

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 882**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

B01J 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2015** **PCT/US2015/032108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015** **WO15183716**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2015** **E 15800637 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 3148713**

54 Título: **Construcción automatizada capa por capa por TFF de núcleos multicapa recubiertos**

30 Prioridad:

27.05.2014 US 201462003242 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2025

73 Titular/es:

ARTIFICIAL CELL TECHNOLOGIES, INC.
(100.00%)
5 Science Park, Suite 13
New Haven, CT 06511, US

72 Inventor/es:

BOYD, JAMES GORHAM;
PALATH, NAVEEN y
CARDENAS, EDWIN JONATHAN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 023 882 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

Construcción automatizada capa por capa por TFF de núcleos multicapa recubiertos

5 **Campo técnico**

Esta descripción se refiere a la fabricación capa por capa ("LBL") de productos mediante filtración de flujo tangencial (TFF) o similares. En particular, la presente descripción se refiere a la automatización de tal procedimiento, en sí mismo, y a la escalabilidad de la fabricación de productos, que, en realizaciones ilustrativas, incluye construcciones microparticuladas tales como vacunas microparticuladas.

Antecedentes

En general, la técnica capa por capa es aquella en la que los sustratos que incluyen partículas se recubren con capas, tales como capas alternantes de polielectrolitos. Como se describe en la patente US-7.615.530, las películas multicapa electrostáticas capa por capa proporcionan una plataforma para las composiciones inmunogénicas para su uso como vacunas, por ejemplo. En una película multicapa electrostática capa por capa (LBL), la deposición de polielectrolitos con cargas opuestas sobre una superficie, tal como una partícula, proporciona una estructura multicapa estable. Los epítopos, incluidos los epítopos polipeptídicos, se pueden incorporar en un polielectrolito cargado, tal como un polipéptido, lo que permite la incorporación de un epítipo polipeptídico en la película. Las películas que contienen los epítopos se pueden usar para provocar una respuesta inmunitaria y proporcionar protección contra un objetivo, tal como un patógeno.

El proceso de fabricación electrostática de LBL es inherentemente repetitivo. Consiste en recubrir la superficie de un soporte sólido, tal como micropartículas o nanopartículas, mediante la inmersión del soporte en soluciones de polielectrolitos, tras lo cual se elimina el exceso de polielectrolitos solubles mediante un simple proceso de intercambio de disolvente, tal como diálisis. En general, se ejecutan múltiples ciclos de inmersión/eliminación hasta que se consigue una película capa por capa con propiedades deseables, por ejemplo, con un espesor o una estabilidad suficientes. Pueden utilizarse muchas técnicas para ejecutar etapas de LBL repetitivas, pero la mayoría presentan condiciones indeseables o son difíciles de automatizar. La automatización del proceso de LBL resulta muy preferida porque reemplaza las acciones humanas, que son una fuente bien conocida de variabilidad en el producto. Además, si el producto de LBL está destinado a usarse en seres humanos o animales, se prefiere que el proceso se lleve a cabo en condiciones asépticas para evitar una etapa de esterilización terminal que pueda dañar el producto. En consecuencia, existe la necesidad de herramientas y métodos automatizados para recubrir partículas utilizando la técnica de LBL que puedan producir de manera reproducible y consistente un producto de alta calidad adecuado para su uso en humanos y animales.

En el documento US 2005/084536 A1 se describe un concepto adicional para la preparación de micropartículas recubiertas. Las partículas se forman a partir de un medio líquido que contiene materiales precursores, y las partículas formadas se separan en un circuito cerrado mediante filtración de flujo tangencial (TFF).

Resumen

Los problemas e inconvenientes descritos anteriormente, y otros del estado de la técnica, se superan y alivian mediante la presente construcción capa por capa ("LBL") de un producto mediante filtración de flujo tangencial (TFF) o similares, que incluye la automatización controlada por ordenador de tal procedimiento para la producción de construcciones microparticuladas.

En consecuencia, se proporciona un sistema para la síntesis automatizada de partículas tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los expertos en la técnica apreciarán y entenderán las características y ventajas de la presente descripción a partir de la siguiente descripción detallada y los dibujos.

55 **Breve descripción de los dibujos**

Haciendo referencia a los dibujos ilustrativos en donde los elementos similares están numerados de la misma manera en las Figuras:

60 la Figura 1A ilustra un dibujo esquemático de un sistema de LBL ilustrativo, equipado con un aparato de TFF;

la Figura 1B es un esquema de un bucle circulatorio de TFF;

65 la Figura 2 es un gráfico que muestra concentraciones de PLL ilustrativas en el bucle circulatorio de TFF durante la adición repetitiva de PLL, seguida de ciclos de permeación medidos mediante el ensayo de proteínas Pierce™ de 660 nm;

la Figura 3A muestra mediciones graduales de potencial zeta en micropartículas después del recubrimiento LBL con homopolímeros de PLL y PGA. El patrón de polaridad alternante indica experimentos de LBL exitosos;

5 la Figura 3B muestra una deposición gradual LBL de película ilustrativa, medida mediante análisis de aminoácidos (AAA);

la Figura 3C muestra la dispersión de un lote ilustrativo de partículas de 7 capas, en donde las capas son homopolipéptidos;

10 la Figura 4A muestra una imagen de microscopía de partículas de 8 capas que están bien dispersas;

la Figura 4B muestra una imagen SEM ilustrativa de partículas de 8 capas que incluye una regla de 5,0 μm ;

15 la Figura 4C muestra otra imagen SEM ilustrativa de partículas de 8 capas que incluye una regla de 2,0 μm ;

la Figura 4D muestra mediciones graduales de potencial zeta recolectadas en partículas durante la fabricación de una micropartícula de LBL de 8 capas que tiene un patrón de polaridad alternante observado en experimentos de LBL exitosos;

20 la Figura 4E muestra una deposición gradual de LBL de película ilustrativa durante la fabricación de un lote de micropartículas de LBL de 8 capas, medida mediante AAA;

25 la Figura 4F muestra otra deposición gradual de LBL de película ilustrativa durante la fabricación de un lote de micropartículas de LBL de 8 capas, medida mediante AAA;

la Figura 5 muestra otro sistema de LBL por TFF ilustrativo;

30 la Figura 6 proporciona un esquema de la red de tubos de bucle cerrado a ensamblar y después montar en el sistema ilustrado en la Figura 5;

la Figura 7 es una ilustración de un diagrama de sistema ilustrativo según la presente descripción;

35 la Figura 8 es un diagrama de sistema informático ilustrativo;

la Figura 9 es un medio ilustrativo utilizable por ordenador según las realizaciones ilustrativas descritas en la presente memoria;

40 la Figura 10 es otro sistema de LBL por TFF ilustrativo que emplea bombas separadas para suministrar cada reactivo al bucle de TFF. Las etiquetas de 'apagada' se refieren al paso de flujo hacia adelante cuando las válvulas estranguladoras de 3 vías están en posición apagada;

la Figura 11 es otra red de tubos de bucle cerrado diseñada para montarse en el aparato mostrado en la Figura 10;

45 la Figura 12 muestra las cantidades promedio de PLL, PGA y DP incorporadas en las construcciones de micropartículas usando el método de centrifugación/aspiración/resuspensión manual o el método LBL por TFF;

la Figura 13 es otro sistema de LBL por TFF ilustrativo que se usó para fabricar un lote de micropartículas de LBL de 7 capas de homopolímero a una escala de 100 ml (ordenador no incluido en la figura);

50 la Figura 14 es una fotografía del sistema de LBL por TFF real usado para fabricar un lote de micropartículas de LBL de 7 capas de homopolímero a una escala de 100 ml (ordenador no incluido en la figura). Se muestran bolsas de reactivos solubles;

55 la Figura 15 es un diagrama esquemático de la red de tubos desechables que se pueden ensamblar y esterilizar antes de su montaje en las diversas válvulas y pinzas estranguladoras que se muestran en las Figuras 13 y 14;

la Figura 16A muestra una deposición gradual LBL de película ilustrativa durante la fabricación de un lote de micropartículas de LBL de 7 capas fabricado a escala de 100 ml, medida mediante AAA; y

60 la Figura 16B muestra datos de potencial zeta graduales ilustrativos, medidos en muestras recolectadas durante la fabricación de un lote de micropartículas de LBL de 7 capas preparado a escala de 100 ml.

Descripción detallada

65

La siguiente descripción proporciona detalles adicionales de realizaciones ilustrativas de la presente descripción. Sin embargo, debe entenderse que no se pretende limitar las realizaciones ilustrativas a las formas y detalles particulares descritos, sino que, por el contrario, las realizaciones ilustrativas deben cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que se encuentren dentro del alcance de las realizaciones ilustrativas y las reivindicaciones. Los números

Se entenderá que, aunque los términos primer(o/a) y segundo/a, etc., pueden usarse en la presente memoria para describir diversas etapas o cálculos, estas etapas o cálculos no deben estar limitados por estos términos. Estos términos solo se utilizan para distinguir una etapa o cálculo de otra etapa o cálculo. Por ejemplo, un primer cálculo podría denominarse segundo cálculo y, de manera similar, una segunda etapa podría denominarse primera etapa, sin abandonar el ámbito de esta descripción. Como se usa en la presente memoria, el término “y/o” incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos indicados asociados.

Como se usan en la presente memoria, se pretende que las formas en singular “un”, “una” y “el/la” también incluyan las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entenderá además que los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye” y/o “que incluye”, cuando se usan en la presente memoria, especifican la presencia de características, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes mencionados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos.

También debe observarse que, en algunas implementaciones alternativas, las funciones/acciones indicadas pueden producirse fuera del orden indicado en las Figuras. Por ejemplo, dos Figuras mostradas en sucesión, o etapas ilustradas en cualquier Figura dada, pueden ejecutarse de hecho de manera sustancialmente simultánea o algunas veces pueden ejecutarse en el orden inverso, dependiendo de la funcionalidad/acciones implicadas.

De aquí en adelante, se describen en detalle las realizaciones ilustrativas de la presente descripción.

La construcción capa por capa (“LBL”) es un proceso en el que se produce una película multicapa a partir de capas alternantes de polielectrolitos con cargas opuestas, que incluyen, aunque no de forma limitativa, polipéptidos. Las películas multicapa de polielectrolitos son, por lo tanto, películas delgadas (por ejemplo, con un espesor que va de unos pocos nanómetros a micrómetros) compuestas por capas alternantes de polielectrolitos con cargas opuestas. Dichas películas pueden formarse mediante el ensamblaje capa por capa sobre un sustrato adecuado, tal como un sustrato plano o un núcleo de sustrato. En el autoensamblaje electrostático capa por capa (LBL), la base física de la asociación de polielectrolitos es la atracción electrostática. La acumulación de película es posible porque la polaridad de la densidad de carga superficial de la película se invierte con la deposición de capas sucesivas. El ensamblaje LBL de construcciones microparticuladas que contienen capas polipeptídicas se describe, por ejemplo, en la publicación US-2012/0009254. Si bien los procedimientos ilustrativos de la presente memoria emplean capas polipeptídicas cargadas, pueden emplearse polielectrolitos cargados que no sean polipéptidos.

Según los procedimientos actuales, al ensamblaje LBL se procede mediante la inmersión de un soporte sólido, tal como un núcleo de sustrato, en una solución de polielectrolito. El soporte sólido tiene una carga superficial neta, positiva o negativa, y el polielectrolito tiene una carga neta opuesta a la del soporte sólido. Impulsado por la atracción electrostática, el primer polielectrolito se ensambla sobre la superficie del soporte sólido. Si la superficie adsorbe una cantidad suficiente del primer polielectrolito, la superficie adquiere la polaridad, positiva o negativa, del primer polielectrolito. Cuando se logra esa condición, puede sumergirse el soporte sólido en un segundo polielectrolito, cuya carga neta es opuesta a la del primer polielectrolito. El segundo polielectrolito se ensambla en la superficie del soporte sólido por atracción electrostática y, una vez se ha adsorbido una cantidad suficiente de polielectrolito, la carga superficial neta del soporte sólido se invertirá a su polaridad anterior. Las etapas anteriores se pueden repetir hasta que se construya una película LBL con las propiedades deseadas, por ejemplo, con un grosor o una estabilidad suficientes. La inversión gradual de la polaridad superficial, generalmente denominada potencial superficial o potencial zeta, se puede monitorizar y medir mediante técnicas analíticas tales como la dispersión dinámica de luz (DLS). En la Figura 3A se muestra un gráfico de los potenciales graduales medidos por DLS, en milivoltios (mV), para una construcción de película LBL electrostática típica. La mayoría de las construcciones LBL ilustrativas proporcionadas a continuación tienen 7 u 8 capas de polielectrolito, pero debe entenderse que una construcción puede tener tan solo 2 capas de polielectrolito o hasta 50 o más capas.

