento del cultivo celular. Beneficios adicionales de los sistemas y métodos provistos en la presente memoria se describen más abajo.

Sistemas de Filtración de Circuito Abierto

La presente memoria descriptiva provee sistemas de filtración de circuito abierto a modo de ejemplo útiles para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria. Dichos sistemas se diseñan de modo que el accionamiento de al menos una bomba (en el sistema) hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente, a través del primer conducto, la unidad TFF, el segundo conducto, y otra vez al recipiente.

Sistemas de Bomba Única a Modo de Ejemplo

Un ejemplo no restrictivo de un sistema 1 se provee en la Figura 1. El sistema 1 incluye un recipiente 2, p. ej., un biorreactor, un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y una unidad TFF 3 que incluye una carcasa 11 y un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, una primera entrada 4 y una segunda entrada 5. El filtro tubular único de flujo cruzado 12 puede tener un tamaño de poro, p. ej., de alrededor de 0,2 µm. El primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4. El segundo conducto 7 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5. El conducto de fluido 6 y el conducto de fluido 7 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. La unidad TFF 3 puede incluir un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, como se muestra en la Figura 1, o dos o más filtros de flujo cruzado.

El sistema 1 en la Figura 1 también incluye una bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el primer conducto 6. Cuando se acciona, la bomba 8 hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, la unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de la unidad TFF 3 incluye una salida de filtrado

13. El sistema 1 también incluye un tanque de retención de filtrado 10 y un conducto de filtrado 9 en comunicación fluida entre la salida de filtrado 13 y el tanque de retención de filtrado 10. El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. El conducto de filtrado 9 puede ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona.
- 5 Otro sistema 1 a modo de ejemplo se muestra en la Figura 2, el cual es similar al que se muestra en la Figura 1, excepto al menos que la LTP se sitúa en una porción diferente del sistema. El sistema 1 incluye un recipiente 2, p. ej., un biorreactor, un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y una unidad TFF 3 que incluye una carcasa 11 y un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, una primera entrada 4 y una segunda entrada 5. El filtro único tubular de flujo cruzado 12 puede tener un tamaño de poro, p. ej., de alrededor de 0,2 µm. El primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4. El segundo conducto 7 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5. El conducto de fluido 6 y el conducto de fluido 7 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. La unidad TFF 3 puede incluir un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, como se muestra en la Figura 2, o puede incluir un conjunto de dos o más filtros de flujo cruzado.
- 10 El sistema 1 en la Figura 2 también incluye una bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el segundo conducto 7. Cuando se acciona, la bomba 8 hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, la unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de la unidad TFF 3 incluye una salida de filtrado 13. El sistema 1 también incluye un tanque de retención de filtrado 10 y un conducto de filtrado 9 en comunicación fluida entre la salida de filtrado 13 y el tanque de retención de filtrado 10. El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. El conducto de filtrado 9 puede ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona.
- 15 Un sistema 1 adicional a modo de ejemplo se muestra en la Figura 3. El sistema 1 incluye un recipiente 2, p. ej., un biorreactor, un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y una unidad TFF 3 que incluye una carcasa 11 y un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, una primera entrada 4 y una segunda entrada 5. El filtro único tubular de flujo cruzado 12 puede tener un tamaño de poro, p. ej., de alrededor de 0,2 µm. El primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4. El segundo conducto 7 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5. El conducto de fluido 6 y el conducto de fluido 7 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. La unidad TFF 3 puede incluir un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, como se muestra en la Figura 3, o puede contener un conjunto de dos o más filtros de flujo cruzado.
- 20 El sistema 1 en la Figura 3 también incluye una sola bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el recipiente 2, p. ej., biorreactor, y proximal al primer conducto 6. Cuando se acciona, la única bomba 8 hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, la unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de la unidad TFF 3 incluye una salida de filtrado 13. El sistema 1 también incluye un tanque de retención de filtrado 10 y un conducto de filtrado 9 en comunicación fluida entre la salida de filtrado 13 y el tanque de retención de filtrado 10. El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. El conducto de filtrado 9 puede ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona.
- 25 El sistema 1 a modo de ejemplo se muestra en la Figura 4, el cual es similar a aquellos ilustrados en las Figuras 1-3, excepto al menos que el sistema incluye múltiples unidades TFF. El sistema 1 incluye un recipiente 2, p. ej., un biorreactor, un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y dos unidades TFF 3 que incluyen, cada una: una carcasa 11, una primera entrada 4, una segunda entrada 5 y dos filtros de flujo cruzado 12. Las dos unidades TFF 3 se conectan, de manera fluida, por un tercer conducto 14. Cada uno de los filtros de flujo cruzado 12 puede tener un tamaño de poro, p. ej., de alrededor de 0,2 µm. El primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4 de una de las dos unidades TFF 3, y el segundo conducto 7 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5 de la otra de las dos unidades TFF 3. El tercer conducto está en comunicación fluida entre la segunda entrada 5 de una unidad TFF 3 y la primera entrada 4 de la otra unidad TFF 3, como se muestra, p. ej., en la Figura 4. Los conductos de fluido 6, 7 y 14 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. Como pueden apreciar las personas con experiencia en la técnica, las unidades TFF 3 pueden contener, de manera alternativa, un solo filtro de flujo cruzado, p. ej., un filtro de flujo cruzado tubular.
- 30 El sistema 1 en la Figura 4 también incluye una sola bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el tercer conducto 14. Cuando se acciona, la única bomba 8 hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, una unidad TFF 3, el tercer conducto 14, la otra unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de cada una de las dos unidades TFF 3 incluye una salida de filtrado 13. El sistema 1 también incluye dos tanques de retención de filtrado 10 y dos conductos de filtrado 9. Cada tanque de retención de filtrado 10 único se conecta, de manera fluida, a una salida de filtrado 13 en una unidad TFF 3 por un conducto de filtrado 9. El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. Los conductos de filtrado 9 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona.
- 35 Un sistema 1 adicional a modo de ejemplo se muestra en la Figura 5. El sistema 1 incluye un recipiente 2, p. ej., un biorreactor, un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y una unidad TFF 3 que incluye una carcasa 11 y un solo

5 filtro tubular de flujo cruzado 12, una primera entrada 4 y una segunda entrada 5. El filtro de flujo cruzado 12 puede tener, p. ej., un tamaño de poro de alrededor de 0,2 µm, un número de fibras de alrededor de 830 fibras/filtro, incluir fibras con un ID de 1 mm y una longitud de 30 cm, y tener un área de filtración de 0,77 m². El primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4. El segundo conducto 7 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5. Los conductos de fluido 6 y 7 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. Los conductos de fluido 6 y 7 pueden ser tubos de transferencia de 0,5 pulgadas de diámetro interno (ID, por sus siglas en inglés).

10 El sistema 1 en la Figura 5 también incluye una única bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el segundo conducto 7. La bomba 8 puede ser una bomba peristáltica Watson-Marlow 620 Du equipada con tubería de doble canal GORE Sta-Pure (16 mm ID, pared de 4 mm). Cuando se acciona, la única bomba 8 hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, la unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de la unidad TFF 3 incluye una salida de filtrado 13. El sistema 1 también incluye un tanque de retención de filtrado 10 y un conducto de filtrado 9 en comunicación fluida entre la salida de filtrado 13 y el tanque de retención de filtrado 10.

15 15 El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. El conducto de filtrado 9 puede ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. El sistema 1 también incluye sensores de presión 14 dispuestos en cada uno del primer conducto 6, el conducto de filtrado 9 y el segundo conducto 7. Los sensores de presión 14 pueden ser sensores de presión PendoTECH PressureMAT™. El sistema 1 también incluye un flujómetro 15 dispuesto en el segundo conducto 7. El flujómetro 15 puede ser un flujómetro EM-TEC BioProTT, no invasivo, en tiempo real.

20 20 El sistema 1 en la Figura 5 también incluye un conducto de puerto 16 y un puerto 17, donde el conducto de puerto 16 está en comunicación fluida entre el primer conducto 6 y el puerto 17. El sistema 1 también puede incluir una abrazadera 18 dispuesta en el conducto de puerto 16. El puerto 17 y el conducto de puerto 16 pueden usarse para añadir fluidos al sistema 1 a través del primer conducto 6.

25 ***Sistemas de Múltiples Bombas a Modo de Ejemplo***

30 Un ejemplo no restrictivo de un sistema 1 que incluye dos bombas 8 se muestra en la Figura 6. El sistema 1 incluye un recipiente 2, p. ej., un biorreactor, un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y una unidad TFF 3 que incluye una carcasa 11 y un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, una primera entrada 4 y una segunda entrada 5. El filtro único tubular de flujo cruzado 12 puede tener un tamaño de poro de alrededor de 0,2 µm. El primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4. El segundo conducto 7 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5. Los conductos de fluido 6 y 7 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. La unidad TFF 3 puede incluir un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, como se muestra en la Figura 6, o puede incluir un conjunto de dos o más filtros de flujo cruzado.

35 35 El sistema 1 en la Figura 6 también incluye una bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el primer conducto 6, y una bomba 8, una bomba de baja turbulencia (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el segundo conducto 7. Cuando se acciona, la bomba 8 dispuesta en el primer conducto 6 hace fluir el fluido en una primera dirección a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, la unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. Cuando se acciona, la bomba 8 dispuesta en el segundo conducto 7 hace fluir el fluido en una segunda dirección (opuesta a la primera dirección) a través del sistema desde el recipiente 2, a través del segundo conducto 7, la unidad TFF 3, el primer conducto 6, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de la unidad TFF 3 incluye una salida de filtrado 13. El sistema 1 también incluye un tanque de retención de filtrado 10 y un conducto de filtrado 9 en comunicación fluida entre la salida de filtrado 13 y el tanque de retención de filtrado 10. El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. El conducto de filtrado 9 puede ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona.

Sistemas a Modo de Ejemplo que incluyen Dos o Más Subsistemas

50 Las personas con experiencia en la técnica apreciarán que múltiples subsistemas pueden añadirse al sistema. Un sistema 1 a modo de ejemplo que incluye dos o más subsistemas 19 se muestra en la Figura 7. El sistema 1 incluye un recipiente 2; y un primer y segundo subsistemas 19, cada subsistema 19 incluyendo un primer conducto 6, un segundo conducto 7, y una unidad TFF 3 que incluye una carcasa 11 y un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, una primera entrada 4 y una segunda entrada 5, como se muestra en la Figura 7. Los filtros únicos tubulares de flujo cruzado 12 pueden tener un tamaño de poro de alrededor de 0,2 µm. En cada subsistema, el primer conducto 6 está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la primera entrada 4. El segundo conducto 7, en cada subsistema, está en comunicación fluida entre el recipiente 2 y la segunda entrada 5. Los conductos de fluido 6 y 7 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona. Las unidades TFF 3 pueden incluir un solo filtro tubular de flujo cruzado 12, respectivamente, como se muestra en la Figura 7, o pueden incluir, cada una, un conjunto de dos o más filtros de flujo cruzado. Los filtros únicos tubulares de flujo cruzado 12 pueden tener un tamaño de poro de alrededor de 0,2 µm.

Cada subsistema 19 en la Figura 7 también incluye una sola bomba 8, p. ej., una bomba de turbulencia baja (LTP) como, por ejemplo, una bomba peristáltica, que se dispone en el primer conducto 6. Cuando se acciona, la única bomba 8 en cada subsistema 19 hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el recipiente 2, a través del primer conducto 6, la unidad TFF 3, el segundo conducto 7, y otra vez al recipiente 2. La carcasa 11 de cada una de las dos unidades TFF 3 incluye una salida de filtrado 13. Cada subsistema 19 también incluye un tanque de retención de filtrado 10 y un conducto de filtrado 9 en comunicación fluida entre la unidad TFF 3 y el tanque de retención de filtrado 10. El tanque de retención de filtrado 10 puede ser, p. ej., un tanque de retención refrigerado. Los conductos de filtrado 9 pueden ser cualquier tipo de tubería biocompatible, p. ej., tubería de silicona.

Estructuras y Características Adicionales del Sistema a Modo de Ejemplo

10 Más abajo se describen estructuras a modo de ejemplo no restrictivo que pueden usarse para el recipiente, los conductos, la(s) unidad(es) TFF, la(s) bomba(s), el(los) tanque(s) de retención de filtrado, flujómetro(s), sensor(es) de presión, abrazadera(s), puerto(s), y sistema(s) de fabricación biológico(s).

Recipientes

15 Un recipiente puede ser un biorreactor. El biorreactor puede tener un volumen de, p. ej., entre alrededor de 1 L a alrededor de 10.000 L (p. ej., de entre alrededor de 1 L a alrededor de 50 L, de entre alrededor de 50 L a alrededor de 500 L, de entre alrededor de 500 L a alrededor de 1000 L, de entre 500 L a alrededor de 5000 L, de entre alrededor de 500 L a alrededor de 10.000 L, de entre alrededor de 5000 L a alrededor de 10.000 L, de entre alrededor de 1 L y alrededor de 10.000 L, de entre alrededor de 1 L y alrededor de 8.000 L, de entre alrededor de 1 L y alrededor de 6.000 L, de entre alrededor de 1 L y alrededor de 5.000 L, de entre alrededor de 100 L y alrededor de 5.000 L, de entre alrededor de 10 L y alrededor de 100 L, de entre alrededor de 10 L y alrededor de 4.000 L, de entre alrededor de 10 L y alrededor de 3.000 L, de entre alrededor de 10 L y alrededor de 2.000 L, o de entre alrededor de 10 L y alrededor de 1.000 L). Cualquiera de los biorreactores descritos en la presente memoria puede ser un biorreactor de perfusión. Biorreactores a modo de ejemplo pueden adquirirse de una cantidad de diferentes proveedores comerciales (p. ej., Xcellerex (Marlborough, MA) y Holland Applied Technologies (Burr Ridge, IL)).

20 25 De manera alternativa o adicional, un recipiente puede ser un tanque de retención. Por ejemplo, dicho tanque de retención refrigerado puede contener cultivo celular que contiene una proteína recombinante durante un período de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de una semana (p. ej., de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 6 días, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 5 días, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 4 días, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 3 días, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 2 días, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 36 horas, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 24 horas, de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 12 horas). El cultivo celular en el tanque de retención puede mantenerse a una temperatura de entre alrededor de 15°C y alrededor de 37°C, de entre alrededor de 20°C y alrededor de 37°C, de entre alrededor de 25°C y alrededor de 37°C, de entre alrededor de 30°C y alrededor de 37°C, o de entre alrededor de 20°C y alrededor de 30°C.

30 35 **Conductos**

40 Un conducto descrito en la presente memoria puede ser tubería simple, p. ej., tubería biocompatible. Ejemplos no restrictivos de tubería útil incluyen caucho de silicona, poliuretano, polidioxanona (PDO), polihidroxialcanoato, polihidroxibutirato, poliglicerol sebacato), poliglicolido, poliláctido, policaprolactona, o polianhídrido, o copolímeros o derivados que incluyen estos y/u otros polímeros. De manera alternativa o adicional, cualquiera de los conductos descritos en la presente memoria puede incluir cloruro de polivinilo. Cualquiera de los conductos puede tener, por ejemplo, un diámetro interior (ID) de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 50 mm (p. ej., de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 40 mm, de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 35 mm, o de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 30 mm, de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 20 mm). Un conducto puede ser tubería de transferencia soldable. Ejemplos adicionales de conductos y propiedades de conductos que pueden usarse en los presentes dispositivos y métodos se conocen por las personas con experiencia en la técnica.

Unidades TFF y Filtros de Flujo Cruzado

45 Las unidades TFF usadas en cualquiera de los sistemas o subsistemas, o métodos descritos en la presente memoria pueden incluir uno o más filtros de flujo cruzado. Por ejemplo, una unidad TFF descrita en la presente memoria puede incluir un solo filtro de flujo cruzado (p. ej., un filtro de flujo cruzado tubular). En otros ejemplos, una unidad TFF puede incluir dos o más (p. ej., tres, cuatro, cinco o seis) filtros de flujo cruzado (p. ej., filtros de flujo cruzado tubulares). Los dos o más filtros de flujo cruzado en la unidad TFF pueden ser idénticos o pueden ser diferentes (p. ej., diferentes en número, tipo, forma, área de superficie o tamaño de poro). En un ejemplo específico, la unidad TFF puede incluir dos filtros de flujo cruzado tubulares. Los dos o más filtros de flujo cruzado presentes en una unidad TFF pueden ser de forma curva rectangular.

50 55 El(los) filtro(s) de flujo cruzado puede(n) tener un tamaño de poro promedio de entre alrededor de 0,1 µm a alrededor de 0,45 µm (p. ej., de entre alrededor de 0,15 µm a alrededor de 0,40 µm, de entre alrededor de 0,15 µm a alrededor de 0,35 µm, de entre alrededor de 0,15 µm a alrededor de 0,30 µm, de entre alrededor de 0,15 µm a alrededor de 0,25

μm), o de alrededor de 0,20 μm. El(los) filtro(s) de flujo cruzado puede(n) ser un filtro de espectro compuesto de polietersulfona (PES).

El(los) filtro(s) de flujo cruzado puede(n) tener un área de superficie (área de filtración) de entre alrededor de 0,1 m² a alrededor de 5 m² (p. ej., de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 4,5 m², de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 4,0 m², de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 3,5 m², de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 3,0 m², de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 2,5 m², de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 2,0 m², de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 1,5 m², o de entre alrededor de 0,5 m² a alrededor de 1,0 m²). Los filtros de flujo cruzado pueden tener un número total de fibra por filtro de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 2500 fibras/filtro (p. ej., de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 2400 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 2300 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 2200 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 2100 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 2000 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1900 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1800 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1700 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1600 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1500 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1400 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1300 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1200 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1100 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 1000 fibras/filtro, de entre alrededor de 500 fibras/filtro a alrededor de 900 fibras/filtro, de entre alrededor de 600 fibras/filtro a alrededor de 900 fibras/filtro, de entre alrededor de 700 fibras/filtro a alrededor de 900 fibras/filtro, o de entre alrededor de 800 fibras/filtro a alrededor de 900 fibras/filtro). En algunos ejemplos, las fibras dentro del(de los) filtro(s) de flujo cruzado tienen un diámetro interno de entre alrededor de 0,05 mm a alrededor de 10 mm (p. ej., de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 9 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 8 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 7 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 6 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 5 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 4 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 3 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 2,5 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 2,0 mm, de entre alrededor de 0,1 mm a alrededor de 1,5 mm, de entre alrededor de 0,5 mm a alrededor de 1,5 mm, o de entre alrededor de 0,75 mm a alrededor de 1,25 mm). Las fibras presentes en el(los) filtro(s) de flujo cruzado pueden tener una longitud de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 200 cm (p. ej., de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 190 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 180 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 170 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 160 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 150 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 140 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 130 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 120 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 110 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 100 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 90 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 80 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 70 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 60 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 55 cm, de entre alrededor de 0,2 cm y alrededor de 50 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 45 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 40 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 35 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 35 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 30 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 25 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 20 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 15 cm, de entre alrededor de 1 cm y alrededor de 10 cm, de entre alrededor de 0,1 cm y alrededor de 5 cm, de entre alrededor de 20 cm y alrededor de 40 cm, o de entre alrededor de 25 cm y alrededor de 35 cm). El(los) filtro(s) de flujo cruzado puede(n) tener cualquier forma, de modo que la mayor parte del área de superficie del(de los) filtro(s) se posiciona paralela al flujo del fluido (p. ej., cultivo celular) en el sistema. Por ejemplo, el(los) filtro(s) de flujo cruzado puede(n) tener una forma tubular o una forma curva rectangular o de donut. Un ejemplo de un filtro de flujo cruzado que puede usarse en sistemas descritos en la presente memoria es el filtro ATF4 (Refine Technology). Filtros de flujo cruzado adicionales se describen en la presente memoria y se conocen en la técnica.