Durante el ensamblaje LBL es práctica común usar un exceso de polielectrolito soluble para saturar la superficie del soporte sólido. Antes de que se pueda introducir el siguiente polielectrolito con carga opuesta, debe eliminarse de la solución de inmersión el anterior exceso de polielectrolito. Hay varias formas de realizar esta tarea, incluida la diálisis, la filtración al vacío, la filtración a presión positiva, la centrifugación seguida de aspiración, y otras. Todas estas técnicas presentan diversos inconvenientes que las hacen indeseables para su uso en un proceso de fabricación, especialmente si el producto está destinado a ser utilizado en seres humanos o animales.

En el caso de la diálisis, tendría que colocarse el soporte sólido LBL, por ejemplo micropartículas o nanopartículas, en una bolsa de membrana de diálisis o un casete de diálisis tras cada etapa de recubrimiento LBL. Un proceso de este tipo resultaría engorroso, lento y difícil de realizar a gran escala. También sería difícil lograrlo en condiciones asépticas.

El procesamiento repetitivo LBL en un dispositivo de filtración por membrana se ha descrito en la bibliografía. En este proceso, las suspensiones del núcleo de sustrato, por ejemplo, las suspensiones de micropartículas, se agitan suavemente sobre una membrana filtrante con poros de tamaño pequeño. Se impulsan un tampón y reactivos solubles a través de la membrana mediante presión de vacío, desde abajo, o presión positiva por gas comprimido, desde arriba, mientras las partículas permanecen retenidas en la membrana. El propósito de la agitación es evitar que las partículas formen una capa de torta y mantener las partículas lejos de la membrana, ya que podrían obstruirse los poros de la membrana. Este proceso se puede realizar con una agregación mínima de las partículas, pero cada etapa resulta lenta y tediosa, y es probable que el proceso no sea práctico a mayor escala.

La centrifugación seguida de la aspiración del sobrenadante y la resuspensión en tampón es una técnica de uso común para realizar la LBL en núcleos de sustrato, especialmente en los laboratorios de investigación. Una ventaja de este enfoque es su simplicidad, ya que se puede realizar en tubos de centrífuga en una amplia variedad de centrífugas comúnmente disponibles. Desafortunadamente, la compactación de los núcleos de sustrato durante la centrifugación a menudo conlleva agregación. Además, la ampliación de un proceso de centrifugación generalmente requerirá el procesamiento de múltiples tubos en paralelo. Este procesamiento es engorroso y brinda la oportunidad de contaminación química y biológica.

En resumen, los métodos actualmente disponibles para realizar ciclos repetitivos de LBL en suspensiones de núcleos de sustrato adolecen de uno o más inconvenientes indeseables que incluyen predisposición a la agregación, etapas de intercambio de tampón que requieren mucho tiempo, manipulación y/o transferencia excesivas de las partículas entre etapas, y oportunidades de contaminación. Además, a nuestro entender, los métodos anteriores solo se han realizado manualmente hasta la fecha, y escalarlos y/o automatizarlos resultaría difícil. Esto aumenta la posibilidad de que el operador introduzca variabilidad y errores de operador. Por lo tanto, existe la necesidad de un enfoque escalable para sintetizar partículas LBL en un sistema cerrado con una cantidad mínima de participación directa por parte del operador.

La filtración de flujo tangencial (TFF), también conocida como filtración de flujo transversal, es una técnica establecida para la separación de especies en una mezcla de fluidos en función de las diferencias de tamaño. En la TFF, se hace circular una mezcla a través de una superficie de membrana o a través de un filtro de fibras huecas bajo una ligera presión positiva. En este caso, las expresiones membrana de TFF y filtro de fibras de TFF se usan indistintamente. La membrana contiene poros con un intervalo de tamaños definidos que permiten que el disolvente se mueva a través de los poros en una dirección tangencial al flujo de la mezcla. Las especies solubles o suspendidas que sean mayores que el tamaño de poro, por ejemplo proteínas, partículas o células, serán retenidas. Al reponer continuamente el disolvente que penetra a través de los poros de la membrana, se eliminan de la mezcla las especies o solutos más pequeños que el tamaño de poro de manera eficiente sin cambiar significativamente el volumen de la mezcla. Mediante una selección juiciosa del tamaño de poro, se puede usar TFF para separar los solutos de bajo peso molecular de las proteínas, las proteínas solubles de las células, o los polímeros solubles de las micropartículas y nanopartículas.

Las separaciones de TFF se pueden realizar usando membranas bidimensionales sobre las que se hace pasar la mezcla. Alternativamente, las separaciones se pueden realizar usando filtros de fibra cilíndricos. La mezcla se bombea a través de la superficie interior del cilindro. Con la ayuda de una diferencia de presión, el disolvente pasará a través de los poros de la fibra tangencialmente al flujo de la mezcla, transportando solutos más pequeños, mientras que los solutos o partículas más grandes que el tamaño de poro quedarán retenidos dentro del cilindro. Una ventaja de los filtros de fibra cilíndricos es que se pueden agrupar varias fibras en paralelo, lo que aumenta el área de superficie total del filtro para aumentar la eficiencia de permeación o aumentar la escala. El haz de fibras o su equivalente generalmente está encerrado en una carcasa que incluye una abertura de entrada a través de la cual puede entrar la mezcla en el filtro (21 en la Figura 1), una abertura de salida a través de la cual la fracción retenida puede salir del filtro (23 en la Figura 1), y una abertura de permeado a través de la cual el permeado puede salir de la carcasa (29 en la Figura 1).

Una práctica preferida durante la TFF es recircular continuamente a través del filtro la mezcla que se está filtrando. Una forma conveniente de lograr esto es propulsar la mezcla a través de una trayectoria circulatoria que incluye el filtro. El método de propulsión más común es mediante una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica. La trayectoria puede estar compuesta por tubos, mangueras, tuberías o medios de transporte similares. En la mayoría de los casos, el volumen de la mezcla que se está filtrando supera la capacidad volumétrica del filtro, por lo que en cualquier momento dado solo una fracción de la mezcla ocupará el filtro. La trayectoria también puede incluir un recipiente que proporciona un volumen adicional y cumple otras funciones, tal como se describe con más detalle a continuación. En este caso, el recipiente se denomina depósito o, más específicamente, depósito de partículas. El filtro de TFF y el depósito, junto con los medios de conexión (por ejemplo, tubos), pueden moldearse para que adopten la forma de la trayectoria circulatoria y, en la presente memoria, este conjunto se denomina bucle circulatorio de TFF. En la Figura 1B se muestra un ejemplo de un bucle circulatorio de TFF.

El bucle circulatorio de TFF se puede ampliar con otros elementos. Por ejemplo, una bomba, una válvula, varias válvulas, aberturas, puntos de derivación de trayectoria, básculas, calibradores, incluidos manómetros, y otras piezas, según sea necesario para la aplicación en particular. También puede incluir múltiples filtros de TFF dispuestos en

paralelo o en serie, o múltiples bombas o múltiples depósitos dispuestos en paralelo o en serie. El bucle de TFF, junto con sus diversas ampliaciones, se denomina en la presente memoria aparato de TFF o componente de TFF, y en la Figura 1 se muestra un ejemplo como elemento 12. Como se describirá con más detalle a continuación, la bomba de TFF y una o más válvulas que controlan diversos aspectos del proceso pueden ser externas al bucle circulatorio de TFF, es decir, no entran en contacto directo con la mezcla que pasa a través del bucle.

La fracción de disolvente que pasa a través de los poros de una membrana de TFF, o un filtro de fibras, y sale del bucle circulatorio se denomina permeado. El permeado a menudo transporta los solutos fuera del bucle circulatorio, siempre que sean lo suficientemente pequeños como para pasar a través de los poros de la membrana de TFF. Como se describió anteriormente, las fibras del filtro de TFF normalmente están revestidas de modo que el permeado se acumule dentro de la carcasa y pueda salir a través de una abertura. El flujo de permeado a través de la abertura se puede restringir o detener con una válvula o una pinza. En este caso, una válvula que controla el flujo de permeado que sale de un filtro de TFF se denomina válvula de permeado, y en la Figura 1 se muestra esquemáticamente un ejemplo como elemento 28.

Además del bucle de TFF, el aparato de filtración de flujo tangencial descrito en la presente memoria comprende una válvula de permeado, en donde la válvula de permeado está configurada para realizar selectivamente etapas de permeación mediante control por ordenador.

La permeación es el proceso de eliminación del disolvente en el bucle circulatorio de TFF al pasar a través de los poros de una membrana de TFF. La permeación se produce cuando se abre la válvula de permeado (por ejemplo, la 28 en la Figura 1) y hay un diferencial de presión a través de la membrana de TFF. El diferencial de presión a través de la membrana se denomina presión transmembrana (TMP). La bomba de bucle circulatorio de TFF genera una presión positiva en el lado de luz corriente arriba del filtro y puede ser suficiente para inducir la permeación. Sin embargo, con frecuencia se debe aumentar la presión para generar una velocidad de permeación deseada. Esto se puede lograr introduciendo una constricción en el bucle circulatorio (22 en la Figura 1). Por ejemplo, el estrangulamiento parcial del tubo circulatorio corriente abajo del filtro de TFF (20 en la Figura 1) provocará un aumento de la TMP y un aumento de la velocidad de permeación.

En un aspecto, el componente de filtración de flujo tangencial comprende un dispositivo de medición para medir la cantidad de permeado que pasa a través del filtro durante una etapa particular del ciclo de deposición de polielectrolitos, e informa al ordenador de control acerca de esos datos. Por ejemplo, el control por ordenador puede terminar automáticamente una etapa del ciclo de deposición de polielectrolitos al medir una cantidad de permeado especificada por el usuario. Opcionalmente, la indicación está en forma de una señal procedente de una balanza electrónica que mide continuamente la cantidad de permeado que sale del circuito de filtración de flujo tangencial.

Cuando se abre la válvula de permeado y no se introduce un nuevo tampón de reemplazo, el volumen del sistema disminuye en función de la cantidad de permeado que se elimina. Esto se denomina con frecuencia una etapa de concentración. Cuando se introduce continuamente un nuevo tampón en el sistema durante la permeación, el volumen del sistema permanece casi constante. Esto se denomina con frecuencia una etapa de intercambio de tampón o una etapa de lavado.

La fracción de disolvente, solutos y partículas suspendidas que no atraviesan la membrana de TFF y quedan retenidas en el bucle circulatorio se denomina producto retenido. El producto retenido puede salir del filtro de TFF a través de una abertura, por ejemplo la 23 en la Figura 1, y regresar al depósito desde donde puede recircularse a través del filtro de TFF.

El movimiento continuo de disolvente, solutos o sólidos suspendidos a través de un bucle circulatorio se denomina recirculación. El movimiento es accionado por una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica (por ejemplo, la 18 en la Figura 1). Cuando el disolvente contiene tanto polielectrolitos solubles como un sustrato suspendido, tal como micropartículas, esto también se denomina etapa de recubrimiento LBL o etapa de deposición. La adsorción de un polielectrolito, por ejemplo, un homopolipéptido, en un núcleo de sustrato seguida de la eliminación del exceso de polielectrolito constituye un ciclo de LBL o un ciclo de deposición de polielectrolitos.

El disolvente se define en la presente memoria como el fluido o la mezcla de fluidos que transporta la mezcla de solutos o partículas suspendidas, o células, o combinaciones de estas a través de diversas trayectorias. El disolvente es con frecuencia un tampón acuoso, generalmente con un pH neutro o próximo al mismo. En la presente memoria, los términos disolvente y tampón se usan indistintamente.

Cuando la válvula de permeación de TFF está cerrada, puede recircularse la mezcla, cosa que sucede a menudo, a través de tubos desde el depósito, a través de la bomba, a través del filtro de TFF y de vuelta al depósito, es decir, a través del bucle circulatorio de TFF. En la mayoría de las aplicaciones, el bucle circulatorio también pasa a través de un dispositivo para regular la presión transmembrana. Usando uniones y válvulas, se pueden introducir los reactivos en el bucle circulatorio de manera eficiente y bien controlada. Por ejemplo, pueden suministrarse de este modo soluciones concentradas de polielectrolitos o polipéptidos al bucle circulatorio. Las soluciones de reactivos se dispersan rápidamente por todo el bucle de TFF debido a la dinámica de recirculación, y la agitación mecánica del

depósito puede ayudar a la dispersión. Por lo tanto, el bucle circulatorio es un entorno conveniente y deseable para llevar a cabo etapas químicas en una mezcla, por ejemplo, el recubrimiento de micropartículas con polielectrolitos solubles.

Una característica clave de la TFF es que los solutos y/o partículas dentro del bucle circulatorio se mantienen en movimiento constante si así se desea, y en un volumen controlado y casi constante. En la aplicación específica de la adsorción de polielectrolitos en nanopartículas o micropartículas durante la fabricación LBL, esto resulta ventajoso porque facilita el recubrimiento uniforme de las superficies de las partículas. Además, ayuda a evitar que las partículas se peguen entre sí y formen agregados no deseados. Opcionalmente, el componente de filtración de flujo tangencial comprende un dispositivo de medición de volumen configurado para informar a un ordenador de control acerca de los datos de volumen del bucle circulatorio de TFF. En esta realización, el sistema comprende opcionalmente un ordenador de control configurado para mantener el volumen del bucle de la mezcla dentro del componente de filtración de flujo tangencial dentro de un intervalo establecido mediante la activación de una válvula, o múltiples válvulas, para aumentar el volumen mediante la adición de un reactivo o disminuir el volumen mediante permeación.

Otro aspecto clave de la TFF es que la mezcla que se manipula recircula en un bucle desde un depósito a través de una bomba, a través del filtro de TFF y después de vuelta a un depósito. Si la bomba es externa a la corriente de flujo y no entra en contacto directo con el contenido del bucle, como es el caso, por ejemplo, de las bombas peristálticas, la mezcla está protegida de la contaminación externa, tal como polvo, productos químicos o contaminantes biológicos, tales como partículas de virus, hongos o bacterias. Del mismo modo, si las diversas pinzas y válvulas que controlan la dirección de las mezclas, que modulan la presión transmembrana y liberan el permeado, son externas a la corriente de flujo, como es el caso de las válvulas estranguladoras, también están físicamente separadas del contenido del bucle y la mezcla está protegida de los contaminantes externos. Por lo tanto, el depósito del bucle circulatorio de TFF, el filtro de TFF y los medios de conexión pueden constituir un sistema cerrado donde su contenido está protegido. Si se desea realizar LBL por TFF en condiciones asépticas, p. ej. para fabricar un producto adecuado para su uso en seres humanos o animales, se puede construir un bucle cerrado de este tipo y, a continuación, esterilizarlo mediante tratamiento con calor, radiación o productos químicos. El bucle cerrado estéril se monta después en la bomba de TFF y en las válvulas. La gran ventaja de este enfoque es que, para lograr un entorno aséptico, solo es necesario esterilizar los materiales del bucle, y no el hardware externo.

Como se describirá en mayor detalle a continuación, con el fin de realizar la LBL por TFF, se dispensan uno o más reactivos diversos desde un componente colector de adición de reactivos solubles al bucle circulatorio de TFF utilizando al menos una válvula controlada por ordenador. Los suministros de reactivos se controlan mediante varias válvulas y una o más bombas. Una vez más, si se utilizan válvulas estranguladoras y bombas peristálticas, no entran en contacto directo con los reactivos y los reactivos quedan protegidos de los contaminantes externos. La red de tubos que transportan los reactivos y los diversos recipientes que contienen los reactivos pueden ensamblarse, esterilizarse mediante tratamiento adecuado y, a continuación, montarse en el hardware del colector de adición de reactivos. Una realización principal de la descripción de la presente memoria es que el colector de suministro de reactivos está conectado al componente de TFF. Esta conexión puede ser un simple tubo o manguera que lleve la salida del colector de reactivos hasta una parte del bucle circulatorio de TFF, por ejemplo, el depósito de TFF.

El uso de TFF como plataforma para realizar la LBL parece tener otra ventaja sobre otros enfoques. Por ejemplo, múltiples experimentos han demostrado que la cantidad de homopolipéptidos de PLL y PGA depositados en una película es de entre un 100 y un 250 % mayor con el método TFF que la observada con el método de centrifugación, aspiración y resuspensión manual. La mayor eficacia de la LBL por TFF parece ser un fenómeno general, y se ilustra en el ejemplo 4 y la Figura 12. Es deseable una mayor eficiencia por varias razones. En primer lugar, los polielectrolitos polipeptídicos son caros. Una mayor captura de estos valiosos reactivos en la película significa que la cantidad de péptido que se pierde en el permeado, y que finalmente se descarta, es menor. En segundo lugar, es bien sabido por el trabajo con polielectrolitos no peptídicos que la estabilidad de la película se correlaciona con el grado de deposición de la película, a veces denominado espesor de película. Se prevé que las películas más gruesas tengan una vida útil de almacenamiento más prolongada y otras propiedades de relevancia biológica. Además, una LBL más eficiente significa que se alcanzarán más rápidamente los espesores de película deseados, lo que quizás permita reducir uno o varios ciclos el proceso repetitivo de LBL por TFF. La automatización del proceso de LBL por TFF amplía el impacto de esta ventaja al hacer que la deposición de la película sea más predecible y reproducible.

En una parte relevante, la presente descripción se refiere a la construcción LBL de productos mediante filtración de flujo tangencial (TFF), también conocida como filtración de flujo transversal o similar. En particular, la presente descripción se refiere a la automatización de tal procedimiento, en sí mismo, y a la escalabilidad de la fabricación de productos, que, en realizaciones ilustrativas, incluye construcciones microparticuladas y nanoparticuladas.

Como se describirá más adelante, se dispensan uno o más reactivos diferentes utilizando un control por ordenador, en el bucle de TFF (por ejemplo, el depósito 16 en la Figura 1), según un sistema informático para proporcionar el producto microparticulado deseado. En realizaciones ilustrativas, se usa el proceso de LBL por TFF para preparar una construcción de vacuna con micropartículas de alta calidad, aunque, por supuesto, este es un producto meramente ilustrativo.

Cada ciclo de LBL se lleva a cabo bajo control informático. Si bien se contempla que toda la dispensación de reactivos sea automática, es decir, sin la acción directa del usuario, debe tenerse en cuenta que, si se desea, se puede contemplar alguna intervención del usuario. Por ejemplo, un usuario puede desear pausar el proceso para otro propósito, tal como extraer una muestra para su análisis para garantizar que se haya completado satisfactoriamente una etapa antes de continuar con el proceso.

En la presente descripción, nos referiremos a los procesos, métodos y sistemas como LBL automatizada o semiautomatizada por TFF, lo que significa que una o más etapas están controladas por ordenador.

El componente de filtración de flujo tangencial y dicho componente colector de suministro de reactivos solubles están configurados para realizar la formación automática capa por capa de películas multicapa que contienen una pluralidad de capas de polielectrolitos con cargas opuestas, en donde al menos un ciclo de deposición de polielectrolitos se automatiza al menos parcialmente mediante el control por ordenador de las etapas de permeación por filtración de flujo tangencial y mediante el control por ordenador del suministro de varios reactivos desde dicho componente colector de suministro de reactivos solubles.

Específicamente, un sistema para la síntesis automatizada de partículas, conteniendo las partículas al menos una capa de polielectrolito depositada sobre un núcleo de sustrato, comprende

un componente de filtración de flujo tangencial que comprende un bucle de TFF y una válvula, estando la válvula configurada para realizar selectivamente etapas de permeación mediante control informático, en donde el bucle de TFF comprende un depósito de partículas para los núcleos de sustrato, un filtro de TFF y un medio para conectar el depósito de partículas y el filtro de TFF; y

un componente colector de adición de reactivo soluble, en donde el suministro del reactivo soluble desde el componente colector de suministro de reactivo soluble al componente de filtración de flujo tangencial se controla mediante al menos una válvula controlada por ordenador, en donde el reactivo soluble comprende el polielectrolito.

El aparato incluye dos componentes principales, el bucle circulatorio de TFF y un colector de adición de reactivos solubles. Haciendo referencia ahora a la Figura 1, vemos dicha división, con el bucle de TFF ilustrado generalmente con la referencia 12, y con el colector de suministro de reactivos ilustrado generalmente con la referencia 14.

La válvula de permeado y la válvula controlada por ordenador del componente colector de adición de reactivos solubles están completamente automatizadas. En este caso, una válvula totalmente automatizada es una válvula accionada electrónicamente que se activa, por ejemplo, se abre o se cierra, bajo control informático y sin iniciación por parte del usuario.

Específicamente, en las realizaciones descritas en la presente memoria, haciendo referencia a la Figura 1, un bucle de TFF ilustrativo incluye un depósito 16 de partículas, una bomba 18 de TFF, un filtro 20 de TFF y un regulador 22 de presión TMP, con el bucle regresando a un depósito 16. Una válvula 28 de permeado controla la liberación del permeado desde el filtro de TFF a un receptáculo 26 de desechos. En realizaciones ilustrativas, un ordenador que acompaña a la TFF monitoriza las presiones del filtro y el volumen de permeado, y puede emitir instrucciones selectivamente al dispositivo. Como en la realización ilustrativa ilustrada, el trayecto desde el dispositivo TMP hasta el depósito puede incluir una abertura 24 de muestras.

En un aspecto, el sistema proporciona un paso de flujo continuo para la síntesis de partículas. Opcionalmente, la válvula de permeado, la válvula controlada por ordenador del componente colector de adición de reactivos solubles y las bombas opcionales del sistema son externas al paso de flujo continuo. Es decir, estos componentes no entran en contacto directo con el contenido del bucle circulatorio de TFF ni con ninguno de los reactivos solubles suministrados desde el colector de adición. El paso de flujo continuo está compuesto por el filtro de TFF, el depósito de partículas y los medios de conexión. El paso de flujo continuo comprende opcionalmente segmentos y uniones de tubos, incluyendo uniones de 3 vías que conectan los reactivos al bucle circulatorio de TFF. Los ejemplos de redes de tubos de bucle cerrado que se muestran en la Figura 6, la Figura 11 y la Figura 15 también son ejemplos de pasos de flujo continuo.

En realizaciones ilustrativas, el bucle 12 de TFF se carga con una suspensión de partículas de CaCO_3 que se mantiene en modo recirculatorio constante durante todo el proceso. La turbulencia creada por el flujo de partículas a través del bucle puede ser suficiente para mantener una suspensión bien dispersa. Alternativamente, se puede adicionar agitación mecánica de la suspensión en el depósito de partículas para garantizar una buena dispersión.

El suministro del reactivo soluble desde el componente colector de suministro de reactivos solubles al componente de filtración de flujo tangencial se controla mediante al menos una válvula controlada por ordenador. En la Figura 1, la válvula controlada por ordenador es V5 con la referencia (44). En un aspecto, el componente colector de suministro de reactivos solubles comprende varias válvulas controladas por ordenador para el suministro de varios reactivos. Los diversos reactivos solubles incluyen polielectrolitos con cargas opuestas, por ejemplo. En ciertos aspectos, el

componente colector de suministro de reactivos solubles comprende el suministro controlado por ordenador de un tampón de lavado al receptáculo de desechos, al componente de filtración de flujo tangencial, o a ambos.

Además de la suspensión de micropartículas de CaCO_3 , que puede introducirse manualmente o, en realizaciones ilustrativas, automáticamente antes de las etapas de LBL, los reactivos solubles añadidos durante la TFF gradual a través del componente colector de adición de reactivos solubles pueden ser, por ejemplo, soluciones madre de polielectrolitos concentradas y tampón de lavado.

Hay múltiples maneras en las que pueden propulsarse los reactivos desde el componente colector de reactivos solubles (de manera automatizada parcial o totalmente) hasta el bucle circulatorio de TFF, incluyendo el bombeo, la gravedad, una jeringa o gas comprimido. De estos métodos, el bombeo peristáltico y la gravedad proporcionan una buena compatibilidad con los sistemas estériles de bucle cerrado. En un aspecto, el componente colector de suministro de reactivos solubles comprende al menos una bomba configurada para impulsar el reactivo soluble a través de un trayecto que contiene una o más válvulas activadas por ordenador hasta el depósito de partículas.