Como pueden apreciar las personas con experiencia en la técnica, el(los) filtro(s) de flujo cruzado en la unidad TFF puede(n) alojarse en una carcasa (p. ej., carcasa de plástico duro o metal). Una carcasa puede ser de cualquier forma, cilíndrica o rectangular, y diseñarse de modo que pueda contener uno o más filtros de flujo cruzado. La carcasa puede contener una superficie que permite la inserción o eliminación de uno o más filtros de flujo cruzado de la carcasa.

Algunos sistemas incluyen dos o más unidades TFF dispuestas en serie o en paralelo. Por ejemplo, en sistemas donde dos o más unidades TFF se disponen en serie, un conducto de fluido puede usarse para conectar, de forma fluida, dos unidades TFF vecinas (p. ej., cualquiera de las unidades TFF a modo de ejemplo descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica). Una disposición a modo de ejemplo de dos unidades TFF en un sistema se muestra en la Figura 4. Las dos o más unidades TFF dispuestas en serie pueden diseñarse de cualquier manera siempre que el accionamiento de la al menos una bomba en el sistema resulte en el flujo reversible del cultivo celular desde el recipiente, p. ej., el biorreactor, a través del primer conducto, las dos o más unidades TFF, uno o más conductos posicionados entre la(s) unidad(es) TFF vecina(s), el segundo conducto, y otra vez al recipiente, p. ej., el biorreactor. Las dos o más unidades TFF pueden ser idénticas (p. ej., igual número y tipo de filtros de flujo cruzado) o diferentes (p. ej., número y tipo diferentes de filtros de flujo cruzado). En algunos ejemplos, las dos o más unidades TFF contienen, cada una, un solo filtro de flujo cruzado tubular. Cada unidad TFF puede conectarse, de manera fluida, a un conducto de filtrado que permite que el filtrado que abandona la unidad TFF fluya hacia un tanque de retención de filtrado (p. ej., cualquiera de los tanques de retención de filtrado descritos en la presente memoria). En algunas

realizaciones, las dos o más unidades TFF pueden disponerse en una sola carcasa (p. ej., cualquiera de los tipos de carcasa a modo de ejemplo descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica).

Bombas

Los sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir una o más bombas. En algunos ejemplos, la única o más bombas son bombas de turbulencia baja (LTP). Las LTP afectan a bombas que pueden mover un fluido (p. ej., un cultivo celular) en una sola dirección (p. ej., una primera o segunda dirección de flujo) o mover, de manera reversible, un fluido (p. ej., un cultivo celular) en dos direcciones (una primera y segunda direcciones de flujo) sin inducir una cantidad sustancial de tensión cortante y/o turbulencia de fluido en el fluido (p. ej., cultivo celular). Cuando una LTP se usa para hacer fluir un fluido (p. ej., un cultivo celular) en una primera y segundas direcciones de flujo alternas, la segunda dirección de flujo es aproximadamente opuesta a la primera dirección de flujo.

Un ejemplo de una bomba LTP es una bomba peristáltica. Una bomba peristáltica puede tener altura de bombeo con un volumen de entre alrededor de 20 mL a alrededor de 250 mL (p. ej., de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 80 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 60 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 50 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 40 mL, de entre alrededor de 20 mL y alrededor de 30 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 80 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 60 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 40 mL, de entre alrededor de 30 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 80 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 60 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 50 mL, de entre alrededor de 40 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 80 mL, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 75 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 80 mL, de entre alrededor de 60 mL y alrededor de 70 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 70 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 80 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 140 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 120 mL, de entre alrededor de 90 mL y alrededor de 100 mL, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 240 mL, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 220 mL, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 180 mL, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 160 mL, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 140 mL, o de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 120 mL). La bomba peristáltica puede tener tubería con un diámetro interno de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 400 mm (p. ej., de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 380 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 360 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 340 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 320 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 300 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 280 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 260 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 240 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 220 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 200 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 180 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 160 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 140 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 120 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 100 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 80 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 60 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 55 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 50 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 5 mm y alrededor de

45 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 40 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 35 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 30 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 25 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 20 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 15 mm, de entre alrededor de 5 mm y alrededor de 10 mm, de entre alrededor de 1 mm y alrededor de 10 mm, de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 5 mm, de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 35 mm, de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 25 mm, de entre alrededor de 10 mm y alrededor de 20 mm, de entre alrededor de 20 mm y alrededor de 60 mm, de entre alrededor de 20 mm y alrededor de 50 mm, o de entre alrededor de 30 mm y alrededor de 50 mm). La tubería dentro de una bomba peristáltica puede tener un diámetro de pared de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 30 mm (p. ej., de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 25 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 20 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 18 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 16 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 14 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 12 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 10 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 8 mm, de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 6 mm, o de entre alrededor de 1 mm a alrededor de 5 mm). Ejemplos de bombas peristálticas que pueden usarse en los presentes sistemas y métodos son las bombas Watson Marlow 620 y Watson Marlow 800. Cualquiera de las bombas peristálticas descritas en la presente memoria puede tener un canal doble y/o contener tubería GORE Sta-Pure (p. ej., tubería con un diámetro interno de 16 mm y una pared de 4 mm).

Ejemplos adicionales de bombas LTP se describen en las Patentes de Estados Unidos No. 4,037,984; 5,033,943; y 5,458,459; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2009/0199904, y solicitud de patente internacional número WO 06/021873. Otros ejemplos de bombas LTP incluyen bombas de desplazamiento positivo giratorias, bombas de lóbulos, bombas de engranajes internos, y bombas de cavidad progresiva. Las personas con experiencia en la técnica apreciarán que otros tipos de LTP se encuentran comercialmente disponibles y pueden usarse en cualquiera de los sistemas y métodos descritos en la presente memoria.

En algunos ejemplos, la al menos una bomba se dispone en el primer o segundo conducto, o en ambos. En otros ejemplos, la al menos una bomba se dispone en el recipiente y proximal al primer o segundo conducto de fluido. En sistemas que incluyen dos o más unidades TFF, al menos una bomba puede disponerse en un conducto colocado entre dos unidades TFF vecinas (p. ej., conducto 14 que se muestra en la Figura 4). La al menos una bomba puede disponerse en cualquier parte en los sistemas provistos en la presente memoria siempre que el accionamiento de la al menos una bomba resulte en que el fluido fluya de manera reversible a través del sistema desde el recipiente, a través del primer conducto, la unidad TFF, el segundo conducto, y otra vez al recipiente, o en sistemas que contienen dos o más unidades TFF, el fluido fluya de manera reversible a través del sistema desde el recipiente, a través del primer conducto, las dos o más unidades TFF, el único o más conductos entre unidades TFF vecinas, el segundo conducto y otra vez al recipiente.

Tanque de Retención de Filtrado

Un tanque de retención de filtrado puede, de manera opcional, incluirse en el sistema, p. ej., para almacenar el filtrado. Por ejemplo, el filtrado puede almacenarse durante un período de entre alrededor de 1 hora y alrededor de una semana (p. ej., de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 6 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 5 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 4 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 3 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 2 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 36 horas, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 24 horas, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 20 horas, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 16 horas, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 12 horas, o de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 6 horas). El tanque de retención de filtrado puede tener un volumen interno de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 50 L (p. ej., de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 45 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 40 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 35 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 30 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 25 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 20 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 18 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 16 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 14 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 12 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 10 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 9 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 8 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 7 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 6 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 5 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 4,5 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 4,0 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 3,5 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 3,0 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 2,5 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 2,0 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 1,5 L, de entre alrededor de 50 mL y alrededor de 1,0 L, de entre alrededor de 100 mL y alrededor de 1,0 L, o de entre alrededor de 500 mL y alrededor de 1,0 L). La superficie interior del tanque de retención de filtrado puede contener un material biocompatible (p. ej., cualquier material biocompatible conocido en la técnica). El tanque de retención de filtrado puede ser un tanque de retención refrigerado que puede almacenar el filtrado a una temperatura de entre alrededor de 10°C y alrededor de 35°C (p. ej., de entre alrededor de 10°C y alrededor de 30°C, de entre alrededor de 10°C y alrededor de 25°C, de entre alrededor de 10°C y alrededor de 20°C, de entre alrededor de 10°C y alrededor de 15°C, o de entre alrededor de 15°C y alrededor de 25°C). Como una persona con experiencia en la técnica puede apreciar, un número de tanques de retención diferentes comercialmente disponibles puede usarse como un tanque de retención de filtrado en los sistemas y métodos descritos en la presente memoria.

Flujómetros

Algunos ejemplos de los sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco) flujómetros. Por ejemplo, el único o más flujómetros pueden disponerse en uno o más de cualquiera de los conductos en el sistema (p. ej., el primer conducto, el segundo conducto, el único o más conductos entre unidades

- 5 TFF vecinas y/o el conducto de filtrado). Por ejemplo, un flujómetro puede colocarse entre dos unidades TFF vecinas. En algunos ejemplos, el(es) flujómetro(s) no es(son) invasivo(s). Las personas con experiencia en la técnica comprenderán la amplia variedad de flujómetros comercialmente disponibles que puede usarse en los presentes sistemas y métodos. Por ejemplo, un flujómetro EM-TEC BioProTT no invasivo, en tiempo real, un flujómetro ultrasónico PT878 (Rshydro), y un flujómetro no invasivo ultrasónico Sono-Trak (EMCO) son flujómetros

10 comercialmente disponibles que pueden usarse en los presentes sistemas y métodos.

Sensores de Presión

Los sistemas descritos en la presente memoria pueden incluir uno o más sensores de presión. Por ejemplo, el único o más sensores de presión pueden disponerse en cualquiera de los conductos en el sistema (p. ej., el primer conducto, el segundo conducto, el único o más conductos entre unidades TFF vecinas y/o el conducto de filtrado). Por ejemplo,

- 15 un sensor de presión puede colocarse entre dos unidades TFF vecinas en un sistema. Las personas con experiencia en la técnica comprenderán la amplia variedad de sensores de presión comercialmente disponibles que puede usarse en los presentes sistemas y métodos. Un ejemplo no restrictivo de sensor de presión que puede usarse en los sistemas y métodos descritos en la presente memoria es un sensor de presión PendoTECH PressureMAT.

Abrazaderas/Puertos

20 Cualquier de los sistemas descritos en la presente memoria puede, de manera opcional, incluir un conducto de puerto entre el primer o segundo conducto y un puerto que conecta, de manera fluida, el primer o segundo conducto, respectivamente, al puerto. El puerto puede usarse para entregar o retirar un fluido (p. ej., cultivo celular o solución de lavado) desde el sistema (a través del primer o segundo conducto, respectivamente). Una abrazadera puede

- 25 disponerse en el conducto de puerto. Una amplia variedad de abrazaderas adecuadas es conocida en la técnica (p. ej., una abrazadera ajustable). El conducto de puerto puede tener cualquier combinación de las características descritas más arriba para los conductos. El puerto puede ser cualquier tipo de puerto comúnmente conocido en la técnica. Por ejemplo, un puerto puede ser un puerto de inyección o puede tener un roscado acanalado.

Sistemas de Fabricación Biológicos

30 Cualquier de los dispositivos descritos en la presente memoria puede incluir un sistema de fabricación biológico que incluye al menos un (p. ej., dos, tres o cuatro) sistema de cromatografía multicolumna (MCCS) que tiene una entrada y una salida y un conducto de filtrado entre la unidad TFF o el tanque de retención de filtrado, donde el dispositivo se configura de modo que el filtrado pasa hacia la entrada del sistema de fabricación biológico, a través del al menos un MCCS, y abandona el dispositivo a través de la salida del sistema de fabricación biológico. Un MCCS puede incluir

- 35 dos o más columnas de cromatografía, dos o más membranas cromatográficas, o una combinación de al menos una columna de cromatografía y al menos una membrana cromatográfica. En ejemplos no restrictivos, un MCCS puede incluir cuatro columnas cromatográficas, tres columnas cromatográficas y una membrana cromatográfica, tres columnas cromatográficas, dos columnas cromatográficas, dos membranas cromatográficas, y dos columnas cromatográficas y una membrana cromatográfica. Ejemplos adicionales de combinaciones de columnas de

40 cromatografía y/o membranas cromatográficas pueden concebirse para su uso en un MCCS por una persona con experiencia en la técnica sin limitación. Las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas individuales presentes en un MCCS pueden ser idénticas (p. ej., tienen la misma forma, volumen, resina, mecanismo de captura y operación de unidad), o pueden ser diferentes (p. ej., tienen uno o más de una forma, volumen, resina, mecanismo de captura y operación de unidad diferentes). La(s) columna(s) de cromatografía y/o membrana(s) cromatográfica(s)

- 45 individual(es) presentes en un MCCS pueden llevar a cabo la misma operación de unidad (p. ej., la operación de unidad de captura, purificación, pulido, inactivación de virus, ajuste de la concentración iónica y/o pH de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, o filtrado) o diferentes operaciones de unidad (p. ej., diferentes operaciones de unidad seleccionadas de, p. ej., el grupo de captura, purificación, pulido, inactivación de virus, ajuste de la concentración iónica y/o pH de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, y filtrado).

50 Uno o más (p. ej., tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, diecisésis,

55 diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, o veinticuatro) tipos diferentes de tampón pueden emplearse durante el uso del único o más MCCS en cualquiera de los dispositivos de fabricación biológicos descritos en la presente memoria. Según se conoce en la técnica, el único o más tipos de tampón usados en el único o más MCCS utilizados en los sistemas de fabricación biológicos descritos en la presente memoria dependerán de la resina presente en la(s) columna(s) de cromatografía y/o la(s) membrana(s) cromatográfica(s) del único o más MCCS

(p. ej., el primer y segundo MCCS), la proteína terapéutica recombinante, y operación de unidad (p. ej., cualquiera de las operaciones de unidad a modo de ejemplo descritas en la presente memoria) llevada a cabo por la(s) columna(s) de cromatografía específica(s) y/o membranas de cromatografía del único o más MCCS. El volumen y tipo de tampón empleado durante el uso del único o más MCCS en cualquiera de los dispositivos de procesamiento biológicos descritos en la presente memoria pueden también determinarse por una persona con experiencia en la técnica. Por

- ejemplo, el volumen y tipo(s) de tampón empleado durante el uso del único o más MCCS en cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria pueden elegirse con el fin de optimizar uno o más de los siguientes en la proteína recombinante aislada resultante (p. ej., producto de fármaco): el rendimiento general de la proteína terapéutica recombinante, la actividad de la proteína terapéutica recombinante, el nivel de pureza de la proteína terapéutica recombinante, y la eliminación de contaminantes biológicos de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante (p. ej., ausencia de virus activos, micobacterias, levadura, bacterias o células de mamífero).
- El único o más MCCS pueden ser un sistema de cromatografía periódica a contracorriente (PCCS, por sus siglas en inglés). Un PCCS puede, p. ej., incluir dos o más columnas de cromatografía (p. ej., tres columnas o cuatro columnas) que se intercambian con el fin de permitir la elución continua de la proteína terapéutica recombinante de las dos o más columnas de cromatografía. Un PCCS puede incluir dos o más columnas de cromatografía, dos o más membranas cromatográficas, o al menos una columna cromatográfica y al menos una membrana cromatográfica. Una operación de columna consiste, en general, en las etapas de carga, lavado, elución y regeneración. En PCCS, múltiples columnas se usan para ejecutar las mismas etapas de forma discreta y continua de manera cíclica. Dado que las columnas se operan en serie, el flujo a través de y el lavado de una columna se captura por otra columna. Dicha característica única de PCCS permite la carga de la resina cerca de su capacidad de unión estática en lugar de la capacidad de unión dinámica, como es típico durante la cromatografía en modo de lote. Como resultado del ciclo continuo y la elución, el fluido que entra en un PCCS se procesa de manera continua, y la proteína terapéutica recombinante que contiene eluato se produce continuamente.
- La única o más operaciones de unidad que pueden llevarse a cabo por el al menos un MCCS en los sistemas de fabricación biológicos incluyen, por ejemplo, capturar la proteína terapéutica recombinante, inactivar virus presentes en un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, purificar la proteína terapéutica recombinante, pulir la proteína terapéutica recombinante, contener un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante (p. ej., mediante el uso de un tanque de separación), filtrar o eliminar material particulado de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, y ajustar la concentración iónica y/o pH de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante.
- La operación de unidad de captura puede llevarse a cabo usando uno o más MCCS que incluye(n) al menos una columna de cromatografía y/o resina de cromatografía, p. ej., que utiliza un mecanismo de captura. Ejemplos no restrictivos de mecanismos de captura incluyen un mecanismo de captura de unión a la proteína A, un mecanismo de captura de unión al fragmento de anticuerpo o al anticuerpo, un mecanismo de captura de unión al sustrato, un mecanismo de captura de unión al aptámero, un mecanismo de captura de unión a etiquetas (p. ej., mecanismo de captura basado en etiquetas de poli-His), y un mecanismo de captura de unión al cofactor. La captura puede también llevarse a cabo usando una resina que puede usarse para llevar a cabo la cromatografía de intercambio de cationes o intercambio de aniones, o cromatografía de tamiz molecular. Ejemplos de resinas que pueden usarse para capturar una proteína terapéutica recombinante se conocen en la técnica.
- La operación de unidad de inactivar virus presentes en un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante puede llevarse a cabo usando uno o más MCCS que incluye(n), p. ej., una columna de cromatografía, una membrana de cromatografía, o un tanque de retención que puede incubar un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante a un pH de entre alrededor de 3,0 a 5,0 (p. ej., de entre alrededor de 3,5 a alrededor de 4,5, de entre alrededor de 3,5 a alrededor de 4,25, de entre alrededor de 3,5 a alrededor de 4,0, de entre alrededor de 3,5 a alrededor de 3,8, o de alrededor de 3,75) durante un período de al menos 30 minutos (p. ej., un período de entre alrededor de 30 minutos a 1,5 horas, un período de entre alrededor de 30 minutos a 1,25 horas, un período de entre alrededor de 0,75 horas a 1,25 horas, o un período de alrededor de 1 hora).
- La operación de unidad de purificación de una proteína recombinante puede llevarse a cabo usando uno o más MCCS que incluye(n), p. ej., una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que contiene una resina, p. ej., que utiliza un sistema de captura. Ejemplos no restrictivos de mecanismos de captura incluyen un mecanismo de captura de unión a la proteína A, un mecanismo de captura de unión al fragmento de anticuerpo o al anticuerpo, un mecanismo de captura de unión al sustrato, un mecanismo de captura de unión al aptámero, un mecanismo de captura de unión a etiquetas (p. ej., mecanismo de captura basado en etiquetas de poli-His), y un mecanismo de captura de unión al cofactor. La purificación puede también llevarse a cabo usando una resina que puede usarse para llevar a cabo la cromatografía de intercambio de cationes o intercambio de aniones, o cromatografía de tamiz molecular. Ejemplos de resinas que pueden usarse para purificar una proteína terapéutica recombinante se conocen en la técnica.
- La operación de unidad de pulido de una proteína recombinante puede llevarse a cabo usando uno o más MCCS que incluye(n), p. ej., una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que contiene una resina, p. ej., que puede usarse para llevar a cabo la cromatografía de intercambio de cationes, intercambio de aniones, o de tamiz molecular. Ejemplos de resinas que pueden usarse para pulir una proteína terapéutica recombinante se conocen en la técnica.
- La operación de unidad de contener un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante puede llevarse a cabo usando un MCCS que incluye al menos un recipiente (p. ej., un tanque de separación) o un máximo de 1, 2, 3, 4 o 5 recipiente(s) (p. ej., tanque(s) de separación) en el único o más MCCS en el sistema de fabricación biológico. Por ejemplo, el(los) recipiente(s) (p. ej., tanque(s) de separación) que puede(n) usarse para lograr dicha operación de unidad puede(n) tener, cada uno, un volumen de entre alrededor de 1 mL a alrededor de 1 L (p. ej., de entre alrededor