Cuando se usan bombas peristálticas para el suministro de reactivos, se pueden usar bombas separadas para cada reactivo o una sola bomba con cabezales de bomba separados o canales separados en un solo cabezal de bomba para cada reactivo. La ventaja de las bombas separadas es que cada una se puede activar independientemente de la otra y las velocidades de las bombas se pueden variar de forma independiente. Las principales desventajas de las bombas separadas son su costo, su tamaño y la necesidad de un control electrónico individual. La principal ventaja de una sola bomba con múltiples cabezales o múltiples canales es que reduce la cantidad de bombas independientes que es necesario adicionar al colector de suministro de reactivos. Esto reduce los costos y el tamaño total del dispositivo, las posibles fuentes de fallas en el proceso, y simplifica el diseño electrónico y los comandos de control por ordenador. En una configuración con múltiples canales, los reactivos se pueden recircular a la velocidad deseada en un bucle y se pueden suministrar al bucle de TFF en el momento y en la cantidad deseados abriendo una o más válvulas estranguladoras durante un período de tiempo fijo. Se puede apreciar que los dos enfoques son intercambiables, y un profesional puede elegir el que mejor se adapte al propósito.

Como ejemplos, se contemplan válvulas estranguladoras activadas eléctricamente, por ejemplo, válvulas de 2 y 3 vías de Cole Parmer, Inc., debido a su simplicidad y adaptabilidad a diferentes tamaños y materiales de tubo. Además, las válvulas estranguladoras no entran en contacto con las soluciones que se mueven a través de los tubos y, como tal, no pueden contaminar el contenido de los tubos. Las válvulas estranguladoras son válvulas excelentes para controlar el suministro o la circulación de volúmenes de aproximadamente 1 ml a 100 L. Las válvulas más grandes con diferentes diseños pueden sustituirse para controlar volúmenes más grandes de aproximadamente 0,1 L a 1000 L, o más. Una válvula de 2 vías alterna entre encendida y apagada, o abierta y cerrada. Por convención, un tubo que pasa por una válvula de 2 vías está estrangulado o cerrado cuando la válvula está apagada, y está abierto o no estrangulado cuando la válvula está encendida. La válvula se enciende mediante el suministro de CC a la misma, y esto se controla fácilmente mediante una placa de relés y, si se desea, un ordenador. Con una válvula de 3 vías, hay una unión en T o Y que divide el tubo en cualquiera de las dos direcciones. Cuando se apaga la válvula, se estrangula y cierra una de las direcciones con un pistón y se abre la otra dirección. Cuando se abre la válvula mediante el suministro de CC, el pistón se mueve, abriendo la primera línea y cerrando la segunda.

En un aspecto, el componente colector de suministro de reactivos solubles comprende un dispositivo de medición de reactivos configurado para indicar el volumen o el peso del reactivo soluble administrado o no administrado. El dispositivo de medición está configurado opcionalmente para transmitir datos a un ordenador con el fin de registrar los tiempos y las cantidades del reactivo soluble suministrado.

Las placas de relés, las fuentes de alimentación y las bombas peristálticas son útiles como ejemplos de colectores de suministro de reactivos. El cableado de las distintas válvulas estranguladoras, para que puedan ser controladas mediante un ordenador, puede ser ensamblado por alguien con conocimientos eléctricos y técnicos razonables utilizando suministros electrónicos habitualmente comercializados. Las válvulas y la alimentación de CC necesarias para hacer funcionar las válvulas están conectadas a una placa de relés multicanal que, a su vez, está conectada a un ordenador mediante un cable USB. El software fácilmente disponible que se comercializa con la placa de relés se utiliza para escribir la secuencia de comandos que se envían a la placa de relés, que enciende o apaga válvulas específicas en las secuencias de tiempo deseadas.

A continuación se describe una posible configuración ilustrativa para el suministro de reactivos:

Para el suministro de los homopolipéptidos (HP) con carga opuesta, el ácido poli-L-glutámico (PGA) (32 en la Figura 1) y la poli-L-lisina (PLL) (34 en la Figura 1), una opción es una bomba peristáltica única con cabezales dobles (36) de bomba. Debido a que los cabezales de bomba están acoplados, ambos funcionan a la misma velocidad y cada cabezal bombea su respectivo reactivo con el caudal deseado (téngase en cuenta que esto es simplemente una realización ilustrativa). Usando dos válvulas de 3 vías para cada reactivo, por ejemplo, el PGA se controla mediante las válvulas V3 y V4 (31 y 33 en la Figura 1), y la PLL se controla mediante las válvulas V1 y V2 (35 y 37 en la Figura 1), se puede hacer funcionar una bomba de cabezales dobles a una sola velocidad durante todo el proceso de TFF.

Antes de comenzar con los ciclos de LBL, las líneas que transportan los HP de PLL y PGA se pueden cebar con soluciones madre de HP. El cebado se realiza mediante instrucciones informáticas que abren y cierran alternativamente las válvulas V1-V5 (31, 33, 35, 37, 44) de 3 vías.

En casos ilustrativos, la mayoría de las veces, el material de HP se recircula a través de un bucle corto alrededor y a través del cabezal de bomba. Cuando se requiere una alícuota de solución de HP para la siguiente etapa de LBL, se cambian las válvulas de 3 vías para ese cabezal de bomba al colector principal y se impulsa un bolo de reactivo al depósito de partículas de bucle de TFF (16 en la Figura 1). Haciendo referencia a la Figura 1, cuando las válvulas V1-V4 (31, 33, 35, 37) están apagadas, las soluciones de las líneas se recirculan a través de los bucles. Cuando se requiere el suministro de una alícuota de solución de PLL al bucle de TFF, se accionan las válvulas V1, V2 y V5 (35, 37, 44) mediante control informático, redirigiendo la solución de PLL para que fluya a través de la salida y hacia el depósito de partículas. Cuando se suministra la cantidad correcta, se apagan las válvulas y la PLL vuelve al modo recirculatorio. Las ventajas de este enfoque incluyen el hecho de que se puede usar una sola bomba de cabezales múltiples que funcione a una velocidad establecida para suministrar hasta cuatro reactivos separados sin necesidad de instrucciones a la bomba desde un ordenador.

Los factores que determinan si la cantidad deseada de reactivo se suministra al bucle recirculatorio son la velocidad de la bomba, el diámetro de los tubos, el período de tiempo durante el cual están abiertas las válvulas necesarias para el suministro, y la longitud del trayecto desde la bomba hasta el bucle circulatorio. Este último factor a menudo se denomina volumen muerto, y debe tenerse en cuenta al desarrollar un método para el suministro de reactivos. En general, los volúmenes muertos se rellenarán o cebarán con tampón de lavado en el momento en que se dirija un reactivo al bucle circulatorio, y se sustituirán por una solución reactiva durante la etapa de adición con la V5 y la V6 (42 y 44 en la Figura 1). Este volumen puede introducirse en el bucle mediante un tampón o desplazarse a un recipiente de desechos, también mediante un tampón. En general, los volúmenes muertos se descargarán al receptáculo de desechos para no diluir innecesariamente el volumen de recirculación, excepto cuando se trate de un reactivo particularmente valioso, tal como un polipéptido sintetizado químicamente. En este caso, puede introducirse en el bucle circulatorio con un tampón activando las válvulas apropiadas. Los volúmenes muertos se pueden minimizar usando tubos de menor longitud o tubos con diámetros pequeños, según sea práctico para una aplicación en particular. En algunos casos, los volúmenes muertos pueden equivaler solo a una pequeña cantidad, por ejemplo, del 1 % al 5 % de la cantidad total suministrada, y a veces pueden ignorarse. Para garantizar que se suministren volúmenes precisos de reactivos, se calibran la velocidad de las bombas y las válvulas. Por lo general, la velocidad de las bombas se elige de modo que se pueda lograr un suministro de HP en un período corto de tiempo, normalmente menos de un minuto. Por ejemplo, si se desea una alícuota de 5,0 ml de PLL, una velocidad de bombeo conveniente puede ser una que suministre 40 ml/min (0,667 ml/seg). A esa velocidad de bombeo, la apertura de las válvulas V1, V2 y V5 (35, 37, 44 en la Figura 1) durante 7,5 segundos suministrará 5,0 ml en el trayecto hacia el depósito. Por supuesto, la cantidad real que llega al depósito puede ser inferior a 5,0 ml debido al volumen muerto a lo largo de ese trayecto. Si el volumen muerto medido fue de 1,0 ml, el tiempo durante el que se abren las válvulas puede aumentarse a 9,0 segundos, de modo que lleguen 5,0 ml al depósito y 1,0 ml permanezca en el trayecto de volumen muerto y, finalmente, se descargue al receptáculo de desechos. O, como se mencionó anteriormente, los volúmenes muertos se pueden minimizar hasta el punto en que sean insignificantes en comparación con el volumen suministrado.

De forma ventajosa, el reactivo soluble (por ejemplo, polielectrolito) se suministra al componente de filtración de flujo tangencial y se mezcla bien de modo que la concentración de polielectrolito sea predecible y reproducible. Durante las pruebas del sistema, se miden opcionalmente los volúmenes reales suministrados para confirmar la cantidad deseada y se ajustan en consecuencia las velocidades de las bombas y/o los tiempos de apertura de las válvulas. En general, es una tarea sencilla calibrar los suministros de polielectrolito con una precisión de $\pm 20\%$ de la cantidad deseada. De hecho, se pueden alcanzar fácilmente precisiones de entre $\pm 10\%$ o incluso $\pm 5\%$. Como se ha descrito anteriormente, el recubrimiento LBL de sustratos con HP, por ejemplo, se realiza a menudo con un exceso de péptido, de modo que el sustrato se satura con HP. En condiciones de saturación, la cantidad de HP depositada durante una etapa de recubrimiento con LBL es relativamente insensible a las fluctuaciones en la concentración de la solución de HP. Por lo tanto, la precisión del suministro de reactivos a menudo no es crítica para la calidad del producto y pueden ser suficientes precisiones de suministro de aproximadamente $\pm 20\%$. Para otras etapas, particularmente aquellas donde la deposición se realiza a concentraciones por debajo de la saturación, puede requerirse un mayor nivel de precisión. En ciertos aspectos, la concentración deseada de polielectrolito, p. ej. polipéptido, es de aproximadamente 0,2 a 2,0 mg/ml.

Si bien lo anterior describe bombas de doble cabezal y bucles recirculatorios, en la presente memoria se contemplan otras realizaciones, por ejemplo, bombas individuales para cada reactivo, ausencia de bucles recirculatorios, etc. A escalas de fabricación más grandes, pueden preferirse tales configuraciones. El aspecto clave de cualquiera de los enfoques es que, bajo el control del ordenador, se suministra el reactivo correcto al bucle circulatorio de TFF en el momento deseado y en la cantidad deseada.

El bucle circulatorio de TFF (12 en la Figura 1) está acoplado al colector (14) de suministro de reactivos. Este acoplamiento puede suceder en cualquier parte del bucle y, en esta versión, el acoplamiento se realiza en el depósito (16) de TFF. Un experto en la técnica puede ensamblar el bucle circulatorio de TFF a partir de varios componentes disponibles, o bien puede comprarse el mismo a un proveedor como una unidad completa. Spectrum Labs (Rancho

Dominquez, CA) o Pall Corporation (Port Washington, NY) comercializan sistemas adecuados, y estos sistemas pueden funcionar en un amplio intervalo de escalas. Por ejemplo, el sistema KrosFlo® Research II, comercializado por Spectrum labs, resulta adecuado para básculas de 0,002 a 10 L, mientras que el sistema KrosFlo® Pilot Plus resulta adecuado para básculas de 10 a 5000 L.