de 1 mL a alrededor de 800 mL, de entre alrededor de 1 mL a alrededor de 600 mL, de entre alrededor de 1 mL a alrededor de 500 mL, de entre alrededor de 1 mL a alrededor de 400 mL, de entre alrededor de 1 mL a alrededor de 350 mL, de entre alrededor de 1 mL a alrededor de 300 mL, de entre alrededor de 10 mL y alrededor de 250 mL, de entre alrededor de 10 mL y alrededor de 200 mL, de entre alrededor de 10 mL y alrededor de 150 mL, y de entre alrededor de 10 mL a alrededor de 100 mL). El(los) recipiente(s) (p. ej., tanque(s) de separación) usado(s) en los sistemas de fabricación biológico descritos en la presente memoria puede(n) tener una capacidad que es, p. ej., de entre 1 mL y alrededor de 300 mL, inclusive, p. ej., de entre 1 mL y alrededor de 280 mL, alrededor de 260 mL, alrededor de 240 mL, alrededor de 220 mL, alrededor de 200 mL, alrededor de 180 mL, alrededor de 160 mL, alrededor de 140 mL, alrededor de 120 mL, alrededor de 100 mL, alrededor de 80 mL, alrededor de 60 mL, alrededor de 40 mL, alrededor de 20 mL, o alrededor de 10 mL, inclusive. El(los) recipiente(s) (p. ej., tanque(s) de separación) en el sistema de fabricación biológico puede(n) contener, cada uno, el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante durante al menos 10 minutos (p. ej., al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 4 horas, o al menos 6 horas). En otros ejemplos, el(los) recipiente(s) (p. ej., tanque(s) de separación) en el sistema de fabricación biológico solo contiene(n) una proteína terapéutica durante un tiempo total de, p. ej., entre 15 20 alrededor de 5 minutos y menos de 6 horas, inclusive, p. ej., de entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 5 horas, alrededor de 4 horas, alrededor de 3 horas, alrededor de 2 horas, alrededor de 1 hora, o alrededor de 30 minutos, inclusive. El(los) recipiente(s) (p. ej., tanque(s) de separación) en el sistema de fabricación biológico puede(n) usarse tanto para contener como para refrigerar (p. ej., a una temperatura de menos de 25°C, de menos de 15°C, o de menos de 10°C) el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante. El recipiente puede tener cualquier forma, incluido un cilindro circular, un cilindro ovalado, o una bolsa sellada y no permeable aproximadamente rectangular.

Las operaciones de unidad de filtrado de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante pueden llevarse a cabo utilizando un MCCS que incluye, p. ej., un filtro, o una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que contiene una resina de tamiz molecular. Como se conoce en la técnica, una amplia variedad de filtros de submicrónicos (p. ej., un filtro con un tamaño de poro de menos de 1 µm, de menos de 0,5 µm, de menos de 0,3 µm, de alrededor de 0,2 µm, de menos de 0,2 µm, de menos de 100 nm, de menos de 80 nm, de menos de 60 nm, de menos de 40 nm, de menos de 20 nm, o de menos de 10 nm) están disponibles en la técnica, los cuales pueden eliminar cualquier material precipitado y/o células (p. ej., precipitado, proteína desplegada; proteínas de la célula huésped no deseadas precipitadas; lípidos precipitados; bacterias; células de levadura; células de hongos; y/o micobacterias). Se conoce que los filtros que tienen un tamaño de poro de alrededor de 0,2 µm o de menos de 0,2 µm eliminan, de manera efectiva, bacterias del fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante. Según se conoce en la técnica, una columna de cromatografía o una membrana cromatográfica que contiene una resina de tamiz molecular puede también usarse en un MCCS para llevar a cabo la operación de unidad de filtrar un fluido que contiene una proteína terapéutica recombinante.

Las operaciones de unidad de ajustar la concentración iónica y/o pH de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante pueden llevarse a cabo usando un MCCS que incluye y utiliza un recipiente de ajuste de tampón (p. ej., un recipiente de ajuste de tampón en línea) que añade una nueva solución de tampón a un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante (p. ej., entre columnas dentro de un solo MCCS, o después de la última columna en un penúltimo MCCS y antes de que el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante se alimente a la primera columna del siguiente MCCS (p. ej., el segundo MCCS). Como puede apreciarse en la técnica, el recipiente de ajuste de tampón en línea puede ser de cualquier tamaño (p. ej., mayor que 100 mL) y puede contener cualquier solución tamponada (p. ej., una solución tamponada que tiene uno o más de: un pH aumentado o reducido en comparación con el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, una concentración iónica (p. ej., sal) aumentada o reducida en comparación con el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, y/o una concentración aumentada o reducida de un agente que compite con la proteína terapéutica recombinante para unirse a la resina presente en al menos una columna cromatográfica o al menos una membrana cromatográfica en un MCCS (p. ej., el primer o segundo MCCS)).

Un MCCS puede llevar a cabo dos o más operaciones de unidad. Por ejemplo, un MCCS puede llevar a cabo al menos las siguientes operaciones de unidad: capturar la proteína terapéutica recombinante e inactivar virus presentes en el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante; capturar la proteína terapéutica recombinante, inactivar virus presentes en el fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, y ajustar la concentración iónica y/o pH de un líquido que contiene la proteína terapéutica recombinante; purificar la proteína terapéutica recombinante y pulir la proteína terapéutica recombinante; purificar la proteína terapéutica recombinante, pulir la proteína terapéutica recombinante, y filtrar un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante; y purificar la proteína terapéutica recombinante, pulir la proteína terapéutica recombinante, filtrar un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante o eliminar precipitados y/o materia particulada de un fluido que contiene la proteína terapéutica recombinante, y ajustar la concentración iónica y/o pH de un líquido que contiene la proteína terapéutica recombinante.

Beneficios Provistos por los Presentes Sistemas

Los sistemas descritos en la presente memoria proveen la filtración continua de cultivo celular que tiene uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) de los siguientes beneficios: volumen externo reducido de cultivo celular (fuera del recipiente), fracción de intercambio aumentada (dentro del primer conducto, la unidad TFF y el segundo conducto), tiempo de residencia externa reducido de cultivo celular (fuera del recipiente), tensión cortante reducida durante la

filtración del cultivo celular, viabilidad celular mejorada en el cultivo celular, densidad celular viable elevada en el cultivo celular, y ensuciamiento de filtro reducido en comparación con otros sistemas de filtración de circuito abierto unidireccionales (p. ej., sistemas TFF unidireccionales) o sistemas de filtración de circuito cerrado bidireccionales (sistemas ATF™ de circuito cerrado).

- 5 La fracción de intercambio y el tiempo de residencia externa de un sistema descrito en la presente memoria pueden calcularse utilizando las ecuaciones 1 y 2 de más abajo.

$$\frac{\text{Fracción de intercambio}}{\text{volumen de intercambio}} = \frac{\text{volumen de intercambio}}{\text{volumen externo}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\frac{\text{Tiempo de residencia externa}}{\text{volumen externo}} = \frac{\text{volumen externo}}{\text{tasa de intercambio} \times \text{fracción de intercambio}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Por ejemplo, los presentes sistemas pueden tener solo un volumen externo total de cultivo celular que es de entre 10 alrededor de 1% y alrededor de 7% (p. ej., de entre alrededor de 1,0% y alrededor de 6,5%, de entre alrededor de 1% y alrededor de 6,0%, de entre alrededor de 1% y alrededor de 5,5%, o de entre alrededor de 1% y alrededor de 5,0%) del volumen total de cultivo celular en el recipiente, el primer conducto, el segundo conducto y la unidad TFF. Los sistemas provistos en la presente memoria pueden también proveer un tiempo de residencia reducido del cultivo celular fuera del recipiente (tiempo de residencia externa reducido) de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 15 60 segundos (p. ej., de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 55 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 50 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y 45 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 30 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 25 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 20 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 15 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 13 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y 10 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 8 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 5 segundos, o de entre alrededor de 10 segundos y 14 segundos). La Tabla 1 de más abajo compara el tiempo de residencia externa del sistema a modo de ejemplo descrito en el ejemplo y un sistema de filtración tangencial alterno de sistema cerrado (ATF4).

Tabla 1. Comparación del Tiempo de Residencia Externa y la Fracción Externa del Sistema a Modo de Ejemplo Provisto en la Presente Memoria y el Sistema Cerrado ATF4

	Volumen Externo	Fracción Externa	Tiempo de Residencia
ATF4	0,756 L	19%	71 s
TFF	0,550 L	78%	12 s

Los presentes sistemas pueden proveer una fracción de intercambio mejorada de más de alrededor de 50% (p. ej., de más de alrededor de 55%, de más de alrededor de 60%, de más de alrededor de 65%, de más de alrededor de 70%, de más de alrededor de 75%, de más de alrededor de 80%, o de más de alrededor de 85%). Los sistemas descritos en la presente memoria pueden proveer altas densidades celulares viables en el cultivo celular, p. ej., una densidad celular viable de más de alrededor de 30×10^6 células/mL, de más de alrededor de 32×10^6 células/mL, de más de alrededor de 34×10^6 células/mL, de más de alrededor de 36×10^6 células/mL, de más de alrededor de 38×10^6 células/mL, de más de alrededor de 40×10^6 células/mL, de más de alrededor de 42×10^6 células/mL, de más de alrededor de 44×10^6 células/mL, de más de alrededor de 46×10^6 células/mL, de más de alrededor de 48×10^6 células/mL, de más de alrededor de 50×10^6 células/mL, de más de alrededor de 52×10^6 células/mL, de más de alrededor de 54×10^6 células/mL, de más de alrededor de 56×10^6 células/mL, de más de alrededor de 58×10^6 células/mL, o de más de alrededor de 60×10^6 células/mL. Los sistemas descritos en la presente memoria pueden proveer una densidad celular viable de más de alrededor de 65×10^6 células/mL, de más de alrededor de 70×10^6

células/mL, de más de alrededor de 75×10^6 células/mL, de más de alrededor de 80×10^6 células/mL, de más de alrededor de 85×10^6 células/mL, de más de alrededor de 90×10^6 células/mL, de más de alrededor de 95×10^6 células/mL, de más de alrededor de 100×10^6 células/mL, de más de alrededor de 105×10^6 células/mL, de más de alrededor de 110×10^6 células/mL, de más de alrededor de 115×10^6 células/mL, de más de alrededor de 120×10^6 células/mL, de más de alrededor de 125×10^6 células/mL, de más de alrededor de 130×10^6 células/mL, de más de alrededor de 135×10^6 células/mL, de más de alrededor de 140×10^6 células/mL, de más de alrededor de 145×10^6 células/mL, de más de alrededor de 150×10^6 células/mL, de más de alrededor de 155×10^6 células/mL, de más de alrededor de 160×10^6 células/mL, de más de alrededor de 165×10^6 células/mL, de más de alrededor de 170×10^6 células/mL, de más de alrededor de 175×10^6 células/mL, de más de alrededor de 180×10^6 células/mL, de más de alrededor de 185×10^6 células/mL, de más de alrededor de 190×10^6 células/mL, de más de alrededor de 200×10^6 células/mL, de más de alrededor de 210×10^6 células/mL, de más de alrededor de 220×10^6 células/mL, de más de alrededor de 230×10^6 células/mL, de más de alrededor de 240×10^6 células/mL, o de más de alrededor de 250×10^6 células/mL.

Los sistemas provistos en la presente memoria también proveen una tasa de intercambio optimizada (también llamada velocidad de flujo en la presente memoria). Como pueden apreciar las personas con experiencia en la técnica, una tasa de intercambio que sea demasiado alta puede resultar en un nivel de tensión cortante que impacta, de forma negativa, en el crecimiento celular y en el rendimiento del cultivo celular, y una tasa de intercambio que sea demasiado baja puede resultar en ensuciamiento de filtro y tiempo de residencia externa más largo del cultivo celular. Los sistemas provistos en la presente memoria proveen la obtención de cualquiera de las velocidades de flujo a modo de ejemplo descritas en la presente memoria.

Los sistemas provistos en la presente memoria también proveen una relación tasa de intercambio (XR) - velocidad de perfusión (PR) optimizada. Como una persona con experiencia en la técnica puede apreciar, los sistemas y métodos que proveen relaciones aumentadas de XR:PR resultan en métodos de producción de cultivo celular más eficientes (p. ej., utilizan menos medio de cultivo celular durante el proceso de perfusión). En algunos ejemplos, los dispositivos y métodos a modo de ejemplo en la presente memoria proveen una relación XR:PR de más de alrededor de 2 (p. ej., de más de alrededor de 3, de más de alrededor de 4, de más de alrededor de 5, de más de alrededor de 6, de más de alrededor de 7, de más de alrededor de 8, de más de alrededor de 9, de más de alrededor de 10, de más de alrededor de 11, de más de alrededor de 12, de más de alrededor de 13, de más de alrededor de 14, de más de alrededor de 15, de más de alrededor de 16, de más de alrededor de 17, de más de alrededor de 18, de más de alrededor de 19, de más de alrededor de 20, de más de alrededor de 21, de más de alrededor de 22, de más de alrededor de 23, de más de alrededor de 24, de más de alrededor de 25, de más de alrededor de 50, de más de alrededor de 75, de más de alrededor de 100, de más de alrededor de 125, de más de alrededor de 150, de más de alrededor de 175, de más de alrededor de 200, de más de alrededor de 225, de más de alrededor de 250, de más de alrededor de 275, de más de alrededor de 300, de más de alrededor de 325, de más de alrededor de 350, de más de alrededor de 375, de más de alrededor de 400, de más de alrededor de 425, de más de alrededor de 450, de más de alrededor de 475, de más de alrededor de 500, de más de alrededor de 525, de más de alrededor de 550, de más de alrededor de 575, o de más de alrededor de 600), o de entre alrededor de 5 y alrededor de 600 (p. ej., de entre alrededor de 10 y alrededor de 550, de entre alrededor de 10 y alrededor de 500, de entre alrededor de 10 y alrededor de 450, de entre alrededor de 10 y alrededor de 400, de entre alrededor de 10 y alrededor de 350, de entre alrededor de 10 y alrededor de 300, de entre alrededor de 10 y alrededor de 250, de entre alrededor de 10 y alrededor de 200, de entre alrededor de 10 y alrededor de 150, de entre alrededor de 10 y alrededor de 100, o de entre alrededor de 10 y alrededor de 50).

Métodos de Procesamiento de Cultivo Celular

También se proveen métodos de procesamiento de un cultivo celular que incluyen (a) proveer un sistema de filtración de circuito abierto (p. ej., cualquier de los sistemas de filtración de circuito abierto descritos en la presente memoria), (b) hacer fluir el cultivo celular desde el recipiente a través de la unidad TFF en una primera dirección de flujo durante un primer período, (c) invertir la primera dirección de flujo y hacer fluir el cultivo celular a través de la unidad TFF en una segunda dirección de flujo durante un segundo período, (d) invertir la segunda dirección de flujo y hacer fluir el cultivo a través de la unidad TFF en la primera dirección de flujo durante un tercer período, (e) repetir las etapas (c)-(d) al menos dos (p. ej., al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, quince, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, noventa, o cien, o más de cien) veces, y (f) recoger el filtrado. Varios aspectos a modo de ejemplo de dichos métodos se describen más abajo.

Cultivo Celular

El cultivo celular a procesarse en los métodos provistos en la presente memoria puede contener múltiples de cualquier tipo de célula de mamífero en un medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos de todos los métodos descritos en la presente memoria, el mamífero es una célula de mamífero que crece en cultivo en suspensión. En otros ejemplos, la célula de mamífero es una célula adherente (p. ej., una célula que requiere un sustrato sólido como, por ejemplo, microportadores, para el crecimiento en un biorreactor de perfusión). Ejemplos no restrictivos de células de mamífero que pueden estar presentes en un cultivo celular incluyen: células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) (p. ej., células CHO DG44, células CHO-K1s, células de mieloma Sp2.0 (p. ej., NS/0), células B, células de hibridoma, células T, células de riñón embrionario humano (HEK, por sus siglas en inglés) (p. ej., HEK 293E y HEK

293F), células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero), y células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (Cocker Spaniel) (MDCK, por sus siglas en inglés). Células de mamífero adicionales que pueden estar presentes en un cultivo celular se conocen en la técnica.

Ejemplos no restrictivos de proteínas recombinantes que pueden secretarse por las células de mamífero en el cultivo celular incluyen inmunoglobulinas (incluidas las inmunoglobulinas de cadena ligera y de cadena pesada, anticuerpos,

o fragmentos de anticuerpos (p. ej., cualquiera de los fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria), enzimas (p. ej., una galactosidasa (p. ej., una alfa-galactosidasa), Myozyme, o Cerezyme), proteínas (p. ej., eritropoyetina humana, factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), o un alfa o beta de interferón), o proteínas inmunogénicas o antigénicas o fragmentos de proteínas (p. ej., proteínas para su uso en una vacuna). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un polipéptido de unión al antígeno diseñado que contiene al menos un andamio de proteína recombinante multifuncional (es preciso ver, p. ej., las proteínas de unión al antígeno recombinantes descritas en el documento de Gebauer y otros, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009; y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2012/0164066). Ejemplos no restrictivos de proteínas recombinantes que son anticuerpos incluyen: panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimumab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, apolizumab, atinumab, tocilizumab, basiliximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, biciromab, canakinumab, cetuximab, daclizumab, denosumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, ertumaxomab, etaracizumab, golimumab, infliximab, natalizumab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab y trastuzumab. Ejemplos adicionales de anticuerpos terapéuticos que pueden producirse por los métodos descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica. Ejemplos no restrictivos adicionales de proteínas recombinantes que pueden secretarse por las células de mamífero en el cultivo celular incluyen: alglucosidasa alfa, laronidasa, abatacept, galsulfasa, lutropina alfa, factor antihemofílico, agalsidasa beta, interferón beta-1a, darbepoetina alfa, tenecteplaza, etanercept, factor de coagulación IX, hormona estimulante del folículo, interferón beta-1a, imiglucerasa, dornasa alfa, epoetina alfa, y alteplasa.

Los medios de cultivo líquidos son conocidos en la técnica. El medio de cultivo líquido puede complementarse con un suero de mamífero (p. ej., suero de ternera fetal y suero bovino) y/o una hormona de crecimiento o factor de crecimiento (p. ej., insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico). De manera alternativa o adicional, el medio de cultivo líquido puede ser un medio de cultivo líquido definido químicamente, un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animal, un medio de cultivo líquido libre de suero, o un medio de cultivo líquido que contiene suero. Ejemplos de medios de cultivo líquidos definidos químicamente, medios de cultivo líquidos libres de componentes derivados de animal, medios de cultivo líquidos libres de suero, y medios de cultivo líquidos que contienen suero se encuentran comercialmente disponibles.

Un medio de cultivo líquido normalmente contiene una fuente de energía (p. ej., un carbohidrato como, por ejemplo, glucosa), aminoácidos esenciales (p. ej., el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína), vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos en bajas concentraciones, ácidos grasos libres, y/o elementos traza. El medio de cultivo líquido puede, si se desea, complementarse con, p. ej., una hormona de mamífero o factor de crecimiento (p. ej., insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales y tampones (p. ej., calcio, magnesio, y sales de fosfato), nucleósidos y bases (p. ej., adenosina, timidina e hipoxantina), hidrolizados de proteína y tejido, y/o cualquier combinación de estos u otros aditivos.

Ejemplos no restrictivos de medios de cultivo líquidos incluyen, p. ej., CD CHO, Opti CHO, y Forti CHO (todos comercializados por Life Technologies; Grand Island, NY), medio Hyclone CHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), medio Ex-cell CD CHO Fusion (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO), y medio PowerCHO (Lonza Group, Ltd.; Basilea, Suiza). Componentes de medio que también pueden estar presentes en un medio de cultivo líquido incluyen, pero sin limitación a, hidrolizados químicamente definidos (CD, por sus siglas en inglés), p. ej., peptona CD, polipéptidos CD (dos o más aminoácidos), y factores de crecimiento CD. Ejemplos adicionales de medio de cultivo de tejido líquido y componentes de medio son conocidos en la técnica.

Un cultivo celular que contiene células de mamífero adherentes puede crecer en un biorreactor de perfusión mediante el uso de, p. ej., microportadores. Microportadores a modo de ejemplo no restrictivo que pueden usarse incluyen CytoPore™ 1 y CytoPore™ 2 (comercializados por GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, Nueva Jersey). Ejemplos adicionales de microportadores que pueden usarse se encuentran públicamente disponibles y se conocen en la técnica.

Uso de Sistemas de Filtración de Circuito Abierto a Modo de Ejemplo

Cualquiera de los sistemas de filtración de circuito abierto descritos en la presente memoria puede usarse en los métodos provistos de procesamiento de un cultivo celular. Por ejemplo, el biorreactor en el sistema de filtración de circuito abierto utilizado en los métodos descritos en la presente memoria puede ser un biorreactor (p. ej., cualquier biorreactor de perfusión conocido en la técnica) o un tanque de retención refrigerado. El sistema de filtración de circuito abierto utilizado en los métodos puede incluir uno o más conductos (p. ej., el primer conducto, el segundo conducto, el único o más conductos entre unidades TFF vecinas, y/o el conducto de filtrado) que es/son tubería biocompatible. En algunos ejemplos, el sistema de filtración de circuito abierto contiene un recipiente y dos o más subsistemas (según se describe en la presente memoria).

Los sistemas de filtración de circuito abierto utilizados en los métodos pueden incluir una unidad TFF con un solo filtro de flujo cruzado (p. ej., un filtro de flujo cruzado tubular) o dos o más (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco) filtros de flujo cruzado (p. ej., filtros de flujo cruzado tubulares) según se describe en la presente memoria. En otros ejemplos, los sistemas de filtración de circuito abierto utilizados pueden incluir dos o más (p. ej., dos, tres o cuatro) unidades TFF, donde cada par de unidades TFF vecinas se conectan de manera fluida por un conducto de fluido. Las unidades TFF

pueden proveer un área de filtración total de entre alrededor de 0,1 m² a alrededor de 150 m² (p. ej., de entre alrededor de 0,1 m² a alrededor de 145 m², de entre alrededor de 0,1 m² y 140 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 135 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 130 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 125 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 120 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 115 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 110 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 105 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 100 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 95 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 90 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 85 m², de entre alrededor de 0,1 m² y 80 m², de entre alrededor de 0,1 m² y 75 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 70 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 65 m², de entre alrededor de 0,1 m² y 60 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 55 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 50 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 45 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 40 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 35 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 30 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 25 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 20 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 15 m², de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 10 m², o de entre alrededor de 0,1 m² y alrededor de 5 m²). El(s) filtro(s) presente(s) en una unidad TFF puede(n) tener cualquier combinación de los tamaños de poro (p. ej., de alrededor de 0,2 µm), formas, diámetros internos de fibra, y/o longitudes de fibra descritos en la presente memoria.

Los sistemas de filtración de circuito abierto utilizados en la presente memoria pueden incluir al menos una bomba dispuesta en el primer conducto o en el segundo conducto, o en ambos. La al menos una bomba puede también disponerse en uno o más de los conductos en el sistema (p. ej., uno o más del primer conducto, segundo conducto, y/o el único o más conductos entre unidades TFF vecinas). El sistema utilizado puede incluir al menos una bomba dispuesta en el recipiente y proximal al primer o segundo conducto (p. ej., una distancia de entre 0,01 cm a 5 cm (p. ej., de entre 0,01 cm y 4 cm, de entre 0,01 cm y 3 cm, de entre 0,01 cm y 2 cm, o de entre 0,01 cm y 1 cm) de la bomba a la posición donde el primer conducto o el segundo conducto se conecta al biorreactor). Algunos sistemas solo incluyen una sola bomba que hace fluir el cultivo celular en la primera dirección durante el primer y tercer períodos y que hace fluir el cultivo celular en la segunda dirección durante el segundo período. Otros sistemas incluyen una primera y una segunda bombas, donde la primera bomba hace fluir el cultivo celular en la primera dirección y la segunda bomba hace fluir el cultivo celular en la segunda dirección.

En cualquiera de los sistemas usados en los métodos, la al menos una bomba (p. ej., una, dos, tres o cuatro bombas) puede ser una LTP (p. ej., cualquiera de las LTP descritas en la presente memoria como, por ejemplo, una bomba peristáltica). La al menos una bomba (p. ej., al menos una LTP) presente en el sistema usado en los métodos puede tener cualquier combinación de las características o aspectos de bomba (p. ej., LTP) descritos en la presente memoria (p. ej., volumen de altura de bombeo, tipo y/o tubería). En algunos de los métodos, la al menos una bomba se usa a una velocidad de bomba (RPM) de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 100 RPM (p. ej., de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 95 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 90 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 85 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 80 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 75 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 70 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 65 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 60 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 55 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 50 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 45 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 40 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 35 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 30 RPM, de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 25 RPM, o de entre alrededor de 10 RPM y alrededor de 20 RPM). En algunos ejemplos, los métodos resultan en una velocidad de flujo de perfusión de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 40 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 35 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 30 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora y alrededor de 25 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 20 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora y alrededor de 15 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 10 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora y alrededor de 9 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 8 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 7 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 6 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 5 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 4 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 3 L/m²/hora, de entre alrededor de 0,5 L/m²/hora a alrededor de 2 L/m²/hora, o de entre alrededor de 0,8 L/m²/hora a alrededor de 1,2 L/m²/hora). En algunos ejemplos, el uso de la al menos una bomba resulta en una velocidad de cizallamiento en el sistema de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 1000 s⁻¹ (p. ej., de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 950 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 900 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 850 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 800 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 750 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 700 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 650 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 600 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 550 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 500 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 450 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 400 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 350 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 300 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 250 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 200 s⁻¹, de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 150 s⁻¹, o de entre alrededor de 50 s⁻¹ a alrededor de 100 s⁻¹). Ejemplos específicos de bombas que pueden usarse en dichos métodos son una bomba peristáltica Watson-Marlow 620 con tubería de 16 mm o una bomba peristáltica Watson-Marlow 800 con tubería de 40 mm.

Como una persona con experiencia en la técnica puede apreciar, el volumen total de cultivo celular en el sistema (excluido el volumen de filtrado en el conducto de filtrado y el tanque de retención de filtrado), el área de filtración total provista por la al menos una unidad TFF, y la velocidad de flujo (p. ej., en el segundo y tercer períodos) necesitan llevarse a cabo en una relación razonable (p. ej., valores y parámetros a modo de ejemplo descritos en la presente memoria) que permita el único o más beneficios de los sistemas y métodos provistos en la presente memoria.

Ciclo de Flujo

En los métodos descritos en la presente memoria, el primer, segundo y/o tercer períodos pueden ser de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 15 minutos (p. ej., de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 15 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 14 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 13

- 5 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 12 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 11 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 10 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 9 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 8 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 7 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 6 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 5 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 4 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 3 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 2 minutos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 115 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 110 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 105 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 100 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 95 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 90 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 85 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 80 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 75 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 70 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 65 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 60 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 55 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 50 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 45 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 40 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 35 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 30 segundos, de entre alrededor de 20 segundos y alrededor de 25 segundos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 90 segundos, de entre alrededor de 35 segundos y alrededor de 85 segundos, de entre alrededor de 40 segundos y alrededor de 80 segundos, de entre alrededor de 45 segundos y alrededor de 75 segundos, de entre alrededor de 50 segundos y alrededor de 70 segundos, de entre alrededor de 55 segundos y alrededor de 65 segundos, de entre alrededor de 30 segundos y 14 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y 13 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y 12 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 11 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 10 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 9 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 8 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 7 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 6 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 5 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 4 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 3 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 2 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 90 segundos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 1 minuto, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 15 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 14 minutos, de entre alrededor de 15 minutos y alrededor de 13 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 12 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 11 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 10 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 9 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 8 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 7 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 6 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 5 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 4 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 3 minutos, de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 2 minutos, o de entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 90 segundos). En algunos ejemplos, el primer, segundo y tercer períodos son aproximadamente iguales. En otros ejemplos, el primer, segundo y tercer períodos no son iguales.

En algunos ejemplos, la primera dirección de flujo en el primer período hace fluir el cultivo celular desde el recipiente a través del primer o segundo conducto en el cual se dispone al menos una bomba (p. ej., una sola bomba), luego a través de al menos una unidad TFF, luego otra vez al recipiente a través del otro conducto (p. ej., durante un período de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 60 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 50 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 40 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 30 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 20 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 15 minutos, de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 10 minutos, o de entre alrededor de 30 segundos y alrededor de 5 minutos). En dichos ejemplos, el flujo durante el primer período se usa para equilibrar la al menos una unidad TFF en el sistema (y el al menos un filtro de flujo cruzado allí). La Figura 8 es un diagrama esquemático que muestra el flujo del cultivo celular en la primera dirección de flujo con el fin de equilibrar la al menos una unidad TFF en el sistema.

La Figura 9 muestra un ejemplo de flujo del cultivo celular desde el recipiente a través de la unidad TFF en una primera dirección de flujo durante un primer período (t_1), inversión de la primera dirección de flujo durante un período (t_{12}) y flujo del cultivo celular a través de la unidad TFF en una segunda dirección de flujo durante un segundo período (t_2), inversión de la segunda dirección de flujo durante un período (t_{23}) y flujo del cultivo a través de la unidad TFF en la primera dirección de flujo durante un tercer período (t_3). Por ejemplo, el t_{12} y/o el t_{23} pueden ser de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 1 minuto (p. ej., de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 55 segundos, de entre

alrededor de 1 segundo y alrededor de 50 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 45 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 40 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 35 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 30 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 25 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 20 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 15 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 10 segundos, de entre alrededor de 1 segundo y alrededor de 5 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 60 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 55 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 50 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 45 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 40 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 35 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 30 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 25 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 15 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 10 segundos, o de entre alrededor de 2 segundos y alrededor de 10 segundos, de entre alrededor de 2 segundos y alrededor de 8 segundos, de entre alrededor de 2 segundos y alrededor de 6 segundos, o de entre alrededor de 2 segundos y alrededor de 4 segundos).

- 15 El flujo en la primera y/o segunda direcciones (p. ej., cualquiera del primer, segundo y/o tercer períodos) puede resultar en una velocidad de flujo de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 120 L/minuto (p. ej., de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 115 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 110 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 105 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 100 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 95 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 90 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 85 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 80 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 75 L/minuto, de entre alrededor de 0,5 L/minuto a alrededor de 70 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 65 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 60 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 55 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 50 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 45 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 40 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 35 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 30 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 25 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 20 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 15 L/minuto, de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 10 L/minuto, o de entre alrededor de 0,1 L/minuto a alrededor de 5 L/minuto).
- 30 La sola iteración del (i) flujo del cultivo celular en la primera dirección de flujo durante el primer período y (ii) flujo del cultivo celular en la segunda dirección de flujo durante el segundo período pueden resultar en una fracción de intercambio de entre alrededor de 40% a alrededor de 95% (p. ej., de entre alrededor de 40% a alrededor de 90%, de entre alrededor de 40% a alrededor de 85%, de entre alrededor de 40% a alrededor de 80%, de entre alrededor de 40% a alrededor de 75%, de entre alrededor de 45% a alrededor de 80%, de entre alrededor de 50% a alrededor de 80%, de entre alrededor de 55% a alrededor de 75%, de entre alrededor de 60% y alrededor de 85%, de entre alrededor de 70% y alrededor de 95%, o de entre alrededor de 70% y alrededor de 85%).

En los métodos provistos en la presente memoria, el volumen de cultivo celular en el sistema (con la excepción del conducto de filtrado, el tanque de retención de filtrado, y/o el sistema de fabricación biológico) puede ser de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 50 L (p. ej., de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 45 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 40 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 35 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 30 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 25 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 20 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 18 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 16 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 14 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 12 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 10 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 8 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 6 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 4 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 3 L, de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 2 L, o de entre alrededor de 0,1 L y alrededor de 1 L). La cantidad de tiempo que el cultivo celular pasa fuera del recipiente (p. ej., el biorreactor de perfusión) en los métodos descritos en la presente memoria puede ser de entre 5 segundos a 45 segundos (p. ej., de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 40 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 35 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 30 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 25 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 20 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 15 segundos, de entre alrededor de 5 segundos y alrededor de 10 segundos).

55 Los métodos descritos en la presente memoria pueden producir un filtrado que no contiene una célula de mamífero. Los métodos provistos en la presente memoria pueden también producir un filtrado que contiene una proteína recombinante secretada (p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de aquél, un factor de crecimiento, una citocina, o una enzima) de un cultivo celular que contiene la proteína recombinante secretada. En algunos casos, el cultivo celular y/o el filtrado son estériles.

60 Los presentes métodos pueden aumentarse o reducirse en sus capacidades para filtrar un volumen más grande de cultivo celular por unidad de tiempo. Como pueden apreciar las personas con experiencia en la técnica, un mayor volumen de cultivo celular puede procesarse por unidad de tiempo incorporando al menos una bomba con un volumen de altura de bombeo mayor y tubería más grande y/o un número mayor de filtros de flujo cruzado en unidades TFF o un número mayor de unidades TFF (p. ej., un área de filtración total mayor). Dichos cambios pueden implementarse

en el sistema de filtración de circuito abierto utilizado para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria y pueden probarse para asegurar que el sistema de escala mayor tiene uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) de los siguientes beneficios: volumen externo reducido de cultivo celular (fuera del recipiente), fracción de intercambio aumentada (p. ej., dentro del primer conducto, la unidad TFF, y el segundo conducto), tiempo de residencia externa reducido del cultivo celular (fuera del recipiente), tensión cortante reducida durante la filtración del cultivo celular, viabilidad celular mejorada en el cultivo celular, densidad celular viable elevada en el cultivo celular, y ensuciamiento de filtro reducido en comparación con otros sistemas de filtración de circuito abierto unidireccionales (p. ej., sistemas TFF unidireccionales) o sistemas de filtración de circuito cerrado bidireccionales (sistemas ATFTM de circuito cerrado). Ejemplos de los parámetros físicos y funcionales de tres métodos diferentes a modo de ejemplo y de los sistemas de filtración de circuito abierto utilizados para llevar a cabo cada método se muestran en la Tabla 2 (más abajo).

Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede llevarse a cabo de forma continua durante un período de entre alrededor de 14 días y alrededor de 100 días (p. ej., de entre alrededor de 14 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 14 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 40 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 50 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 50 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 50 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 60 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 60 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 60 días y alrededor de 80 días, o de entre alrededor de 60 días y alrededor de 70 días).

Tabla 2. Parámetros de tres métodos diferentes a modo de ejemplo y del sistema utilizado para llevar a cabo cada método

Filtro	Volumen de trabajo (L)	Longitud de fibra (cm)	Área de filtración (m ²)	xx objetivo células/mL	Velocidad de perfusión (L/d)	Tasa de intercambio (L/min)	Volumen externo (L)	Fracción de intercambio (%)	Tiempo de residencia externa (s)	Veloc. de cizallam. (1/s)	KR:PR	Flujo de perfusión (L/m ² /hr)	Bomba	Velocidad de bomba (RPM)
ATF4	10	50	0,77	40-80	20	3,5	0,55	78	12	716	252	1,98	Watson-Marlow 620 con tubería de 16 mm	68
2x ATF6 o ATF8	50	60	5	40-80	100	8	3,5	50	25	543	58	1,67	Watson-Marlow 800 con tubería de 25 mm	25
2x ATF10	500	60	40	40-80	2000	60	15	70	15	509	43	2,08	Watson-Marlow 800 con tubería de 40 mm	25

En algunos casos, el cambio en la presión a lo largo de las fibras de filtro en uno o más filtros de flujo cruzado en la al menos una unidad TFF y/o el cambio en la presión a lo largo de la membrana de filtro en uno o más filtros de flujo cruzado en la al menos una unidad TFF permanece sustancialmente igual (p. ej., dentro de alrededor de $\pm 20\%$, dentro de alrededor de $\pm 19\%$, dentro de alrededor de $\pm 18\%$, dentro de alrededor de $\pm 17\%$, dentro de alrededor de $\pm 16\%$, dentro de alrededor de $\pm 15\%$, dentro de alrededor de $\pm 14\%$, dentro de alrededor de $\pm 13\%$, dentro de alrededor de $\pm 12\%$, dentro de alrededor de $\pm 11\%$, dentro de alrededor de $\pm 10\%$, dentro de alrededor de $\pm 9\%$, dentro de alrededor de $\pm 8\%$, dentro de alrededor de $\pm 7\%$, dentro de alrededor de $\pm 6\%$, dentro de alrededor de $\pm 5\%$, dentro de alrededor de $\pm 4\%$, dentro de alrededor de $\pm 3\%$, dentro de alrededor de $\pm 2,5\%$, dentro de alrededor de $\pm 2,0\%$, dentro de alrededor de $\pm 1,5\%$, dentro de alrededor de $\pm 1,0\%$, o dentro de alrededor de $\pm 0,5\%$ del cambio inicial en la presión a lo largo de las fibras de filtro o a lo largo de la membrana de filtro al inicio del método) durante el desempeño del método durante un período de alrededor de, p. ej., de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 100 días (p. ej., de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 35 días, de entre

alrededor de 1 hora y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 15 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 10 días, de entre alrededor de 1 hora y alrededor de 5 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 15 días, de entre alrededor de 1 día y alrededor de 10 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 15 días, de entre alrededor de 5 días y alrededor de 10 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 15 días, de entre alrededor de 10 días y alrededor de 10 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 15 días, de entre alrededor de 15 días y alrededor de 10 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 20 días y alrededor de 15 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 25 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 30 días y alrededor de 20 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 100 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 95 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 90 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 85 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 80 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 75 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 70 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 65 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 60 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 55 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 50 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 45 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 40 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 35 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 30 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 25 días, de entre alrededor de 35 días y alrededor de 20 días, o de entre alrededor de 35 días y alrededor de 20 días). Un aumento significativo en el cambio de presión a lo largo de la fibra de filtro o de la membrana de filtro indica ensuciamiento del al menos un filtro de flujo cruzado en al menos una unidad TFF en el sistema.