Haciendo referencia a la Figura 1, los componentes ilustrativos de un aparato de TFF son la bomba (18) de TFF, un dispositivo de presión transmembrana (TMP, 22), la válvula (28) de permeado y el bucle circulatorio de TFF que incluye el filtro (20) de TFF o membrana filtrante, una salida (29) de permeado y un depósito (16) de partículas. El dispositivo de TMP crea un diferencial de presión entre las superficies interna y externa del filtro de TFF y potencia el flujo de permeado a través de fibras o una membrana filtrantes. La TMP se puede aumentar o disminuir según se desee para aumentar o disminuir el caudal de permeado a través de los poros. El caudal de permeado a menudo se denomina velocidad de flujo, y se mide en términos de unidad de volumen por unidad de área de superficie de filtro por unidad de tiempo. Por ejemplo, una velocidad de flujo de 1,0 litro por metro cuadrado por hora (L/m²/h) o 1,0 LMH significa que un filtro de fibras con una superficie de 1,0 m² producirá 1,0 L de permeado en 1,0 hora.

La abertura de permeado (29 en la Figura 1) y la válvula (28) permiten que el permeado salga del bucle circulatorio de TFF. Cuando la válvula de permeado está cerrada, el contenido del sistema de TFF recircula y el volumen normalmente se mantiene constante. El volumen de recirculación se denomina con frecuencia el producto retenido. También se conoce como volumen de bucle de TFF. Cuando la válvula está abierta, el permeado puede pasar a través de los poros del filtro de fibras de TFF (20 en la Figura 1). Cuando no se añaden reactivos o tampones adicionales al sistema, el volumen total del producto retenido se reduce en función de la cantidad de permeado que sale del sistema. Esto se denomina etapa de concentración y es útil durante la LBL para que el volumen total del sistema, que puede haber aumentado debido a la adición de solución de HP, solución de DP o tampón, vuelva a su nivel deseado.

La bomba de TFF impulsa el producto retenido a través del bucle circulatorio de TFF. Suele ser una bomba peristáltica con velocidad de bombeo ajustable. La velocidad se puede ajustar para lograr un efecto deseado, tal como una mezcla uniforme del producto retenido, o para lograr una velocidad de cizallamiento determinada de la superficie del filtro a fin de minimizar el ensuciamiento. Las bombas peristálticas resultan deseables porque son externas al bucle y no entran en contacto directo con el contenido del bucle y, como tales, son útiles para el procesamiento aséptico. También se pueden usar bombas de jeringa o bombas de pistón, pero dado que entran en contacto directo con el contenido del bucle, generalmente requieren procedimientos especiales de limpieza y esterilización para que sean aptas para el procesamiento aséptico.

El depósito de bucle circulatorio de TFF (16 en la Figura 1) sirve para diversos propósitos. En primer lugar, el volumen del depósito puede ser grande o pequeño, pero a menudo resulta útil que su volumen sea mayor que el volumen del resto del bucle circulatorio de TFF. En estas condiciones, la mayor parte del producto retenido ocupará el depósito en un momento determinado, por lo que es un lugar conveniente para adicionar reactivos, especialmente con el fin de llevar a cabo una etapa química, tal como la fabricación de una película LBL. Si el caudal de la bomba de TFF es suficiente, puede crear suficiente turbulencia en el depósito para mantener su contenido bien mezclado, pero si se desea una mezcla adicional, puede equiparse con un sistema agitador mecánico tal como, por ejemplo, una barra agitadora magnética (por ejemplo, la barra 76 agitadora de la Figura 6), un agitador mecánico aéreo, una mesa agitadora orbital, u otros, para mantener bien mezclado el contenido del depósito. Además, a medida que el resto del bucle de TFF se llena con producto retenido, el depósito puede proporcionar lastre y adaptarse a los aumentos o disminuciones en el volumen del producto retenido que se produzcan durante el procesamiento. Estos cambios de volumen se pueden gestionar de forma activa tal y como se describe a continuación.

Un aspecto clave del recubrimiento automatizado de núcleos de sustrato (por ejemplo, LBL) por TFF es la capacidad de controlar y mantener el volumen de suspensión de partículas que circula a través del bucle de TFF. En general, es deseable mantener este volumen cerca de un nivel constante durante todo el proceso. En la práctica, hay fluctuaciones en los volúmenes totales del bucle circulatorio de TFF. El suministro de una alícuota de solución de HP al bucle de TFF aumenta el volumen total en esa cantidad. En general, no resulta deseable aumentar el volumen de forma acumulativa a lo largo de las etapas de LBL, por lo que se puede optar por restar ese volumen durante una etapa de concentración, por ejemplo, en el extremo frontal de la etapa de permeación posterior. Esto se puede realizar abriendo una válvula de permeado ilustrativa (28 en la Figura 1) mientras la válvula (41) de suministro de tampón de lavado está cerrada hasta que el volumen haya vuelto a su volumen anterior. Las etapas de concentración pueden incorporarse en ciclos LBL automatizados y ejecutarse bajo control informático.

En experimentos ilustrativos, se evitan los ajustes programados del volumen del bucle de TFF porque se ha descubierto que el volumen del bucle se autorregula. En el Ejemplo 3 se describe un ejemplo de esto. Se añadió a un volumen inicial de aproximadamente 20 ml de partículas de CaCO₃ una alícuota de 5,0 ml de solución de PLL. Dado que la adición se realizó mientras la válvula de permeado (28 en la Figura 1) estaba cerrada, el volumen total del producto retenido aumentó a aproximadamente 25 ml. Después de cinco minutos de recirculación, se abre la válvula V7 (28) de permeado y aproximadamente 5 ml de permeado salen del filtro hasta el receptáculo de desechos. La fuerza impulsora de este primer bolo de permeado supone un ligero aumento de la presión provocado por la adición de PLL. Las válvulas de suministro de tampón V5 y V6 (44, 42) se abren entonces para permitir la entrada de tampón. El permeado que sale del sistema crea un pequeño vacío en el depósito de partículas que atrae el tampón hacia

dentro. Mientras el bucle de TFF no esté ventilado, las fluctuaciones temporales de la presión del bucle actúan para regular el volumen del bucle de TFF a aproximadamente 18 a 25 ml por ciclo.

La autorregulación del volumen del bucle de TFF descrita anteriormente puede no ser suficiente a escalas de fabricación más altas. En algunos casos, es posible que sea necesario gestionar activamente el volumen del sistema de TFF mediante etapas de concentración o adición de tampón. La regulación automatizada del volumen de retención puede requerir la monitorización electrónica y la notificación del volumen de retención al control informático. Se pueden usar sensores ópticos o balanzas digitales (por ejemplo, 94 en la Figura 10) para enviar información del volumen del bucle de TFF a un ordenador. Después, el ordenador responde en tiempo real, aumentando o disminuyendo el volumen del producto retenido abriendo y cerrando las válvulas apropiadas hasta alcanzar el intervalo de volumen objetivo. Tal control puede requerir cableado adicional para las rutinas de los sensores y del ordenador, que puede ser proporcionado por un ingeniero eléctrico con experiencia normal en la técnica.

Para la fabricación de productos estériles, es ventajoso que todas las etapas se realicen en un sistema estéril de bucle cerrado para excluir contaminantes químicos y biológicos, tales como bacterias. Durante las etapas de adición de reactivos, las etapas de concentración de suspensión y otras operaciones, el volumen circulatorio en el bucle de TFF puede aumentar o disminuir. En condiciones de sistema cerrado, esto puede crear fluctuaciones en la presión interna del sistema, lo que puede cambiar la dinámica del proceso de TFF de manera indeseable. Estos cambios se revelan durante el desarrollo y las pruebas de los métodos, y pueden gestionarse. Por ejemplo, pueden adicionarse líneas de ventilación al componente de filtración de flujo tangencial y/o al colector de suministro de reactivos solubles, y operarse las mismas con válvulas estranguladoras (46 en la Figura 1). Opcionalmente, los respiraderos están controlados por ordenador. La ventilación puede realizarse con respecto al entorno externo a través de una membrana filtrante estéril o internamente con respecto a un volumen de balasto en forma de diafragma o bolsa plegable, o pueden idearse otros enfoques que protejan el sistema frente a la contaminación. Un ejemplo de respiradero interno es la válvula V10 de la Figura 13, que permite que el exceso de presión escape al recipiente de desechos. Las etapas de ventilación se pueden adicionar a un proceso automatizado en momentos predefinidos cuando se desee. Alternativamente, pueden proporcionarse transductores de presión para enviar retroalimentación en vivo a un ordenador de control, que puede responder y mantener la presión dentro de un intervalo, definido por el usuario, abriendo o cerrando las válvulas de ventilación. En otros casos, las fluctuaciones de presión son deseables y no se requiere ventilación. Por ejemplo, en el sistema autorregulador descrito anteriormente, el permeado que sale del sistema crea un ligero vacío que atrae el tampón de reemplazo al depósito de partículas sin necesidad de bombeo o mediciones. Por lo tanto, la necesidad de una gestión activa de la presión del circuito interno dependerá del alcance y la escala del proceso.

Haciendo referencia nuevamente a la Figura 1, se ilustran a modo de una configuración ilustrativa el colector (14) de suministro y el bucle circulatorio (12) de TFF. En esta realización ilustrativa, ocho válvulas (V1-V8) están controladas por ordenador y operadas mediante un simple código escrito personalizado. Los HP solubles de PGA (32) y de PLL (34) son bombeados por una bomba peristáltica (36) de doble cabezal y recirculan a través de bucles cortos (38, 40) hasta que son solicitados por el ordenador, que activa las válvulas V1-V4 de 3 vías apropiadas (31, 33, 35 y 37). En este caso, el tampón de lavado se suministra por gravedad a través de la válvula V6 (42) al receptáculo de desechos o por succión al depósito de partículas a través de la válvula V5 (44). Como se analizó anteriormente, el DP se puede administrar mediante una jeringa (o automáticamente) durante la etapa final de LBL por una abertura (30) en la línea de entrada. En el bucle de TFF, las partículas pueden recircular de forma continua durante todo el proceso. Las etapas de permeación (lavado) pueden controlarse mediante la válvula V7 (28). Las muestras en suspensión de partículas se pueden recolectar para su análisis, según se desee, durante cada etapa de LBL mediante una jeringa en una abertura (24) de muestras ilustrativa.

A continuación se muestra un proceso ilustrativo:

Ejemplo 1 Precipitación de micropartículas de CaCO_3 para su uso como núcleos de sustrato

Se usó una versión modificada de los métodos de precipitación conocidos en la técnica. Se añadieron 20 ml de CaCl_2 0,33 M a una solución agitada rápidamente de 20 ml de Na_2CO_3 0,33 M, que contenía 1,0 mg/ml de sal sódica de ácido poli-L-glutámico (Sigma-Aldrich, número de catálogo P4636). La mezcla precipitada de micropartículas de CaCO_3 se agitó a 700 rpm durante 40 segundos. Las partículas se examinaron en un microscopio con un aumento de 40x y se observó que en su mayoría eran partículas esféricas de 3-4 μm de diámetro. La suspensión se transfirió a un tubo de centrífuga y se centrifugó a baja velocidad hasta que todas las partículas visibles quedaron granuladas. El sobrenadante se aspiró y las partículas se suspendieron en 20 ml de tampón HEPES 10 mM, pH 7. Las partículas se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se aspiró y después se suspendió nuevamente en 20 ml de tampón HEPES. La suspensión resultante de CaCO_3 al 3 % se usó directamente en un posterior experimento de LBL, o se almacenó a 4 °C y se usó durante varios días. Las micropartículas preparadas mediante este procedimiento contienen PGA como primera capa de HP de LBL, y esto se confirmó midiendo el potencial superficial zeta de las partículas suspendidas en un tampón de pH 7,0 (Figura 3A) y mediante análisis de aminoácidos (Figura 3B). Los valores de potencial zeta típicos son de aproximadamente -15 a -30 mV, medidos en un Zetasizer de Malvern Instruments.