Incubación del Cultivo Celular en el Recipiente

Algunos casos además incluyen incubar el cultivo celular en el recipiente (p. ej., biorreactor de perfusión) en condiciones que permitan que la célula de mamífero secrete una proteína recombinante hacia el medio de cultivo de tejido. Por ejemplo, el cultivo celular en el recipiente puede incubarse a una temperatura de alrededor de 32°C a alrededor de 39°C. Las personas con experiencia en la técnica apreciarán que la temperatura puede cambiarse en puntos temporales específicos durante la incubación (p. ej., cada hora o día). Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse (p. ej., aumentarse o reducirse) en alrededor de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, once días, doce días, catorce días, quince días, diecisés días, diecisiete días, dieciocho días, diecinueve días, o alrededor de veinte días o más después de la colocación del cultivo celular en el recipiente). Por ejemplo, la temperatura puede cambiar hacia arriba (p. ej., un cambio de hasta o de alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10,0°C). Por ejemplo, la temperatura puede cambiar hacia abajo (p. ej., un cambio de hasta o de alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10°C). La incubación del cultivo celular en un recipiente puede también llevarse a cabo en una atmósfera que contenga como máximo o alrededor de 1% a 15% de CO₂ (p. ej., como máximo o alrededor de 14% de CO₂, 12% de CO₂, 10% de CO₂, 8% de CO₂, 6% de CO₂, 5% de CO₂, 4% de CO₂, 3% de CO₂, 2% de CO₂, o como máximo o alrededor de 1% de CO₂). Además, cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede incluir la incubación del cultivo celular en una atmósfera humidificada (p. ej., al menos o alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 85%, 80%, 85%, 90%, o al menos o alrededor de 95% de humedad, o alrededor de 100% de humedad).

La incubación del cultivo celular en un recipiente (p. ej., un biorreactor de perfusión) durante la reiteración del primer, segundo y tercer períodos puede incluir una etapa de añadir un volumen de medio de cultivo líquido al biorreactor. Por ejemplo, la adición del volumen de medio de cultivo líquido al biorreactor puede contrarrestar la pérdida de medio de cultivo líquido que deja el sistema como filtrado. La adición de medio de cultivo líquido al recipiente puede llevarse a cabo de manera continua o periódica (p. ej., una vez cada tercer día, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, o más de cinco veces al día), o cualquier combinación de ellos. El volumen de medio de cultivo líquido añadido al recipiente puede, en algunas instancias, llevarse a cabo

de modo que el volumen inicial de cultivo celular en el sistema (excluido el volumen del filtrado presente en el conducto de filtrado y en el tanque de retención de filtrado) sea aproximadamente el mismo durante cada período de 24 horas o durante todo el período durante el cual se lleva a cabo el método. Como se conoce en la técnica, la velocidad a la cual el medio de cultivo líquido se retira del sistema como filtrado (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la cual el volumen del medio de cultivo líquido se añade al recipiente (volumen/unidad de tiempo) pueden variar. La velocidad a la cual el medio de cultivo líquido se retira del sistema como filtrado (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la cual el volumen del medio de cultivo líquido se añade (volumen/unidad de tiempo) pueden ser aproximadamente iguales o pueden ser diferentes.

De manera alternativa, el volumen retirado del sistema como filtrado y el volumen añadido al recipiente pueden cambiar (p. ej., aumentar gradualmente) durante cada período de 24 horas (o, de manera alternativa, un período incremental de entre 0,1 hora y alrededor de 24 horas o un período incremental de más de 24 horas) durante el desempeño del método. Por ejemplo, el volumen de medio de cultivo líquido retirado del sistema como filtrado y el volumen del medio de cultivo líquido añadido dentro de cada período de 24 horas (o, de manera alternativa, un período incremental de entre alrededor de 1 hora y por encima de 24 horas o un período incremental de más de 24 horas) durante el desempeño del método pueden aumentarse (p. ej., gradualmente o a través de incrementos escalonados), p. ej., de un volumen que es de entre 0,5% a alrededor de 20% del volumen de recipiente o del volumen total del cultivo celular al inicio del desempeño del método a alrededor de 25% a alrededor de 150% del volumen del recipiente o del volumen total del cultivo celular al inicio del desempeño del método. Como puede apreciar una persona con experiencia en la técnica, dentro de cada período de 24 horas, el volumen retirado del sistema como filtrado y el volumen añadido al recipiente es, preferiblemente, de alrededor 100% a alrededor de 400% (p. ej., de entre alrededor de 100% y alrededor de 350%, de entre alrededor de 100% y alrededor de 300%, de entre alrededor de 100% y alrededor de 250%, de entre alrededor de 100% y alrededor de 200%, de entre alrededor de 100% y alrededor de 150%, de entre alrededor de 150% y alrededor de 400%, de entre alrededor de 150% y alrededor de 350%, de entre alrededor de 150% y alrededor de 300%, de entre alrededor de 150% y alrededor de 250%, de entre alrededor de 150% y alrededor de 200%, de entre alrededor de 200% y alrededor de 400%, de entre alrededor de 200% y alrededor de 350%, de entre alrededor de 200% y alrededor de 300%, o de entre alrededor de 200% y alrededor de 250%) de volumen del recipiente o del volumen total del cultivo celular al inicio del desempeño del método.

Las personas con experiencia en la técnica apreciarán que el medio de cultivo líquido retirado del sistema como filtrado y el medio de cultivo líquido añadido al recipiente pueden ser el mismo tipo de medio. En otras instancias, el medio de cultivo líquido retirado del sistema como filtrado y el medio de cultivo líquido añadido al recipiente pueden ser sustancialmente diferentes. El volumen del medio de cultivo líquido puede añadirse de forma manual o mediante el uso de un sistema automatizado, p. ej., mediante una bomba de perfusión.

Aislamiento de la Proteína Recombinante del Filtrado

Cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede además incluir una etapa de aislamiento de la proteína recombinante secretada (p. ej., cualquiera de las proteínas recombinantes descritas en la presente memoria) del filtrado. Muchos métodos para aislar un polipéptido (p. ej., un polipéptido secretado) de un fluido se conocen en la técnica. Por ejemplo, métodos para aislar una proteína recombinante pueden incluir una o más etapas de: capturar, purificar, pulir, y/o filtrar un fluido que contiene la proteína recombinante. Como se conoce en la técnica, los métodos específicos utilizados para aislar una proteína recombinante dependerán de las propiedades biofísicas de la proteína recombinante. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante puede purificarse mediante el uso de, en parte, una etapa de captura del anticuerpo mediante el uso de una resina de proteína A.

En algunos ejemplos, una proteína recombinante presente en el filtrado se aísla mediante el uso de un proceso integrado y continuo que incluye el aislamiento a través de al menos un sistema de cromatografía multicolumna (MCCS) (p. ej., cualquiera del único o más MCCS descritos en la presente memoria). El proceso integrado y continuo puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de los sistemas de fabricación biológico descritos a modo de ejemplo en la presente memoria. Procesos integrados y continuos a modo de ejemplo para aislar una proteína recombinante y sistemas de fabricación biológico a utilizarse en dichos procesos se describen en la técnica.

La proteína recombinante aislada resultante puede ser al menos o alrededor de 50% pura en peso, p. ej., al menos o alrededor de 55% pura en peso, al menos 60% pura en peso, al menos 65% pura en peso, al menos 70% pura en peso, al menos 75% pura en peso, al menos 80% pura en peso, al menos 85% pura en peso, al menos 90% pura en peso, al menos 95% pura en peso, al menos 96% pura en peso, al menos 97% pura en peso, al menos 98% pura en peso, o al menos o alrededor de 99% pura en peso, o más de 99% pura en peso.

Algunos métodos además incluyen una etapa de formulación de una sustancia de fármaco terapéutico mediante la mezcla de la proteína recombinante aislada con un excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable. La mezcla puede llevarse a cabo mezclando un fluido que contiene la proteína recombinante aislada con una solución tamponada. En otros ejemplos, la mezcla puede llevarse a cabo añadiendo una sustancia tampón sólida a un fluido que contiene la proteína recombinante aislada con una solución tamponada. Otra forma de mezcla, comprendida en la presente memoria, implica disolver una composición sólida (p. ej., un polvo o torta liofilizada) que contiene la proteína recombinante aislada con una solución (p. ej., solución salina estéril inyectable). La sustancia de fármaco terapéutico puede formularse para cualquier vía de administración conocida en la técnica (p. ej., administración oral,

administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración subcutánea, administración intratecal, o inhalación).

EJEMPLOS

La invención se describe más en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Comparación de Procesamiento Logrado por Sistemas de Filtración de Circuito Abierto Provistos en la Presente Memoria Versus Procesamiento Logrado por ATF™ (Refine Technology)

Se ha llevado a cabo un conjunto de experimentos para comparar el procesamiento del cultivo celular logrado por un sistema de filtración de circuito abierto provisto en la presente memoria con el procesamiento del cultivo celular logrado por ATF™ (Refine Technology) (un sistema de filtración tangencial de flujo alterno de circuito cerrado). El dispositivo utilizado para llevar a cabo dichos experimentos se representa, en general, en la Figura 5. De manera específica, el recipiente utilizado en el sistema de filtración de circuito abierto es un biorreactor Broadly-James 15L, el primer conducto y el segundo conducto son biocompatibles, tubería de transferencia soldable con un diámetro interno de 0,5 pulgadas, la unidad TFF contiene un solo filtro de flujo cruzado tubular (compuesto de fibras de polietersulfona con una longitud de 30 cm y un diámetro interno de 1 mm, y con un tamaño de poro promedio de 0,2 μm , una densidad de fibra de 830 fibras/filtro, y un área de filtración de 0,77 m^2), al menos una bomba es una sola bomba peristáltica Watson-Marlow que puede hacer fluir un fluido en la primera y segunda direcciones de flujo, con un volumen de altura de bombeo de entre 50 mL a 100 mL con tubería GORE Sta-Pure de doble canal que tiene un diámetro interno de 16 mm y un diámetro de pared de 4 mm.

Materiales y Métodos

Un compendio de los parámetros experimentales utilizados para la comparación del procesamiento logrado por los sistemas de filtración de circuito abierto provistos en la presente memoria y ATF™ de Refine Technology se resume en las Tablas 3 y 4 (más abajo). Un compendio más detallado de los métodos utilizados para llevar a cabo dichos experimentos se provee más abajo.

Tabla 3. Parámetros experimentales

Parámetro	Descripción detallada	
	TFF	ATF4
Línea celular	GC2008 clon A61, banco de alta densidad "GC2008 A61 HD WAVE," 45×10^7 células/vial	
Medios	CD CHO con glutamina	
Biorreactores	Biorreactor Broadly James 15 L	
Volumen de trabajo	10 L	
Inóculo de biorreactor	Cultivo celular de matraz oscilante	
Densidad de inoculación	$0,5 - 1 \times 10^6$ células/mL	
Objetivo de densidad celular	Permitir alcanzar 40×10^6 células/mL con 2 Volumen de Reactor (RV)/día, y sangrado para mantener	
Velocidad de perfusión específica celular	0,05 nL/célula-d	
Extracción de biomasa (según sea necesario)	Si la correlación capacitancia (Aber) vs. densidad celular es buena, utilizar la capacitancia para controlar la velocidad de sangrado. De manera alternativa, usar rociado de O ₂	
Temperatura	37°C	

ES 2 891 728 T3

Parámetro	Descripción detallada	
	TFF	ATF4
Agitación	120 RPM	
DO	$\leq 40\%$	
Base	1M Na ₂ CO ₃ (carbonato de sodio)	
Antiespumante	Invitrogen Foam Away 3% simeticona (30.000 PPM) Inventario de trabajo: 3000PPM (diluido en WFI)	
pCO ₂	<120 mmHg, rociado con N ₂ si >120 mmHg	
pH	6,95 ± 0,1	
Adición de gas	Rociado: oxígeno, CO ₂ (según sea necesario), N ₂ (según sea necesario) Recubrimiento: aire a 100 ccpm	
Rociador O ₂	20 µm sinterizado	
Rociador N ₂	Agujero perforado de 1 mm	
Dispositivo de separación celular	TFF con bomba peristáltica Watson-Marlow 620Du con altura de bombeo 620L, tubería Gore sta-pure de 16 mm de ID filtro ATF4 (0,2 µm)	Refine ATF4
Velocidad de intercambio ATF/TFF	3,5 L/min (65-70 rpm), invertir cada 1 min	3,5 L/min, invertir cada 7 segundos

Tabla 4. Comparación de parámetros

	Velocidad de intercambio (L/min)	ID de tubo de transferencia (in)	Volumen externo (L)	Fracción de intercambio (%)	Tiempo de residencia externa (s)	RPM de la bomba	Velocidad de cizallamiento (1/s)	Velocidad de intercambio: Velocidad de perfusión	Tiempo de inversión de la bomba (s)
ATF4	3.5	0.375	0.756	19	71	N/A	716	252	7
TFF	3.5	0.500	0.550	78	12.1	68.5	716	252	60

Las condiciones usadas para ejecutar el biorreactor de perfusión se enumeran en la Tabla 3. Los biorreactores se han mantenido en 40×10^6 células/mL con un volumen de trabajo de 10 L y 2 volumen de reactor/día reemplazo con medio de cultivo CD-CHO. El sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria contenía el mismo filtro y carcasa que ATF4, pero utilizó una bomba peristáltica Watson-Marlow 620 Du con un volumen de altura de bombeo de entre 50 mL a 100 mL como una bomba de recirculación de cultivo para hacer fluir, de manera reversible, el cultivo celular a través del sistema (se muestra en la Figura 5) y un sistema de circuito abierto (antes que un sistema cerrado utilizado en ATF4). La velocidad de perfusión de biorreactor ATF4 ha cambiado de 2 volumen de reactor /día a 1 volumen de reactor/día en el día 20 de cultivo, mientras el sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria ha cambiado de una velocidad de perfusión de 2 volúmenes de reactor/día a 1 volumen de reactor/día en el día 32, y 10% de alimentación eficiente B (Gibco, Invitrogen) también se ha complementado.

Resultados

El sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria ha alcanzado una densidad celular viable de 40×10^6 células/mL en los días 9 y 10, y ha alcanzado una densidad celular de 40×10^6 células/mL antes que el sistema ATF correspondiente (Figura 10). El porcentaje de células viables del sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria ha sido de alrededor de 90% una vez que el cultivo alcanzó 40×10^6 células/mL, y ha continuado reduciéndose hasta estabilizarse en 70% durante tres semanas (Figura 11). La capacitancia del cultivo celular en el sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria se ha elevado en comparación con el cultivo celular en el sistema ATF (Figura 12), y el diámetro de célula viable medio del cultivo celular del sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria y del cultivo celular del sistema ATF han sido similares (Figura 13).

Los perfiles de productividad de los cultivos celulares en el sistema de filtración de circuito abierto provisto en la presente memoria y del cultivo celular del sistema ATF se muestran en la Figura 14, Figura 15, Figura 16 y Figura 17. La concentración de IgG producida por el cultivo celular en el sistema de filtración de circuito abierto provisto en la presente memoria ha aumentado en puntos temporales posteriores en comparación con el sistema ATF (Figura 14). La productividad volumétrica y la productividad específica del cultivo celular en el sistema de filtración de circuito abierto provisto en la presente memoria han aumentado en comparación con el cultivo celular en el sistema ATF (Figura 15 y Figura 16, respectivamente). El coeficiente de tamizado del cultivo celular en el sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria ha permanecido en alrededor del 90% después de tres semanas de cultivo, y ha sido mayor que el coeficiente de tamizado del cultivo celular en el sistema ATF (Figura 17).

Los perfiles de producción de glucosa y lactato de cada sistema probado se muestran en la Figura 18, Figura 19, Figura 20 y Figura 21. La velocidad de consumo de glucosa específica y la velocidad de producción de lactato específica del cultivo celular en el sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria han sido mayores que la velocidad de consumo de glucosa específica y la velocidad de producción de lactato específica del cultivo celular en el sistema ATF (Figura 18 y Figura 19, respectivamente). Además, la velocidad de consumo de glucosa aeróbica específica y el rendimiento de lactato a partir de glucosa han sido más altos en el cultivo celular en el sistema de filtración de circuito abierto probado provisto en la presente memoria que la velocidad de consumo de glucosa aeróbica específica y el rendimiento de lactato a partir de glucosa en el cultivo celular en el sistema ATF (Figura 20 y Figura 21, respectivamente).

Dichos datos han indicado que los sistemas de filtración de circuito abierto provistos en la presente memoria proveen un cultivo celular con propiedades de cultivo celular mejoradas o comparables como, por ejemplo, capacitancia aumentada o comparable, productividad volumétrica y específica aumentadas o comparables, coeficiente de tamizado aumentado o comparable, y consumo de glucosa específico aumentado o comparable en comparación con otro sistema de filtración tangencial de circuito cerrado (sistema ATF™ de Refine Technology).

Ejemplo 2. Densidad Celular Viable Observada en Sistemas de Filtración de Circuito Abierto

Se lleva a cabo un experimento para determinar las densidades celulares viables más altas logradas mediante el uso de un sistema de filtración de circuito abierto provisto en la presente memoria y, de manera opcional, mediante comparación de las densidades celulares viables determinadas con las densidades celulares viables logradas mediante el uso de ATF™ (Refine Technology) (un sistema de filtración tangencial de flujo alterno de circuito cerrado), en condiciones similares. El dispositivo a utilizarse en dichos experimentos se representa, en general, en la Figura 5. De manera específica, el recipiente a utilizarse en el sistema de filtración de circuito abierto es un biorreactor Broadly-James 15L, el primer conducto y el segundo conducto son biocompatibles, tubería de transferencia soldable con un diámetro interno de 0,5 pulgadas, la unidad TFF contiene un solo filtro de flujo cruzado tubular (compuesto de fibras de polietersulfona con una longitud de 30 cm y un diámetro interno de 1 mm, y con un tamaño de poro promedio de 0,2 µm, una densidad de fibra de 830 fibras/filtro, y un área de filtración de 0,77 m²), la al menos una bomba es una sola bomba peristáltica Watson-Marlow que puede hacer fluir un fluido en la primera y segunda direcciones de flujo, con un volumen de altura de bombeo de entre 50 mL a 100 mL con tubería GORE Sta-Pure de doble canal que tiene un diámetro interno de 16 mm y un diámetro de pared de 4 mm.

Materiales y Métodos

Un compendio de los parámetros experimentales para determinar las densidades celulares más altas que pueden lograrse mediante el uso de los sistemas de filtración de circuito abierto provistos en la presente memoria (y, de manera opcional, ATF™ de Refine Technology) se muestra en la Tabla 5. Un compendio más detallado de los métodos que se utilizarán en dichos experimentos se provee más abajo.