Ejemplo 2: Control semiautomático del suministro de HP de PLL y posterior eliminación del exceso de HP mediante permeación de TFF

Se usó un aparato construido esencialmente como se describe en la Figura 1. Las válvulas estranguladoras se conectaron mediante una placa de relés a una fuente de alimentación de CC. La distribución de la energía a las válvulas se controló mediante un ordenador conectado a la placa de relés. El código se escribió para ejecutar las distintas instrucciones de la válvula. El bucle de TFF consistía principalmente en el sistema de TFF KrosFlo® Research II (Spectrum Labs) equipado con un módulo (20) de filtro de polietersulfona modificada (mPES), MicroKros® de corte de peso molecular (MWCO) de 500 kD, de 20 cm², y la bomba (18) de TFF se ajustó a 40 ml/min. La bomba (36) de doble cabezal con colector de suministro de reactivos se ajustó a 40 ml/min. La duración de la etapa de administración de PLL se estableció en 7,9 segundos o 5,3 ml (5,0 ml suministrados + 0,3 ml para el volumen muerto). Las pruebas fuera de línea mostraron que los suministros reales al depósito (16) de partículas tenían una precisión de $\pm 3\%$. En estas condiciones, la deposición de HP en una película de LBL es independiente de la concentración de HP en el intervalo de 1,0 a 2,0 mg/ml, por lo que este nivel de precisión es suficiente para las etapas de LBL. Se realizó un estudio modelo en donde se cargó el bucle de TFF con 20 ml de suspensión de micropartículas de CaCO₃ al 3 %. La bomba (18) de TFF se ajustó a 40 ml/min y la suspensión se dejó recircular durante 5 min. Las partículas se lavaron con un tampón de permeación (HEPES 10 mM, pH 7,0) abriendo las válvulas V5, V6 y V7 (41, 44, 28) mediante un control informático. El volumen de permeado se midió en una escala digital y las válvulas se cerraron mediante control por ordenador cuando se recolectaron 100 g (100 ml) de permeado. A continuación, el control por ordenador abrió las válvulas V1, V2, V5 (35, 37, 44) durante 7,9 segundos para suministrar una alícuota de 5,0 ml de 12,5 mg/ml de PLL al bucle TFF. Después de cinco minutos, la válvula V7 (28) de permeado se abrió automáticamente para iniciar una etapa de concentración de 120 segundos, devolviendo el volumen del sistema de bucle de TFF a 20 ml. Las válvulas V5 y V6 (42, 44) de entrada de tampón se abrieron automáticamente para comenzar una etapa de permeación y la suspensión se lavó con 100 ml (5 veces el volumen de suspensión) de tampón. Se recolectaron muestras de permeado (0,5 ml) en puntos de volumen de permeación de 1 ml, 50 ml y 100 ml para el ensayo de proteínas. Cuando se recolectaron 100 g de permeado, se cerraron V5, V6, V7. También se recolectó una muestra de 0,5 ml de la suspensión final de partículas, se centrifugó y se aspiró el sobrenadante para el ensayo de proteínas.

Se midió la PLL soluble mediante el ensayo de proteínas Pierce™ de 660 nm, cuyos resultados se muestran en la Figura 2. El permeado inicial [PLL] fue de aproximadamente 0,85 mg/ml. Tras una permeación de 50 ml (2,5 volúmenes de suspensión), la [PLL] soluble disminuyó aproximadamente un 65 % y tras 100 ml (5,0 volúmenes de suspensión) se había eliminado $> 95\%$. Los ciclos repetidos de administración/permeación de PLL arrojaron resultados similares, lo que demuestra que los actuales suministros controlados por ordenador son reproducibles y que la eliminación del exceso de HP está casi completa tras la permeación para 5,0 volúmenes de suspensión.

En la Tabla 1 se presenta una muestra ilustrativa de las etapas controladas por ordenador utilizadas para un ciclo completo de LBL con PLL:

Tabla 1: Operaciones controladas por ordenador para ejecutar un solo ciclo de LBL automatizado por TFF

Etapas	Tiempo de ejecución (segundos)	Duración (segundos)	Función	Instrucción	¿Se ha iniciado indicación de usuario?
1	0,0	8,0	Adicionar PLL	Abrir V1, V2, V5	Sí
2	8,0	0,1	Detener PLL	Cerrar V1, V2, V5	No
3	8,1	300,0	Recirculación		No
4	308,1	120,0	Concentrar	Abrir V7	No
5	428,1	272-1172	Permear	Abrir V5, V6	No
6	700-1600	0,1	Finalizar permeado tras recolectar 100 g	Cerrar V5, V6, V7	Sí

Con respecto a la Tabla 1, los resultados del código informático se expresan para el control de las válvulas para la adición de una capa de PLL. La secuencia comienza con una indicación de usuario al hacer clic en el ratón en la etapa 1. Una posterior indicación de usuario durante la etapa 6, tras haber recolectado 100 g de permeado, finaliza la etapa y el ciclo. Debido a las velocidades de flujo variables y a menudo decrecientes del filtro de TFF, el tiempo de permeación puede variar de aproximadamente 4 minutos a 20 minutos, o, por ejemplo, de 272 segundos a 1172 segundos. En realizaciones ilustrativas, el ordenador puede configurarse para utilizar la retroalimentación del recipiente de recolectada de permeado para iniciar los ciclos posteriores cuando se hayan recolectado 100 g de permeado. Por ejemplo, el recipiente de recolección puede descansar sobre una báscula digital que tenga conexiones de entrada y salida con respecto al ordenador. El ordenador indica a la báscula que se ponga a cero automáticamente durante la etapa 1. Cuando la salida de la báscula al ordenador registra 100 g, el ordenador ejecuta la etapa 6 automáticamente.

El ejemplo anterior demuestra que los suministros de HP controlados por ordenador y las posteriores etapas de permeación funcionan según lo deseado y de manera fiable.

Ejemplo 3: Fabricación semiautomática de micropartículas de LBL de 7 capas de HP

Se preparó un lote de micropartículas de CaCO_3 recubiertas con una película de LBL de siete capas usando el sistema y el método descritos en la presente memoria. Se usó el aparato mostrado en la Figura 1, que funcionó como se describe en el Ejemplo 2. Se llevaron a cabo rondas de LBL de TFF con una indicación de usuario en forma de clic de ratón informático para iniciar cada ronda. El usuario emite la indicación cuando el volumen de permeado para esa etapa alcanza los 100 ml, o 100 g, según lo medido con una báscula digital. Como se ha descrito anteriormente, la duración de cada etapa de permeación es variable, por lo que, a modo de ejemplo, en la Tabla 2 se usaron etapas de permeación de 571,9 segundos. A continuación se detallan los detalles del proceso de fabricación.

Haciendo referencia a la Figura 1, el bucle de TFF estaba equipado con un módulo (20) de filtro de mPES MicroKros® (MWCO) de 500 kD, de 20 cm². Se prepararon soluciones madre de HP de sal sódica de PGA (5,0 mg/ml en tampón HEPES 10 mM. Sigma-Aldrich número de catálogo P4636) y de sal PLL-HBr (6,25 mg/ml en tampón HEPES 10 mM. Sigma-Aldrich número de catálogo P6516), y se colocaron en viales de 50 ml en el colector de suministro de reactivos en las posiciones 32 y 34, respectivamente. La bomba (36) de doble cabezal se ajustó a 40 ml/min. Se cebaron los bucles (38 y 40) con solución de HP haciendo que las válvulas V1 a V4 se abrieran y cerraran bajo control informático, con la válvula V5 (44) abierta al receptáculo de desechos. Se colocaron 20 ml de una suspensión al 3 % (peso/volumen) de micropartículas de CaCO_3 (preparada como se describe en el Ejemplo 1) en el depósito (16) de partículas, y se recircularon en el bucle de TFF a 40 ml/min. Se llevó a cabo LBL automatizada gradual por TFF mediante la ejecución de las etapas que se muestran en la Tabla 2. El operador emitió indicaciones de usuario en la etapa 6 y en la etapa 12 tras alcanzar 100 g de permeado recolectado, con lectura en una balanza digital. Las etapas 1 a 12 se realizaron tres veces para depositar seis nuevas capas de HP en las micropartículas, lo que confirió siete capas de HP en total.

Tabla 2: Operaciones controladas por ordenador para ejecutar dos ciclos de LBL automatizados por TFF.

Etapas	Tiempo de ejecución (segundos)	Duración (segundos)	Función	Instrucción	¿Se ha iniciado indicación de usuario?
1	0,0	8,0	Adicionar PLL	Abrir V1, V2, V5	Sí
2	8,0	0,1	Detener PLL	Cerrar V1, V2, V5	No
3	8,1	300,0	Recirculación		No
4	308,1	120,0	Concentrar	Abrir V7	No
5	428,1	300-1200	Permear	Abrir V5, V6	No
6	1000,0 *	0,1	Finalizar permeado tras recolectar 100 g	Cerrar V5, V6, V7	Sí
7	1000,0	8,0	Adicionar PGA	Abrir V3, V4, V5	No
8	1008,0	0,1	Detener PGA	Cerrar V3, V4, V5	No
9	1008,1	300,0	Recirculación		No
10	1308,1	120,0	Concentrar	Abrir V7	No
11	1428,1	300-1200	Permear	Abrir V5, V6	No
12	2000*	0,1	Finalizar permeado tras recolectar 100 g	Cerrar V5, V6, V7	Sí

Se recolectaron muestras de partículas tras cada etapa de permeación mediante una jeringa en la abertura (24) de muestra para medir el potencial superficial zeta y la deposición de película. Se midieron los potenciales superficiales mediante DLS usando un Zetasizer de Malvern Instruments, y los resultados presentados en la Figura 3A muestran el patrón de polaridad superficial alternante previsto que indica experimentos de LBL exitosos. Se midió la deposición gradual de la película de LBL mediante un análisis de aminoácidos realizado en muestras de partículas secas mediante el siguiente procedimiento.

Se secaron aproximadamente 10 mg de partículas de LBL a alto vacío y se pesaron. Las muestras de partículas se digirieron en 0,30 ml de HCl 6,0 M a 120 °C en viales sellados durante 16 h. El HCl se evaporó al vacío y el desecho se disolvió en tampón de borato para la derivatización de aminoácidos con orto-ftalaldehído (OPA), utilizando los métodos y materiales proporcionados por Agilent Technologies. Las cantidades de cada aminoácido, en este caso glutamato y lisina, se midieron usando un ensayo de HPLC cuantitativo. Los resultados de la Figura 3B muestran un crecimiento robusto de la película, con una acumulación constante de PLL y PGA en cada etapa de la LBL, lo que

demuestra que el proceso semiautomático funciona según lo deseado. Una imagen de microscopía de campo brillante de las partículas de la Figura 3C muestra que el lote de partículas de la capa de 7 HP estaba bien disperso y carecía de grandes agregados.

Con referencia adicional a los ejemplos ilustrados en las Figuras 3A a 3C, se muestra a modo de ejemplo la caracterización de una construcción de micropartículas en capas de 7 HP, realizada mediante LBL automatizada (semi, en este caso) por TFF. Con respecto a la Figura 3A, las mediciones graduales del potencial zeta muestran el patrón previsto de polaridad alternante. La Figura 3B muestra la deposición gradual de la película medida mediante AAA, que indica el éxito de la LBL por TFF. La imagen microscópica de las partículas acabadas que se muestra en la Figura 3C indica que las partículas están bien dispersas con la morfología esférica prevista.

Ejemplo 4: Fabricación semiautomatizada de una construcción de vacuna con micropartículas de LBL

Con todos los datos que indicaban que la LBL automatizada por TFF estaba funcionando bien, se preparó un lote de una construcción de vacuna de micropartículas similar a la descrita anteriormente en la publicación de patente US-20120009254.

El aparato y los procedimientos usados en el Ejemplo 3 se repitieron usando un filtro de TFF de mPes estéril, de MWCO de 500 kD y 20 cm². Tras la aplicación de la séptima capa de HP (PGA) y la posterior etapa de permeación, se añadió un bolo de 12,5 mg de DP en 5,0 ml de tampón al bucle de TFF a través de una abertura de jeringa (24 en la Figura 1). Después de 5 minutos de recirculación, se abrieron las válvulas de permeación V5, V6 y V7 (44, 42, 28 en la Figura 1) mediante control informático y se lavaron las partículas con 100 ml de tampón.

Las partículas se caracterizaron mediante microscopía (Figura 4A) y microscopía electrónica de barrido (SEM, Figuras 4B y 4C). Como antes, se observaron partículas porosas esféricas bien dispersas (véase, por ejemplo, la Figura 4A-C). Las mediciones graduales del potencial superficial realizadas en las muestras de partículas recolectadas al final de cada etapa de permeación mostraron una polaridad de carga alternante indicativa de una LBL exitosa (Figura 4D). La deposición gradual de la película medida mediante AAA de las muestras recolectadas después de cada ciclo de LBL mostró una acumulación constante de HP en la película de LBL (Figura 4E). Los datos de AAA recopilados del producto final determinaron que el DP total adsorbido en este lote ilustrativo fue de 10,8 mg, lo que indica una recuperación del 86 % de DP en la película.