5

Tabla 5. Parámetros experimentales

Parámetro	Descripción detallada	
	TFF	ATF4
Línea celular	GC2008 clon A61, banco HD "GC2008 A61 HD WAVE,"	45 x 10 ⁷ células/vial
Medios	CD CHO con glutamina	
Biorreactores	Biorreactor Broadly James 15 L	
Volumen de trabajo	10 L	
Inóculo de biorreactor	Cultivo celular de matraz oscilante	
Densidad de inoculación	0,5 - 1x10 ⁶ células/mL	
Densidad celular	Permite que las células continúen creciendo con velocidad de perfusión creciente con el fin de coincidir con CSPR de 0,05 nL/célula-d, con ningún sangrado constante o sangrado constante bajo para mantener la densidad celular	
Velocidad de perfusión específica celular (CSPR)	0,05 nL/célula-d	
Temperatura	37°C	
Agitación	120 RPM	
DO	≤ 40%	
Base	1M Na ₂ CO ₃ (carbonato de sodio)	
Antiespumante	Invitrogen Foam Away 3% de simeticona (30.000 PPM)	
	Inventario de trabajo: 3000PPM (diluido en WFI)	
pCO ₂	<120 mmHg, rociado con N ₂ si >120 mmHg	
pH	6,95 ± 0,1	
Adición de gas	Rociado: Oxígeno, CO ₂ (según sea necesario), N ₂ (según sea necesario) Recubrimiento: aire a 100 CCPM	
Rociador O ₂	20 µm sinterizado	
Rociador N ₂	Agujero perforado de 1 mm	
Dispositivo de separación celular	TFF con bomba peristáltica Watson-Marlow 620Du con 620L de altura de bombeo, tubería Gore sta-pure de 16 mm ID filtro ATF4 (0,2 µm)	Refine ATF4
Velocidad de intercambio ATF/TFF	3,5 L/min (65-70 rpm), invertir cada 1 min	3,5 L/min, invertir cada 7 segundos

- Las condiciones a utilizarse para operar el biorreactor de perfusión se enumeran en la Tabla 5. Se permite que las células crezcan en los biorreactores, con un volumen de trabajo de 10-L, y un reemplazo suficiente con un medio de cultivo CD-CHO para mantener la velocidad de perfusión celular específica de 0,05 nL/célula-d. El sistema de filtración de circuito abierto contiene el mismo filtro y carcasa que ATF4, pero utiliza una bomba peristáltica Watson-Marlow 620
- 5 Du con un volumen de altura de bombeo de entre 50 mL a 100 mL como una bomba de recirculación de cultivo para hacer fluir, de manera reversible, el cultivo celular a través del sistema (se muestra en la Figura 5) y un sistema de circuito abierto (antes que un sistema cerrado utilizado en ATF4). La densidad celular viable del cultivo celular se determina una vez al día durante la duración del proceso de cultivo celular ejecutado.

REIVINDICACIONES

1. Un método de procesamiento de un cultivo celular, el método comprendiendo:

(a) proveer un sistema de filtración de circuito abierto que comprende un biorreactor que comprende un cultivo celular, una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) que tiene primera y segunda entradas, un primer conducto en comunicación fluida entre el biorreactor y la primera entrada de la unidad TFF, y un segundo conducto en comunicación fluida entre el biorreactor y la segunda entrada de la unidad TFF, y al menos una bomba dispuesta dentro del sistema para hacer fluir el fluido a través del sistema, en donde el sistema se configura de modo que el fluido puede fluir de manera reversible a través del sistema desde o al biorreactor y a través del primer y segundo conductos y la unidad TFF mediante la al menos una bomba, y el filtrado puede recogerse de la unidad TFF;

5 10 (b) hacer fluir el cultivo celular desde el biorreactor a través del primer y segundo conductos y la unidad TFF en una primera dirección de flujo durante un primer período,

(c) invertir la primera dirección de flujo y hacer fluir el cultivo celular a través del primer y segundo conductos y la unidad TFF en una segunda dirección de flujo durante un segundo período;

15 (d) invertir la segunda dirección de flujo y hacer fluir el cultivo a través del primer y segundo conductos y la unidad TFF en la primera dirección de flujo durante un tercer período;

(e) repetir las etapas (c) - (d) al menos dos veces; y

(f) recoger el filtrado.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la unidad TFF comprende un solo filtro de flujo cruzado, p. ej., un filtro de flujo cruzado tubular.

20 3. El método de la reivindicación 1, en donde la unidad TFF comprende dos o más filtros de flujo cruzado.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema comprende una o más unidades TFF adicionales dispuestas en el primer conducto, el segundo conducto, o ambos, y, de manera opcional, la al menos una bomba se dispone en el sistema entre cualesquiera dos unidades TFF.

5. El método de la reivindicación 1, en donde la al menos una bomba se dispone en:

25 el primer conducto o el segundo conducto, o ambos; o

el biorreactor y proximal al primer o segundo conducto de fluido.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la al menos una bomba es una bomba de turbulencia baja (LTP), p. ej., una bomba peristáltica.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el sistema comprende:

30 una primera y una segunda LTP, en donde la primera LTP hace fluir el cultivo celular en la primera dirección y la segunda LTP hace fluir el cultivo celular en la segunda dirección; o

una sola LTP, donde la única LTP hace fluir el cultivo celular en la primera dirección durante el primer y tercer períodos y hace fluir el cultivo celular en la segunda dirección durante el segundo período.

8. El método de la reivindicación 1, en donde el filtrado no contiene una célula de mamífero.

35 9. El método de la reivindicación 1, en donde el cultivo celular contiene una proteína recombinante secretada, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de aquel, un factor de crecimiento, una citocina, o una enzima, y el filtrado contiene la proteína recombinante secretada.

10. Un sistema de filtración de circuito abierto que comprende (1) un biorreactor, (2) una unidad de filtración de flujo tangencial (TFF) que tiene primera y segunda entradas, (3) un primer conducto en comunicación fluida entre el biorreactor y la primera entrada de la unidad TFF, (4) un segundo conducto en comunicación fluida entre el biorreactor y la segunda entrada de la unidad TFF, y (5) al menos una bomba dispuesta dentro del sistema, en donde el accionamiento de la al menos una bomba hace fluir el fluido de manera reversible a través del sistema desde el biorreactor, a través del primer conducto, la unidad TFF, el segundo conducto y otra vez al recipiente y, de manera opcional, que además comprende (6) un tanque de retención de filtrado y un conducto de filtrado en comunicación fluida entre la unidad TFF y el tanque de retención de filtrado.

40 45 11. El sistema de filtración de circuito abierto de la reivindicación 10, en donde el sistema comprende una o más unidades TFF adicionales dispuestas en el primer conducto, el segundo conducto, o ambos.

12. El sistema de filtración de circuito abierto de la reivindicación 10, en donde la al menos una bomba: se dispone en el primer conducto o en el segundo conducto, o en ambos; o se dispone en el biorreactor y proximal al primer o segundo conducto de fluido.
- 5 13. El sistema de filtración de circuito abierto de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la al menos una bomba es una bomba de turbulencia baja (LTP), p. ej., una bomba peristáltica.
14. El sistema de filtración de circuito abierto de la reivindicación 13, en donde el sistema comprende:
una primera y una segunda LTP, en donde la primera LTP se adapta para hacer fluir el cultivo celular en una primera dirección de flujo y la segunda LTP se adapta para invertir la primera dirección de flujo y hacer fluir el cultivo celular en una segunda dirección de flujo; o
- 10 una sola LTP adaptada para hacer fluir, de manera reversible, el cultivo celular en una primera y segunda direcciones de flujo.
15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tiempo de residencia externa del cultivo celular es de entre 1 segundo y 20 segundos.

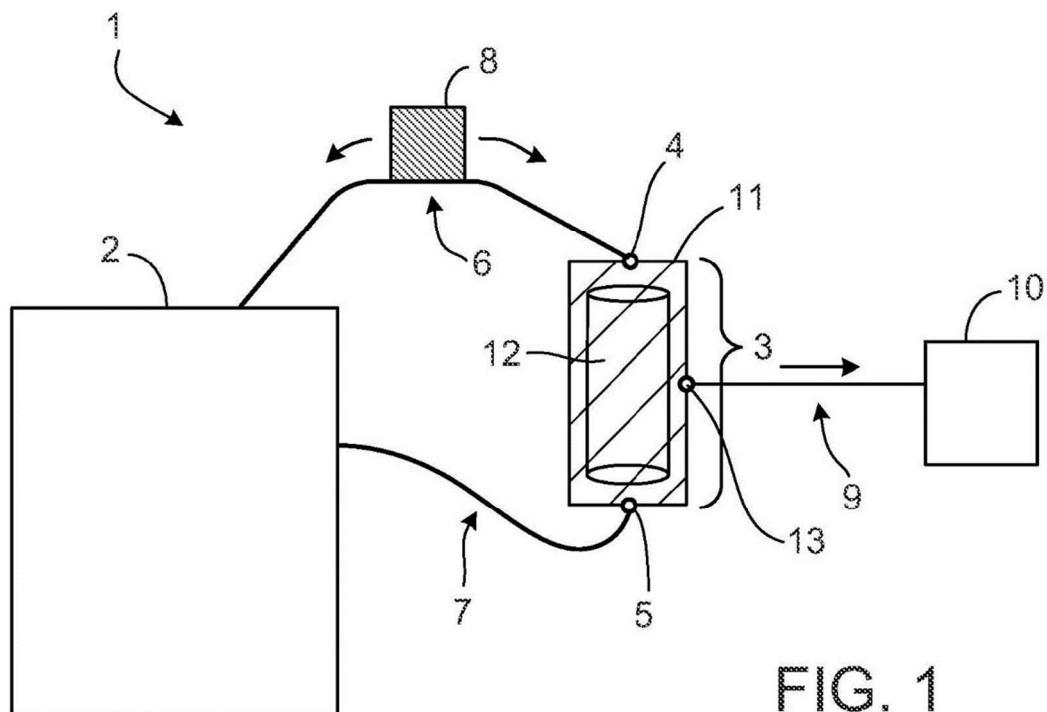


FIG. 1

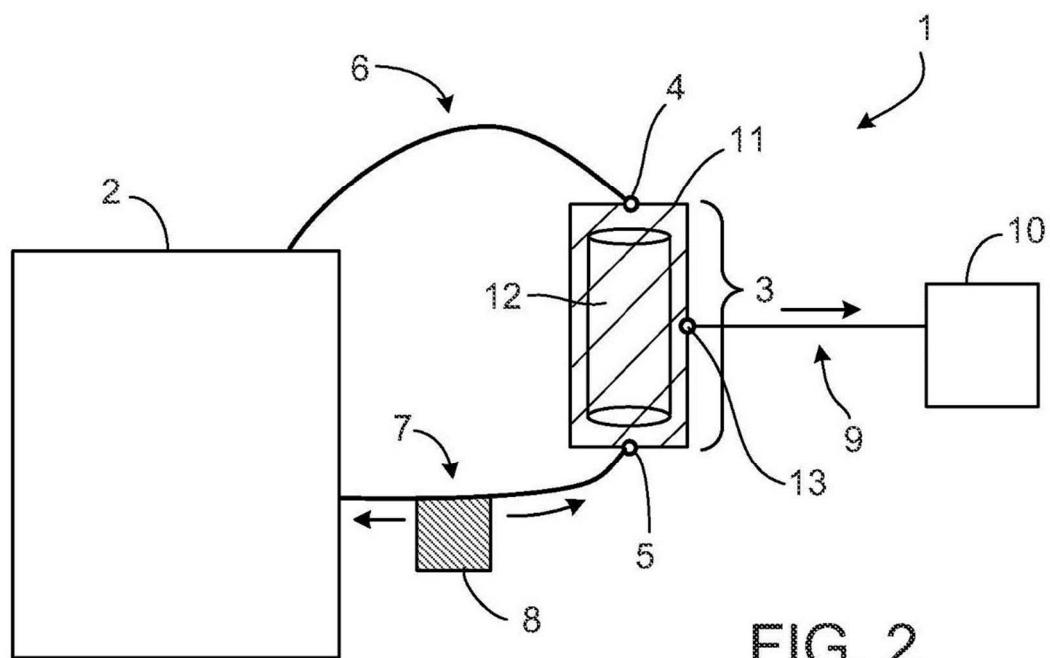


FIG. 2

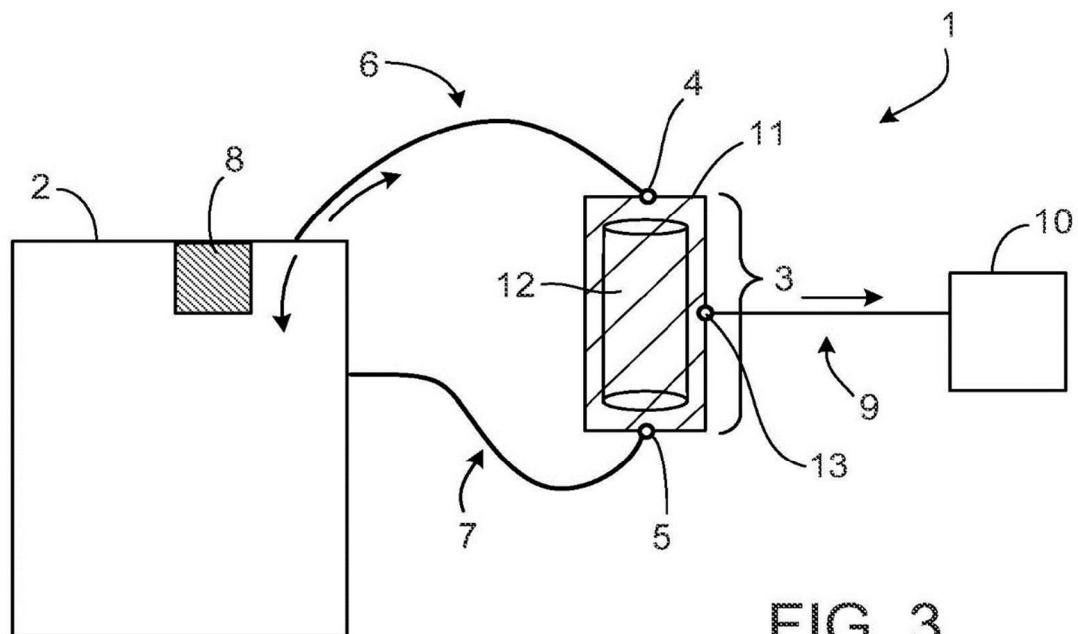


FIG. 3

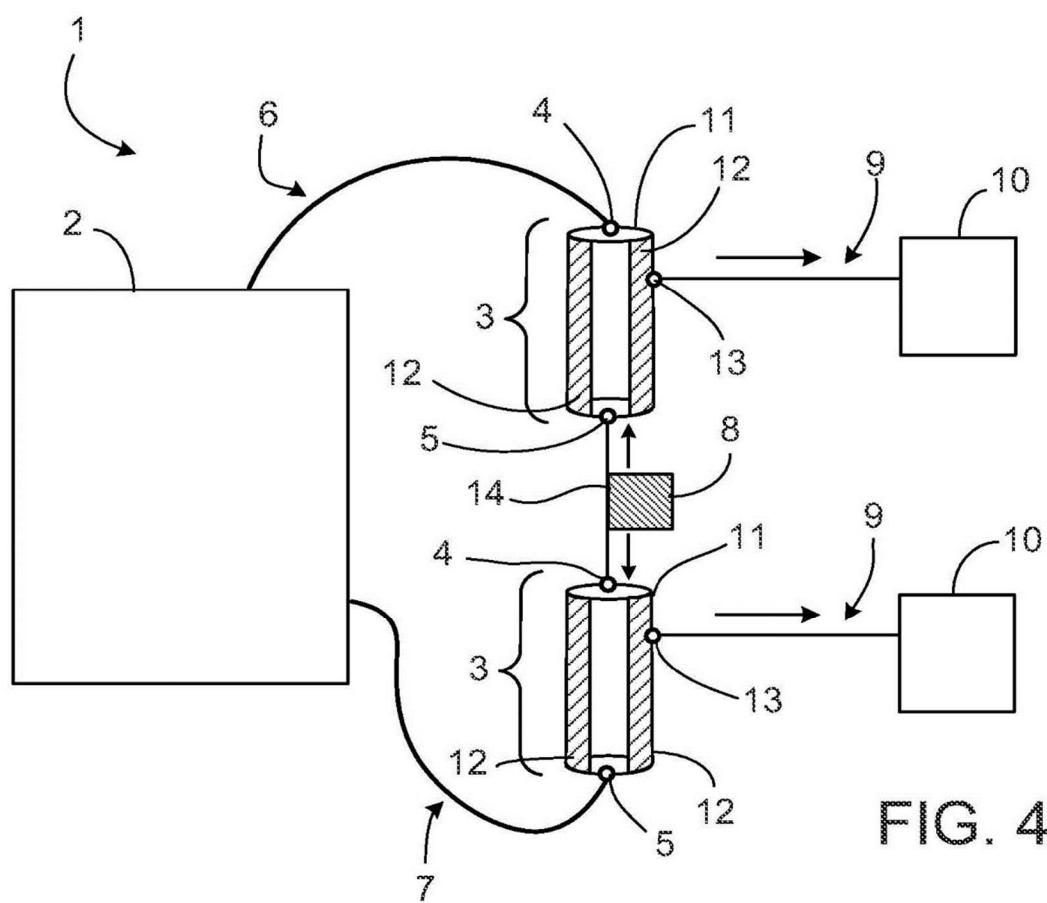


FIG. 4

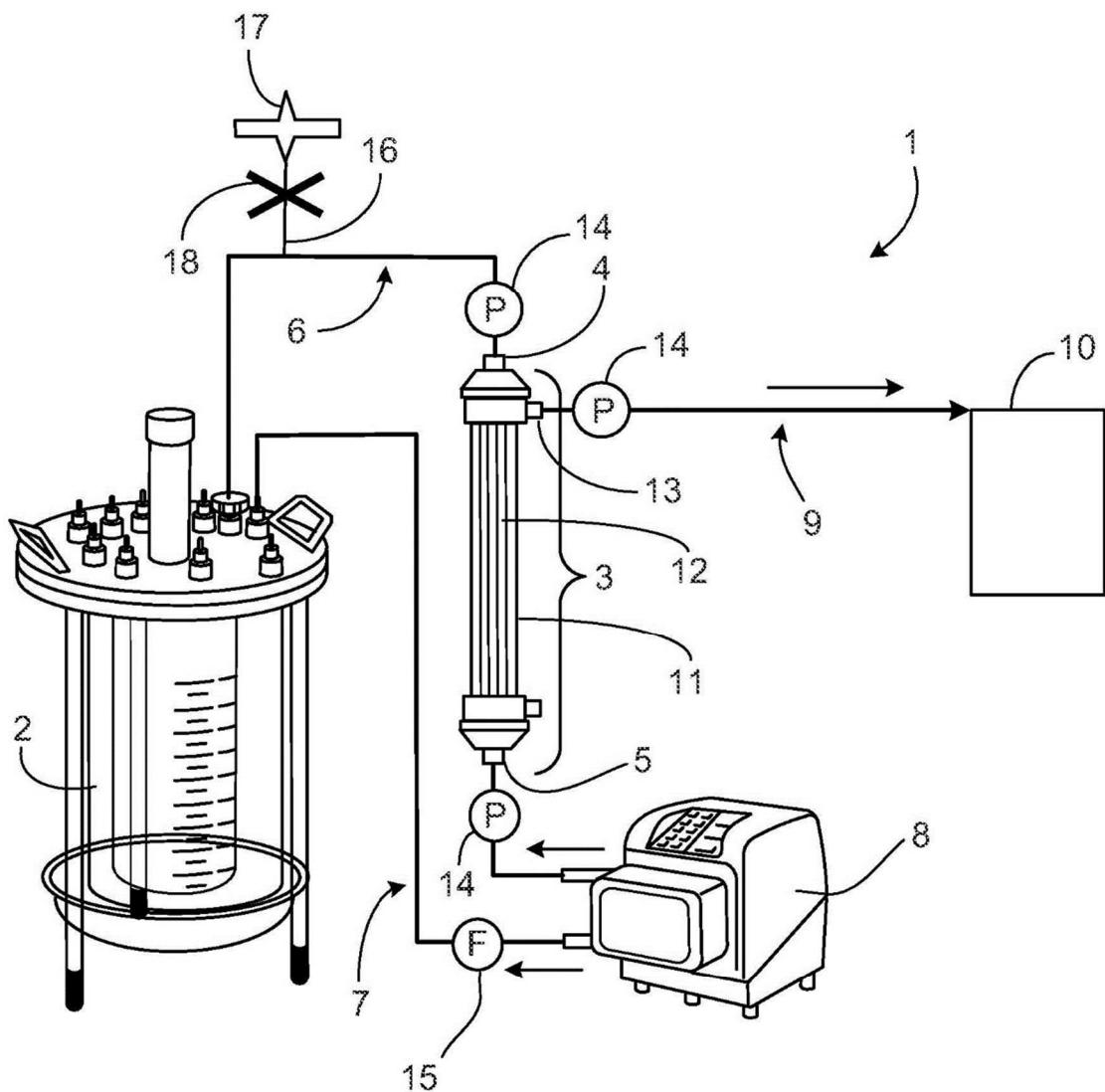


FIG. 5

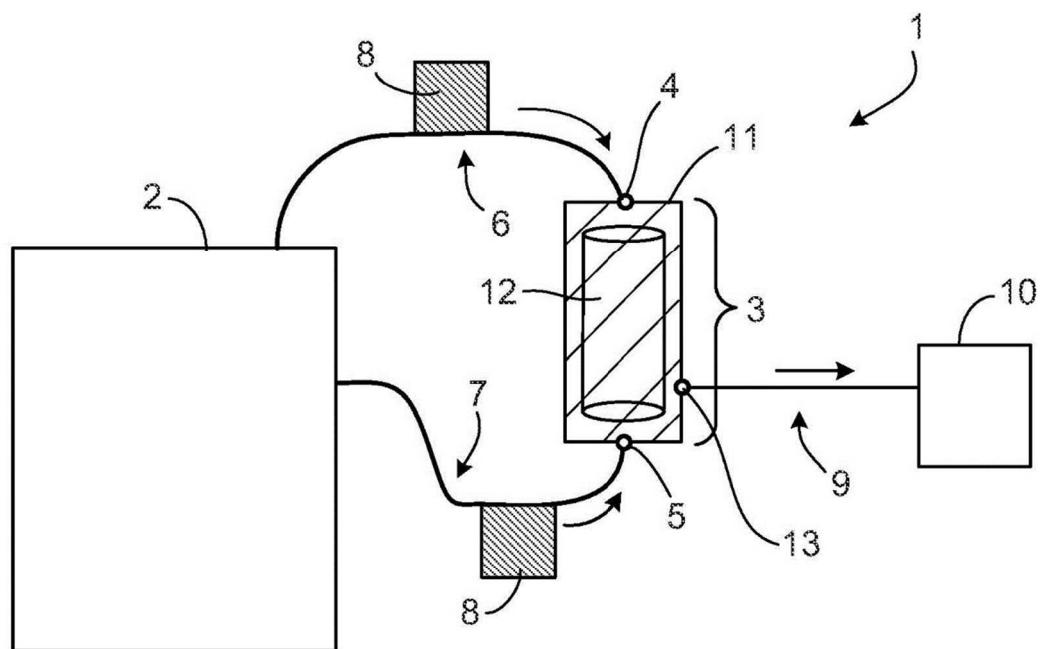


FIG. 6

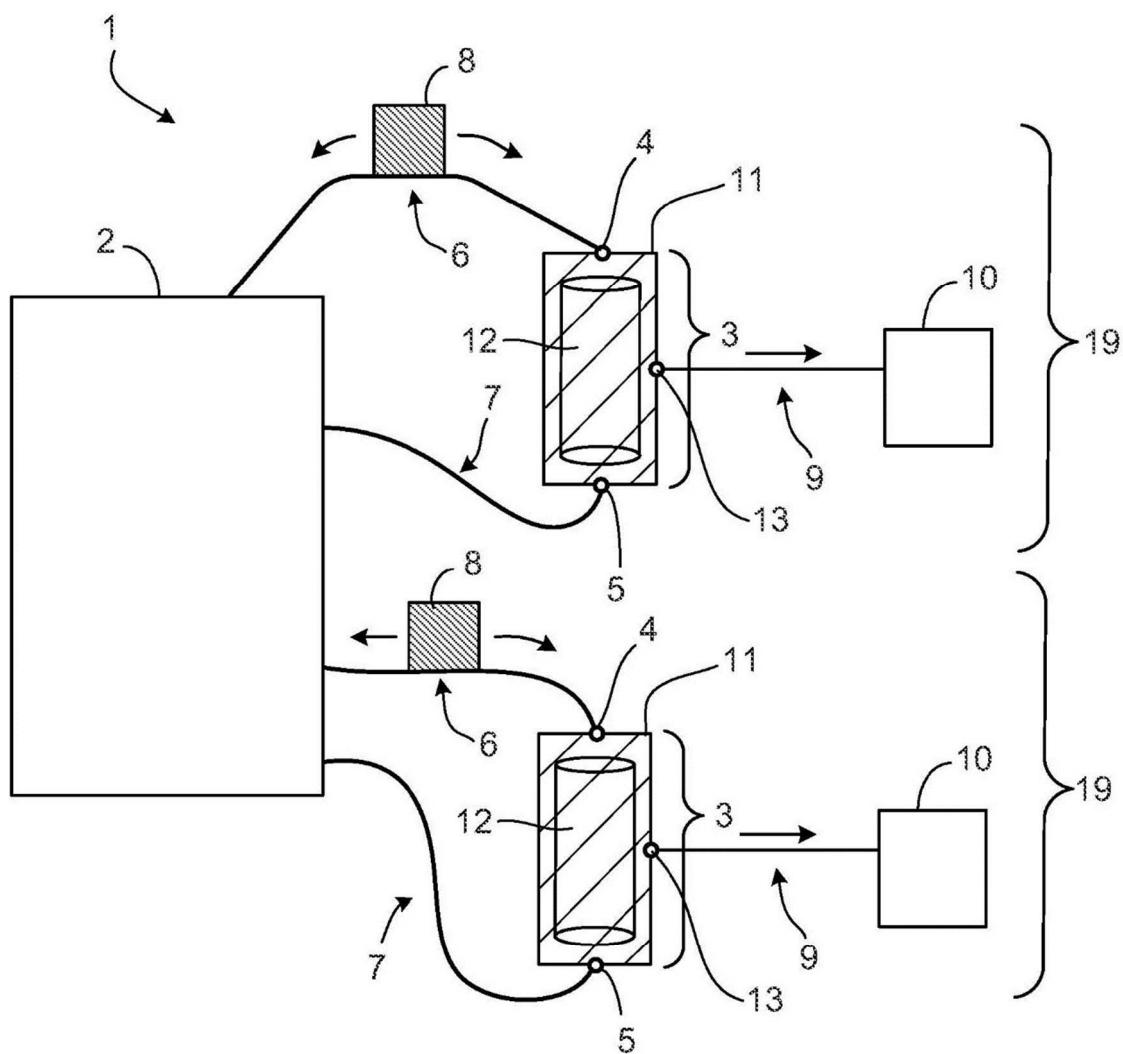


FIG. 7

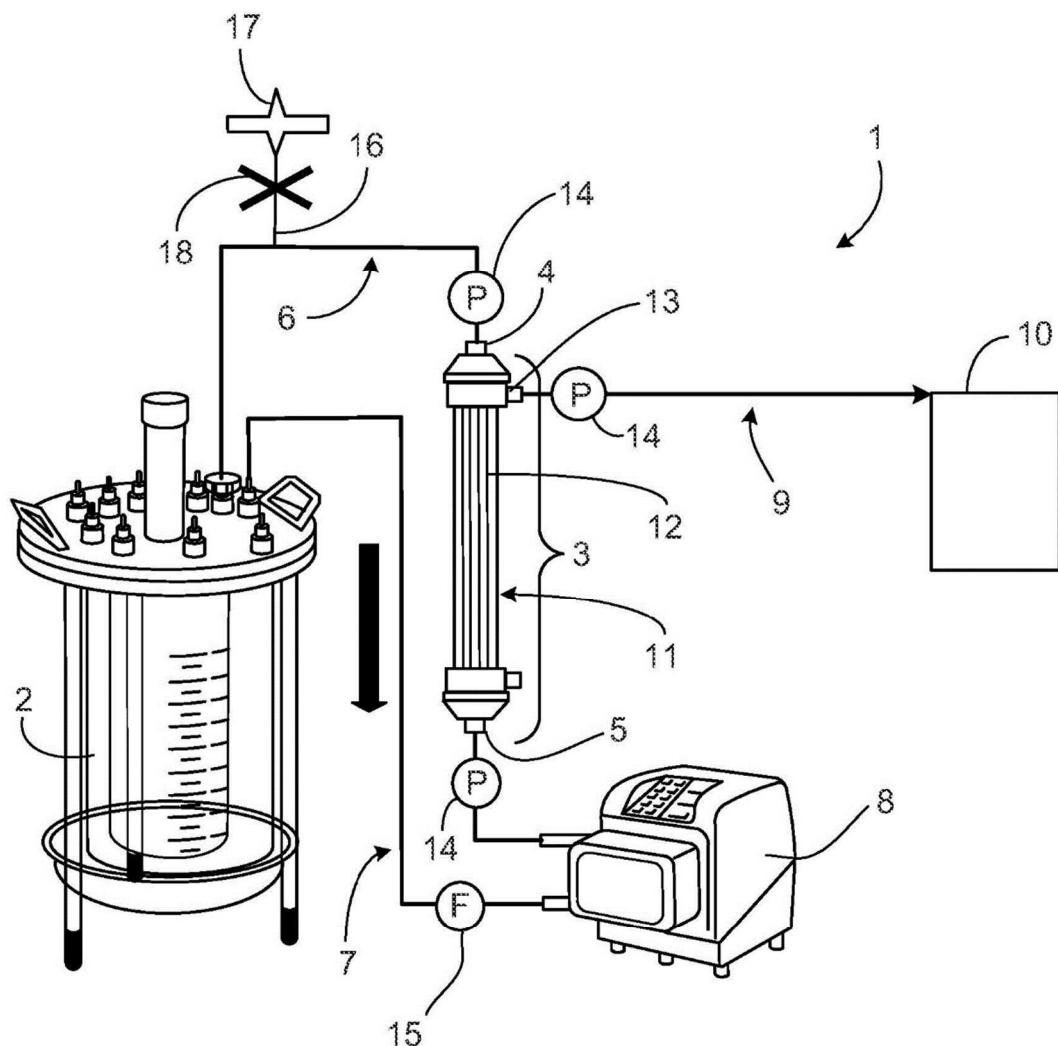


FIG. 8

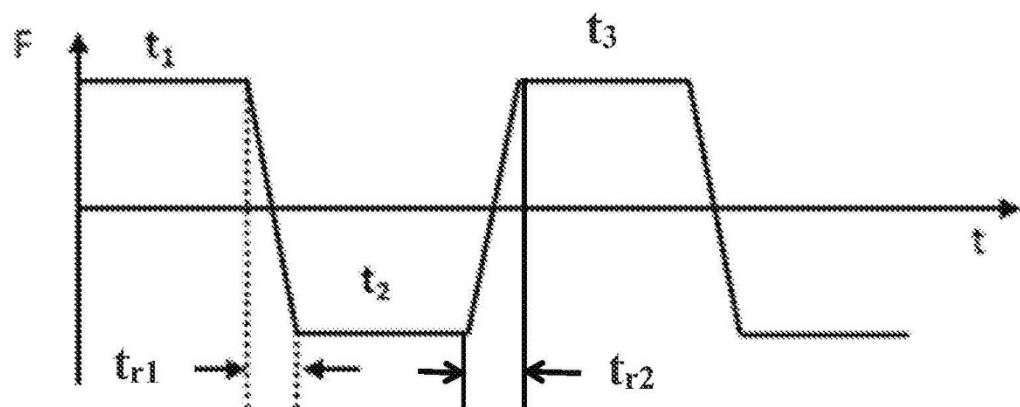


FIG. 9

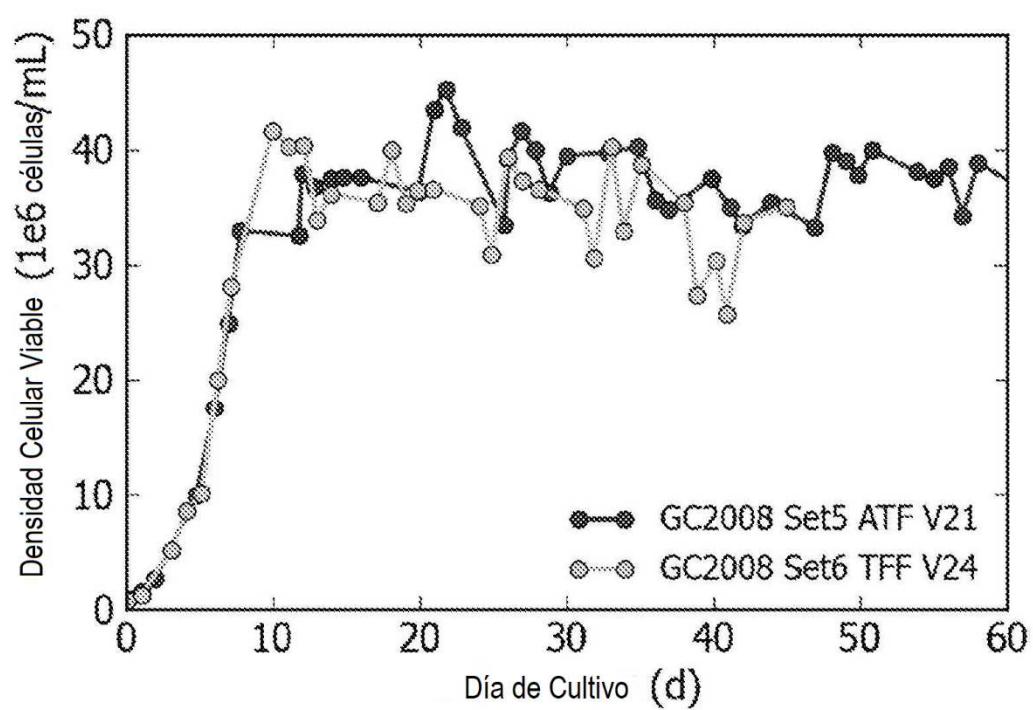


FIG. 10

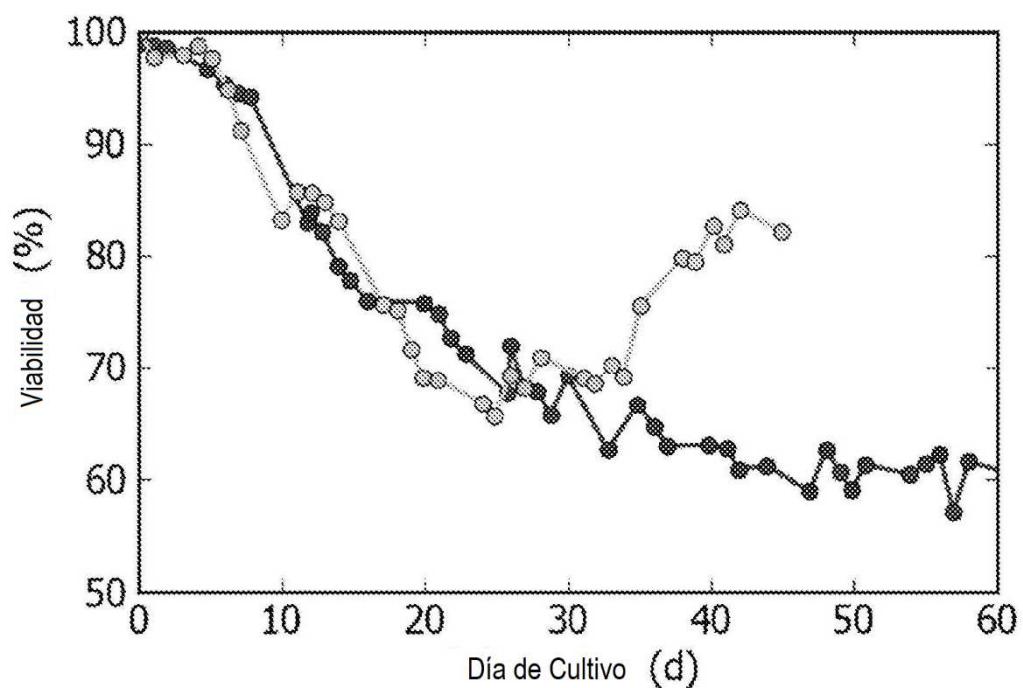