La eficiencia de la formación de la película LBL usando el método de TFF descrito aquí se comparó con la eficiencia del método manual de centrifugación/aspiración/resuspensión. Se prepararon dos lotes adicionales de esta construcción de micropartículas como se describió anteriormente y se midió mediante AAA la cantidad total de HP y DP adsorbida en la película. Del mismo modo, se prepararon seis lotes de una construcción similar usando el método manual descrito en la publicación US-20120009254, y se midió mediante AAA la adsorción total de HP y DP. Se calcularon las cantidades promedio de cada componente (PLL, PGA y DP) como una función de µg de péptido por mg de CaCO₃ seco, y se muestran gráficamente las mismas en la Figura 12. Los resultados muestran que, en promedio, se depositó de 2,5 a 3,5 veces más cantidad de péptido mediante el método de LBL por TFF automatizado.

Se usó un filtro de TFF estéril para esta síntesis por lotes, pero no se tomaron otras precauciones para evitar la posible contaminación por bacterias u otros patógenos. A pesar de la falta de medidas activas para excluir las bacterias del sistema, las mediciones de endotoxinas realizadas en el producto final mediante el ensayo cromogénico Pierce LAL (Thermo Scientific) indicaron 0,04 unidades de endotoxina por µg de DP antigénico. Este nivel está dentro del intervalo aceptable para la inmunización de animales de laboratorio y sugiere claramente que la adopción de precauciones simples, tales como el uso de tampones esterilizados y materias primas aptas para las buenas prácticas de fabricación (GMP), reducirá la endotoxina a niveles aceptables para el uso humano.

Ejemplo 5: Síntesis de micropartículas de LBL con antígeno proteico, citocromo C de paloma

Se usaron el aparato de la Figura 1 y el procedimiento usado en el Ejemplo 4 con los siguientes cambios. En primer lugar, se equipó el bucle de TFF con un filtro de TFF de MPes, de MWCO de 750 kD, de 20 cm². En segundo lugar, se sustituyó la solución madre de DP final por 5,0 ml de una solución de 2,5 mg/ml de citocromo C de paloma (pCC, Sigma, número de catálogo C4011) en HEPES de 10 mM. Este experimento se realizó para demostrar que se pueden incorporar proteínas nativas completas de manera eficiente en las películas LBL. No se realizaron otros cambios significativos con respecto al Ejemplo 4. Se recolectaron muestras de la suspensión de partículas después de cada etapa de permeación y se cuantificó la película de LBL mediante AAA. La Figura 4F muestra la acumulación constante de HP después de cada etapa de LBL, así como la incorporación eficiente de la proteína pCC. El AAA determinó que se capturaron 8,1 mg (66 %) de pCC soluble en la película.

Ejemplo 6: Aparato de TFF para la síntesis automatizada de micropartículas de vacunas estériles

Haciendo referencia a la Figura 5, se realizan varios cambios en el aparato mostrado en la Figura 1. En primer lugar, una bomba peristáltica de cuatro canales reemplaza a la bomba de doble cabezal en el colector de adición de reactivos. Esto permite bombear activamente dos reactivos más, el tampón (52) de lavado y el DP (54) y suministrarlos al bucle

de TFF o descargarlos al recipiente de desechos con un tampón de lavado. En segundo lugar, se añaden válvulas adicionales controladas por ordenador para controlar cuándo se suministran los reactivos y las vías de suministro. En tercer lugar, se colocan las soluciones de reactivos en bolsas intravenosas de plástico que se suspenden en básculas. Las básculas se utilizan para documentar que se retiró el reactivo correcto y la cantidad correcta del mismo a la hora acordada. Los técnicos asistentes pueden guardar registros de los suministros en ordenadores validados, o registrarlos manualmente en formularios en papel.

Las bolsas intravenosas se eligen porque son fáciles de adquirir en forma esterilizada y vienen con productos de soporte que pueden realizar soldaduras de tubo estériles para poder conectar los reactivos al colector sin exposición a posibles contaminantes. Siempre que los tubos y el filtro de TFF sean estériles, las soluciones de reactivos solubles sean estériles, las micropartículas de CaCO_3 iniciales sean estériles y todos los componentes estén conectados correctamente, el producto final será estéril.

En un aspecto, el bucle de filtración de flujo tangencial comprende una red de tubos estériles de bucle cerrado que incluye un filtro de filtración de flujo tangencial y un depósito de partículas, como se muestra en la Figura 1B. La red de tubos de bucle cerrado incluye, por ejemplo, un filtro de TFF y un depósito de partículas, en donde la red se ensambla por separado de la bomba de TFF. La red de tubos con bolsas receptoras y el filtro de TFF están diseñados opcionalmente para ser materiales desechables de un solo uso. La red de tubos de bucle cerrado se esteriliza opcionalmente mediante tratamiento con radiación gamma, óxido de etileno o calor. En un aspecto, la red de tubos de bucle cerrado está configurada para montarse en la bomba de TFF y en al menos una válvula controlada por ordenador, por ejemplo, la válvula de permeado.

En ciertos aspectos, la red de tubos de bucle cerrado se extiende hasta el colector de adición de reactivos solubles y se monta en al menos una válvula controlada por ordenador, con el fin de dispensar un reactivo al circuito de filtración de flujo tangencial. Opcionalmente, la red de tubos de bucle cerrado extendida se ensambla por separado del colector de adición de reactivos, se esteriliza y, posteriormente, se monta en la bomba de TFF, las válvulas de bucle circulatorio de TFF y las válvulas colectoras de adición de reactivos solubles.

La red de tubos estériles de bucle cerrado se construirá con materiales que estén certificados como compatibles para la fabricación de productos biofarmacéuticos para uso humano. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de una red desechable diseñada para un solo uso. Se pueden usar tubos específicos, por ejemplo, tubos Tygon® de 1,58 mm (1/16 pulgadas) de diámetro interior. Los tubos se cortarán a longitudes específicas y se unirán con uniones dentadas de polietileno. Se pueden utilizar pinzas o abrazaderas para sujetar todas las uniones a fin de evitar fugas y garantizar que se mantenga un sistema cerrado. Se puede incorporar un filtro (72) de TFF estéril, por ejemplo, un filtro de mPES de MWCO de 750 kD, de 20 cm^2 , y se pueden tapar todos los extremos de los tubos para excluir los contaminantes antes de la esterilización. La unidad completa se puede envasar, envolver y enviar a una instalación autorizada y acreditada para su esterilización, por ejemplo, mediante irradiación gamma, tratamiento con óxido de etileno o calor. La vida útil estéril de estas unidades tendrá que validarse experimentalmente, pero se prevé una vida útil de más de 12 meses.

Antes de ejecutar una síntesis por lotes de partículas de LBL, se desenvuelve la red y se monta la misma en las distintas válvulas estranguladoras y cabezales de bomba, como se muestra en la Figura 5. Se preparan fuera de línea soluciones madre estériles de, por ejemplo, micropartículas de PLL, PGA, tampón de lavado, polipéptido diseñado y CaCO_3 en bolsas intravenosas. La esterilización de estos reactivos se puede lograr mediante filtración a través de filtros de 0,2 μm , calentamiento u otras técnicas. Las bolsas se empalman a la red de tubos con un instrumento estéril de soldadura de tubos comercial.

Haciendo referencia a la Figura 5, tanto la bomba (50) peristáltica de cabezales múltiples como la bomba (67) de TFF se ajustan a 40 ml/min y todas las básculas se restablecen a 0,0 g. En ese punto, todas las etapas posteriores del proceso se pueden ejecutar de forma remota mediante control por ordenador. No se requiere ninguna interacción directa con el dispositivo hasta que llegue el momento de recolectar el producto final.

La Tabla 3 proporciona un ejemplo de las etapas que se ejecutarían durante la síntesis de un lote de vacuna de micropartículas típico. Como se ha descrito anteriormente, aquí se presenta una construcción de 8 capas con fines ilustrativos, pero el proceso se puede acortar o alargar para preparar construcciones con tan solo 2 capas y hasta 50 o más. El nivel de interacción entre el aparato y el usuario dependerá de si el aparato está equipado con mecanismos de retroalimentación electrónica, tal como se ha descrito anteriormente, o de si ciertas etapas se inician mediante una indicación de continuación por parte del usuario. No hay limitaciones en cuanto al grado de control que puede asignarse al ordenador, pero en la práctica resulta deseable contar con pausas programadas entre las etapas para que el usuario pueda certificar y documentar que las etapas anteriores se han ejecutado según las especificaciones y, si lo desea, recolectar muestras para analizarlas.

Tabla 3

ES 3 023 882 T3

	Etapas	¿Se ha iniciado indicación de usuario?	Función	Válvulas accionadas	Duración (segundos) [volumen]	Pausa (segundos)	Acción del usuario
5							
	Cebarr líneas	Sí	Cebarr línea de tampón	5, 6	8,5	1,5	
		No		5, 6	9,0	4,0	
10		No	Cebarr línea de PLL	1, 2	5,1	1,5	
		No		1, 2	6,0	2,0	
		No	Lavar línea	5, 6	5,0	4,0	
15		No	Cebarr línea de PGA	3, 4	4,0	1,5	
		No		3, 4	5,0	2,0	
20		No	Lavar línea	5, 6	10	30	Inspeccionar líneas
	Cargar/lavar partículas	Sí	Cargar CaCO ₃	14, 9	45	10	
		No	Aclarar	5, 6, 9	5,0	30	Registrar suministro
25		No	Lavar	5, 6	15		
		Sí	Concentrar	12	[20 ml]	30	Registrar volumen
30		Opcional	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
	Recubrimiento LBL de partículas	Sí	Adicionar PLL	1, 2, 9	11,5		Registrar suministro
		No	Recircular		300		
35		No	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
		Opcional	Adicionar PGA	1, 2, 9	11,7		Registrar suministro
		No	Recircular		300		
40		No	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
		Opcional	Adicionar PLL	1, 2, 9	11,5		Registrar suministro
		No	Recircular		300		
45		No	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
		Opcional	Adicionar PGA	1, 2, 9	11,7		Registrar suministro
		No	Recircular		300		
50		No	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
		Opcional	Adicionar PLL	1, 2, 9	11,5		Registrar suministro
		No	Recircular		300		
55		No	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
		Opcional	Adicionar PGA	1, 2, 9	11,7		Registrar suministro
		No	Recircular		300		
60		No	Permear	9, 10, 12	[100 g]		
		Opcional	Adicionar DP	5, 6, 8, 9	5,3		Registrar suministro
65		No	Aclarar	5, 6, 9	2		

	No	Recircular		300		
	No	Permeaar	9, 10, 12	[100 g]		
Recolectar producto	Sí	Vaciar bucle de TFF	13	45		Inspeccionar líneas

Tabla 3: Instrucciones emitidas por ordenador para la ejecución de un lote de vacuna con micropartículas.

Ejemplo 7: Sistema de LBL por TFF automatizado con bombas colectoras de adición de múltiples reactivos

El aparato mostrado en la Figura 5 se reconfigura de modo que todos los reactivos bombeados se impulsen a través de bombas peristálticas separadas, tal como se muestra en la Figura 10. En esta configuración, las bombas son controladas individualmente por el ordenador del sistema. Permanecen en reposo hasta que el ordenador les indique que suministren el reactivo deseado. El ordenador controla tanto la velocidad de las bombas como la duración de cada etapa de suministro. Por ejemplo, para suministrar 25 ml de solución madre de PLL al bucle de TFF, el ordenador abre las válvulas V4 y V7 (95 y 93 en la Figura 10). A continuación, ordena a la bomba 4 (98 en la Figura 10) que bombee a 40 ml/min durante aproximadamente 38 segundos. A continuación, el ordenador detiene la bomba 4 y cierra la V4 y la V7. A continuación, el ordenador lava la solución de PLL residual enviándola hasta el receptáculo de desechos con un tampón de lavado, abriendo la V1 y encendiendo la bomba 1 a 40 ml/min durante 15 segundos. El ordenador también recibe la salida procedente de una báscula electrónica (96) de la que cuelga la bolsa (97) de desechos. Dado que la velocidad de flujo del filtro de fibras de TFF varía, la longitud de cada etapa de permeación está definida por el peso del volumen de permeado recolectado, en lugar de por un tiempo fijo. En la Tabla 4 se muestra un conjunto ilustrativo de órdenes para la fabricación de un lote a escala de 100 ml de una construcción de micropartículas de LBL de 8 capas.