FIG. 11

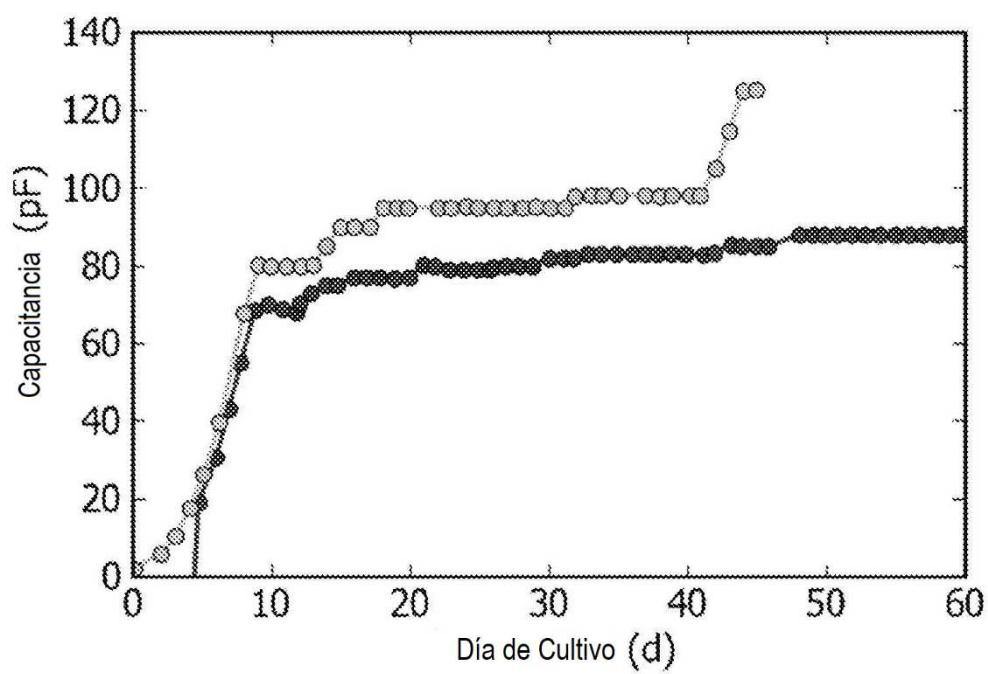


FIG. 12

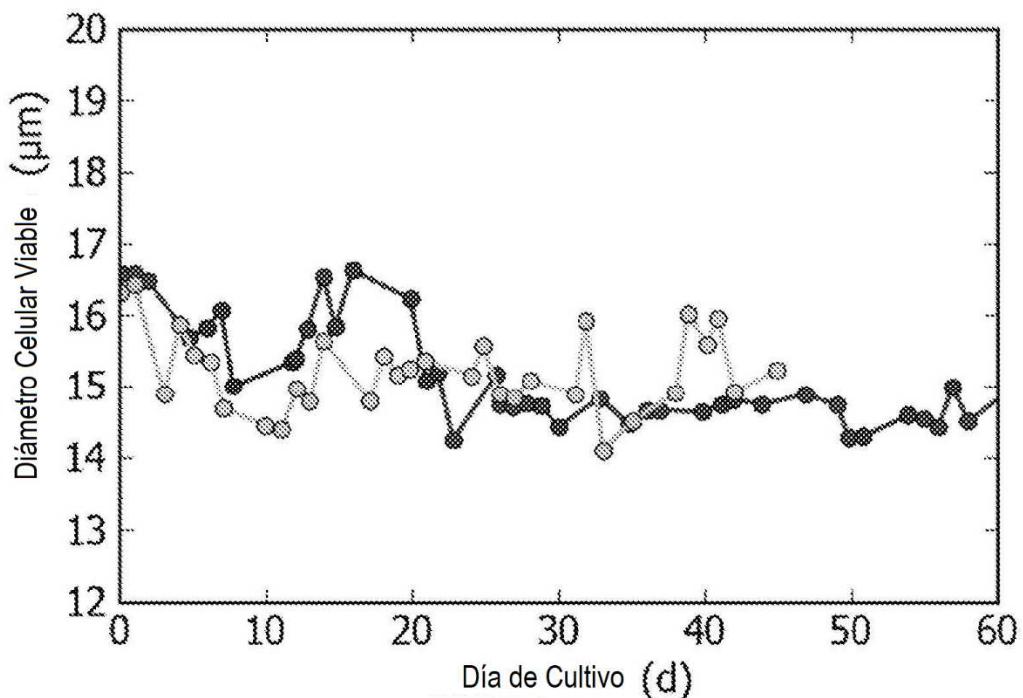


FIG. 13

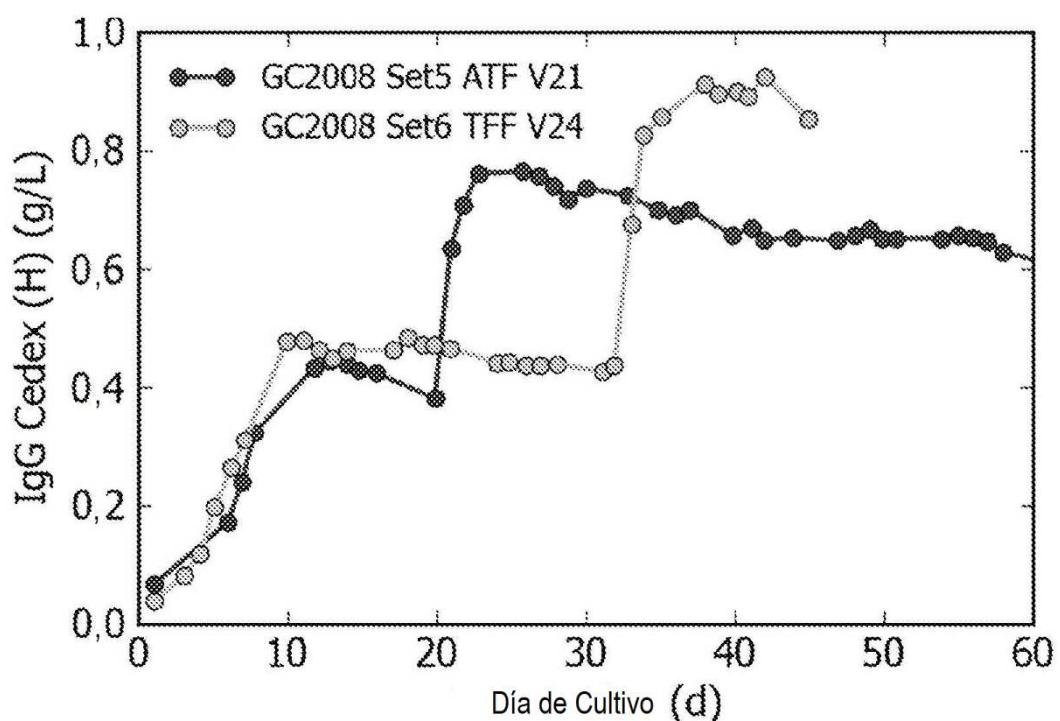


FIG. 14

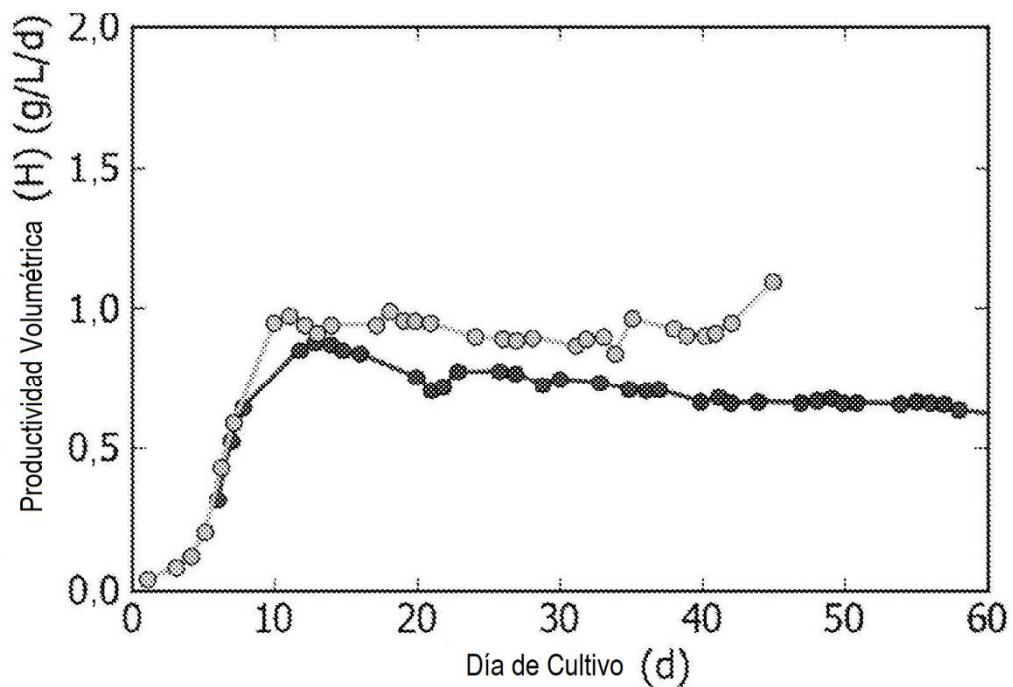


FIG. 15

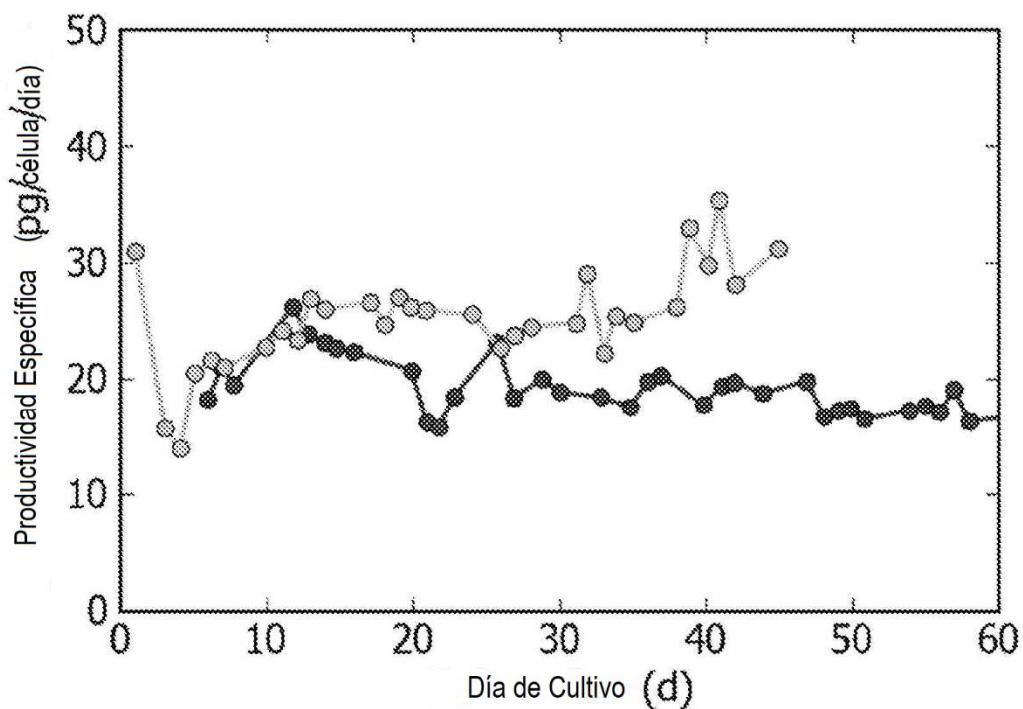


FIG. 16

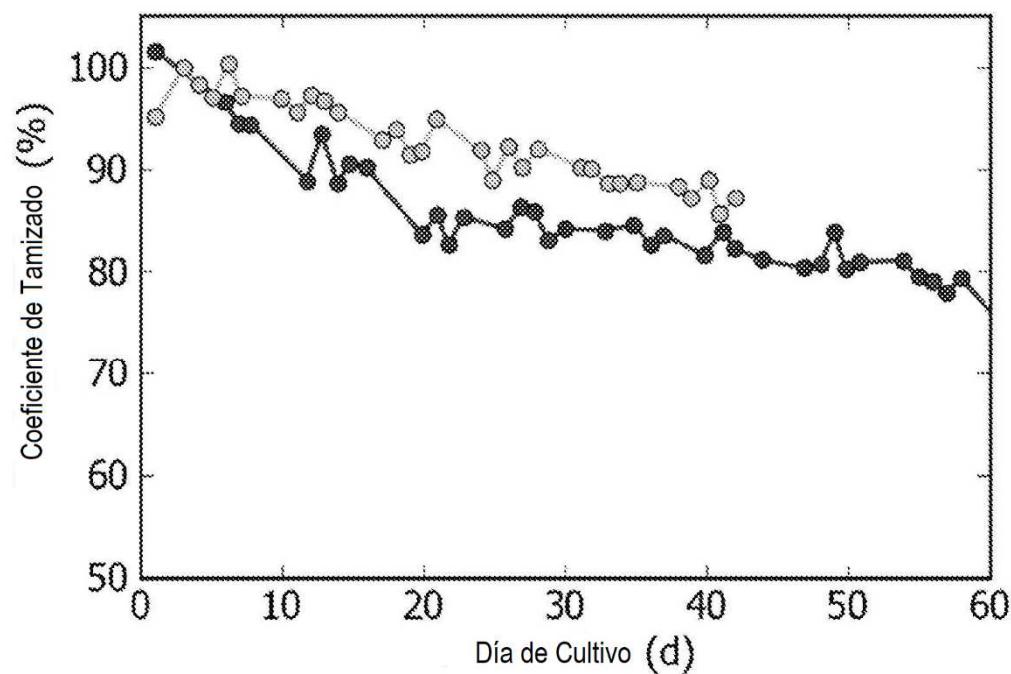


FIG. 17

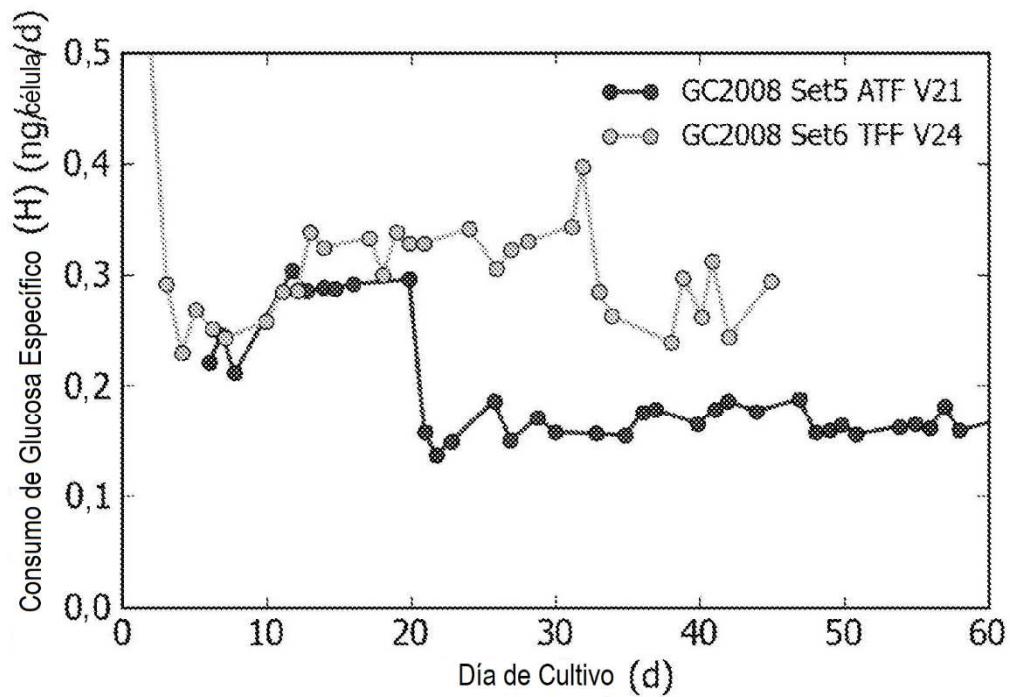


FIG. 18

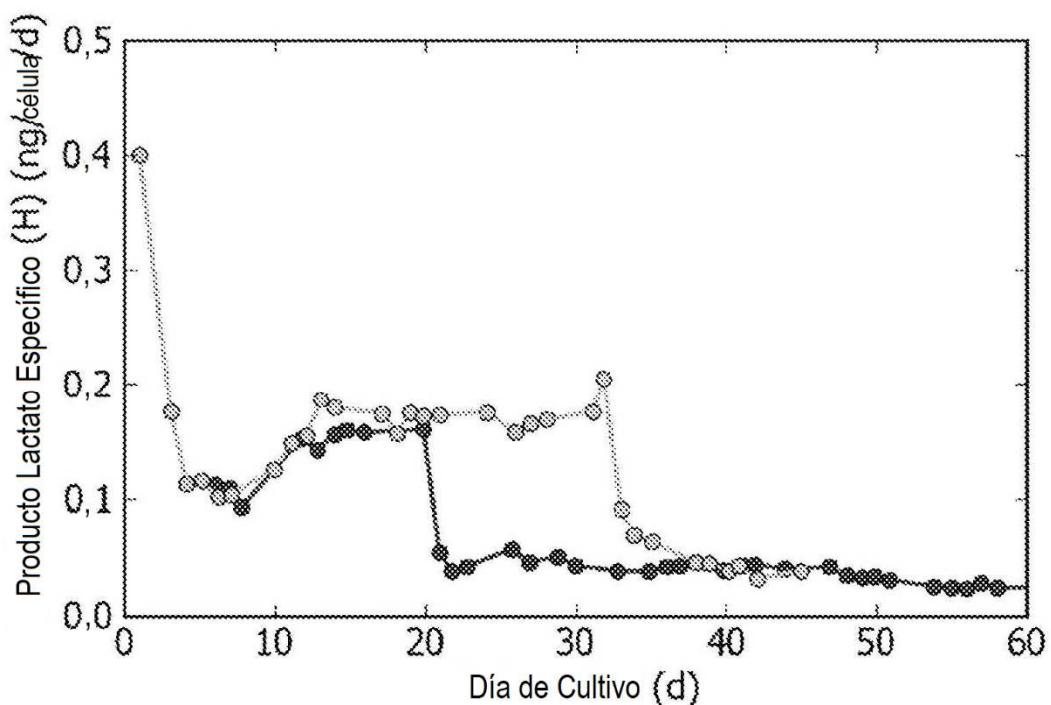


FIG. 19

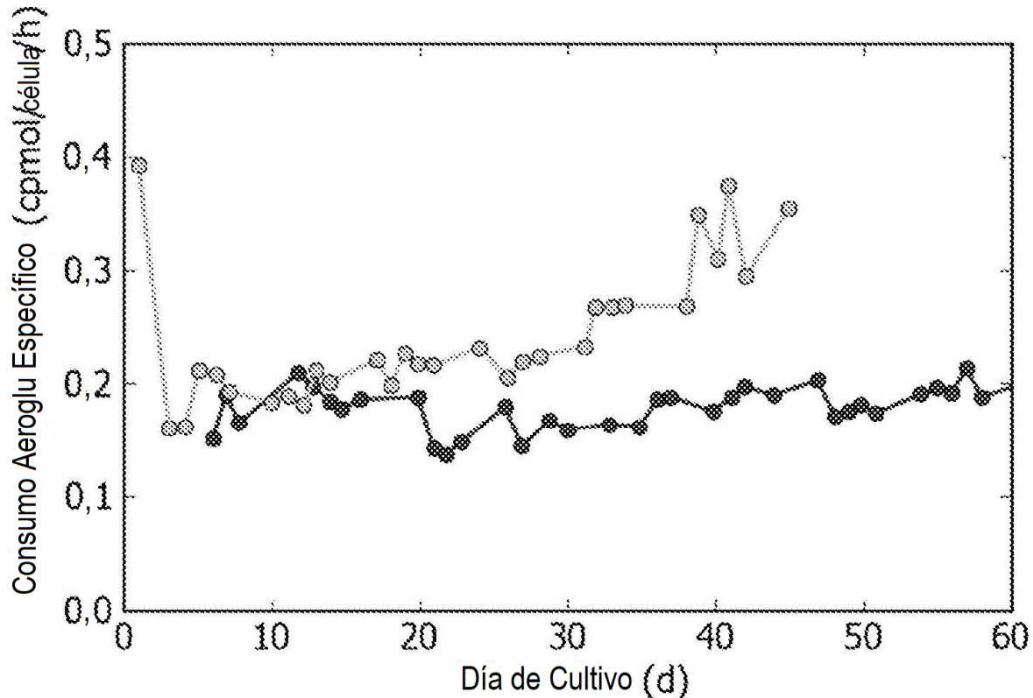


FIG. 20

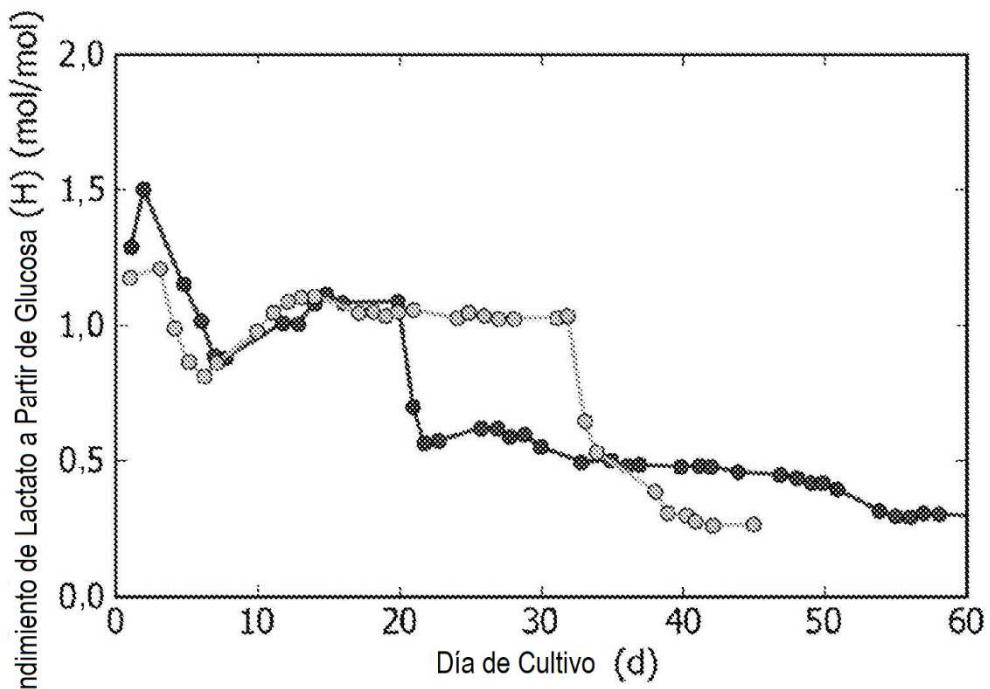


FIG. 21