Se monta un sistema estéril de bucle cerrado con un diseño, por ejemplo como el que se muestra en la Figura 11, en el aparato de LBL por TFF mostrado en la Figura 10. El sistema de bucle cerrado está equipado con un depósito de partículas de 300 ml, una bolsa de desechos de 5 L, una bolsa de producto de 500 ml y un filtro estéril de TFF de mPES, de MWCO de 750 kD, de 115 cm². Se prepara un lote de 200 ml de suspensión al 1,5 % de micropartículas de CaCO₃ en condiciones estériles y se recolecta en una bolsa estéril (91) de 300 ml. La bolsa se monta después en una báscula (90) y se suelda de forma estéril al sistema en un sitio (92) de soldadura de tubo. Del mismo modo, se preparan 4 litros de tampón HEPES 10 mM con un pH de 7,0, se filtran de forma estéril a través de una membrana de 0,2 µm, y se recolectan en una bolsa estéril (85) de 4 litros. La bolsa se cuelga de una báscula y se suelda de forma estéril en unos sitios (84) y (86) de tubo. Se preparan 150 ml de solución madre de sal sódica de PGA a 5,0 mg/ml en tampón HEPES y 150 mg/ml de solución madre de sal de HBr de PLL a 6,3 mg/ml en tampón HEPES, se filtran de forma estéril en bolsas estériles, se montan en básculas colgantes y se sueldan tubos estériles al aparato en los sitios (88) y (89), respectivamente. Finalmente, se preparan 40 ml de una solución de 2,5 mg/ml de polipéptido (DP) diseñado en tampón HEPES, se filtran de forma estéril en una bolsa estéril de 100 ml, se montan en una balanza y se sueldan de forma estéril en el sitio (87) de tubo.

La bomba de bucle de TFF se ajusta a 40 ml/min. El depósito de partículas se monta en una placa agitadora magnética y se ajusta para su agitación a una velocidad moderada. A continuación, el usuario solicita al ordenador que ceba las líneas del colector de suministro de reactivos. Tras el cebado, el usuario inspecciona estas líneas para garantizar un cebado adecuado y después solicita al ordenador que suministre las partículas de CaCO₃ al bucle de TFF. El usuario inspecciona el sistema para garantizar un suministro adecuado y, a continuación, solicita al ordenador que inicie un ciclo de concentración y lavado. El sistema está programado para terminar la concentración a 100 g (ml) del permeado recolectado y después para comenzar la permeación de los 400 g recolectados. El usuario inspecciona el bucle de TFF para asegurarse de que se haya alcanzado el volumen deseado de 100 ml (+/- 10 ml) y, a continuación, indica al ordenador que inicie los ciclos repetitivos de LBL. Los suministros de tampón, PGA, PLL y DP se registran mediante retroalimentación digital en el ordenador, y el usuario puede verificarlos visualmente. El usuario tiene la opción de indicar al ordenador que continúe automáticamente con la siguiente etapa de LBL, o bien de hacer una pausa para recopilar muestras y documentación. Después de aproximadamente 2,5 horas, la suspensión final de micropartículas de LBL se suministra automáticamente a una bolsa de producto de 500 ml. Se da un punto de soldadura estéril al tubo que va a la bolsa de producto, y se desconecta el mismo del aparato para su análisis y formulación.

Tabla 4

Etapas	¿Se ha iniciado indicación de usuario?	Función	Válvulas accionadas	Duración (segundos) o volumen [g]	Bomba a 40 ml/min	Duración (segundos)	Acción del usuario

ES 3 023 882 T3

Cebear líneas	Sí	Cebear por gravedad línea de tampón	6	[20]			Inspeccionar líneas
	No	Cebear línea de tampón	1	15	1	12	
	No	Cebear línea de PLL	4	15	4	12	
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Cebear línea de PGA	3	15	3	12	
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Cebear línea de DP	2	10	2	6	
	No	Lavar línea	1	20	1	17	Inspeccionar líneas
Cargar/lavar partículas	Sí	Cargar 200 ml de partículas de CaCO3	5, 7	310	5	305	
	No	Enjuagar hasta depósito	1, 7	22	1	20	Registrar suministro
	Sí	Concentrar	9	[100]			Verificar y registrar el volumen de bucle
	No	Permeear	6, 9	[400]			Registrar
							Volumen
Recubrimiento LBL de partículas	Sí	Adicionar PLL	4, 7	42	4	40	Registrar suministro
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Recircular		300			
	No	Permeear	6, 9	[400]			
	No	Adicionar PGA	3, 7	42	2	40	Registrar suministro
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Recircular		300			
	No	Permeear	6, 9	[400]			
	No	Adicionar PLL	4, 7	42	4	40	Registrar suministro
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Recircular		300			
	No	Permeear	6, 9	[400]			
	No	Adicionar PGA	3, 7	42	3	40	Registrar suministro
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Permeear	6, 9	[400]			
	No	Adicionar PLL	4, 7	42	4	40	Registrar suministro
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Recircular		300			
	No	Permeear	6, 9	[400]			

5 10 15	No	Adicionar PGA	3, 7	42	3	40	Registrar suministro
	No	Lavar línea	1	15	1	12	
	No	Recircular		300			
	No	Permeear	6, 9	[400]			
	No	Adicionar DP	2, 7	42	2	40	Registrar suministro
	No	Enjuagar hasta depósito	1, 7	8	1	5	
	No	Recircular		300			
	No	Permeear	6, 9	[400]			
	Recolectar producto	No	Vaciar bucle de TFF	8	160		Inspeccionar y sellar bolsa de producto

Ejemplo 8: Aparato de TFF para la síntesis automatizada de micropartículas de vacunas estériles a una escala de lote de 100 ml

Se rediseñó el aparato mostrado en la Figura 5 para un sistema más aerodinámico, mostrado esquemáticamente en la Figura 13 y fotográficamente en la Figura 14. Se montaron válvulas estranguladoras de solenoide, activadas eléctricamente, compatibles con tubos de 3,175 mm (1/8 de pulgada) de diámetro interno y 6,35 mm (1/4 de pulgada) de diámetro externo en una placa de clavijas en la disposición mostrada. Las válvulas V1, V2, V3, V4, V10, V11 y V12 son normalmente válvulas estranguladoras de solenoide de dos vías cerradas. Las válvulas V5, V6, V7, V8 y V9 son válvulas estranguladoras de tres vías que tienen una salida abierta y otra cerrada cuando no están encendidas. Mientras están en reposo (sin alimentación), la V5 está cerrada a la V7, la V6 está cerrada a la V8, la V7 está cerrada a la V5, la V8 está cerrada a la V6 y la V9 está cerrada al depósito de partículas y abierta a la bolsa de desechos. Cada válvula está conectada a su propio canal individual en una placa de relés que, a su vez, está conectada a un ordenador. También hay una fuente de alimentación conectada a los canales que la placa de relés utiliza para distribuir la energía para accionar (abrir) las distintas válvulas. El ordenador contiene el software que le permite interactuar con la placa de relés y ejecutar la secuencia de etapas que se muestra en la Tabla 5.

Se ensambló una red de tubos, esencialmente igual a la que se muestra esquemáticamente en la Figura 15, a partir de tubos de silicona de 3,175 mm (1/8 de pulgada) de diámetro interno y 6,35 mm (1/4 de pulgada) de diámetro externo, uniones y uniones en T de polipropileno dentadas, un recipiente de depósito de partículas de 250 ml con tapa roscada equipado con tres aberturas y una barra agitadora, y una columna (Spectrum Labs) de TFF de polietersulfona (PES) modificada con corte de peso molecular de 750 kD, de 115 cm². Se ajustaron las longitudes de los tubos para mantener los volúmenes muertos a un mínimo práctico. Las posiciones de unión de los reactivos solubles se rematan o cierran con pinzas. La red se puede usar tal cual o, si se requiere un procesamiento aséptico, se puede envasar y esterilizar mediante tratamiento con radiación gamma en una instalación adecuada. Opcionalmente, pueden etiquetarse los segmentos de tubo para aclarar en qué válvula o bomba se va a montar ese segmento.

La red ensamblada se monta en las diversas válvulas estranguladoras, dos bombas peristálticas y pinzas para asegurar el recipiente de depósito de partículas en una placa agitadora y en la columna de TFF. La columna de TFF está equipada con aberturas para conectar transductores de presión, de modo que se pueda controlar el gradiente de presión a través de la membrana de TFF. El ordenador registra las salidas de transductor y las muestra continuamente en el monitor. La bolsa desechos se coloca en una báscula digital. El ordenador registra la salida de la báscula, que se usa para medir cuándo se han recolectado suficientes volúmenes de permeación.

Se escribió un software personalizado para ejecutar las etapas de la Tabla 5. El software acciona (abre) válvulas estranguladoras específicas en la secuencia mostrada en la Tabla. Las etapas que requieren un suministro de volumen fijo tienen un límite de tiempo y se indican en la columna de duración en segundos (s). Las etapas que requieren un volumen de tampón determinado para salir del sistema a través de la válvula V11 de permeado tienen una masa limitada y se indican en gramos (g). Como el permeado acuoso tiene una densidad de 1,0 g/ml, su masa en gramos es esencialmente igual a su volumen en mililitros. Al principio de una etapa de volumen limitado, el ordenador lee de la báscula de bolsa de desechos la salida digital y la monitoriza hasta que aumenta en la cantidad especificada. Por ejemplo, durante una etapa de lavado de partículas en la que se requieran la entrada y salida de 500 ml de tampón de permeación con respecto al bucle de TFF, el ordenador controlará la báscula hasta que la masa de la bolsa de desechos aumente en 500 g y, a continuación, pasará a la siguiente etapa de la tabla.

El software personalizado permite que la síntesis se ejecute en modo totalmente automático de principio a fin y sin intervención por parte del usuario, o en un modo semiautomático donde al final de cada etapa el sistema hace una pausa y se envía una notificación en forma de alarma o correo electrónico al usuario, informándole de que la etapa ha

finalizado y que el sistema está esperando una indicación de continuación. En este modo, el usuario puede alejarse del dispositivo y no perder la oportunidad de tomar una muestra o inspeccionar los componentes para que funcionen correctamente.

5 La válvula V10 de la Figura 13 y su correspondiente segmento de tubo se añadieron a modo de respiradero que permitía ventilar el exceso de presión de aire en el depósito de partículas hasta el receptáculo de desechos. El respiradero normalmente está cerrado y solo se abre durante las etapas de lavado de la columna y de adición/concentración de partículas.

10 Ejemplo 9: Fabricación semiautomática de una micropartícula LBL de 7 capas HP por TFF a una escala de 100 ml.

Se usó el aparato de LBL por TFF descrito en el Ejemplo 8 y mostrado en la Figura 13. Se pusieron soluciones madre de tampón HEPES 10 mM con pH 7 (5 l), PGA en tampón HEPES (100 ml, 5,0 mg/ml), PLL en tampón HEPES (125 ml, 6,25 mg/ml) y suspensión de micropartículas de CaCO_3 al 1,6 % en solución salina de PGA, preparadas mediante el método del Ejemplo 1 (200 ml), en bolsas de tamaño apropiado y se unieron a tubos corriente arriba de las válvulas V1, V2, V3 y V12, respectivamente, mediante conexiones dentadas de tubo. Las bolsas de reactivo soluble se colgaron por encima de las válvulas para promover la alimentación por gravedad de los reactivos, como se muestra en la Figura 14. La bolsa de suspensión de partículas se dejó invertida para evitar la sedimentación de las partículas y la formación de depósitos de partículas en la una o más aberturas de tubo. Para los ensayos asépticos, las soluciones HEPES, PGA y PLL se esterilizan primero mediante filtración a través de un filtro de 0,2 μm y se conectan a la red mediante una soldadora de tubos estéril.

La bomba peristáltica de suministro de reactivos se configuró para que funcionara a 120 ml/min, la bomba peristáltica de bucle de TFF se configuró para que funcionara a 100 ml/min, y la placa agitadora situada debajo del depósito de partículas se ajustó a velocidad media. El software que ejecuta las etapas descritas en la Tabla 5 se configuró en modo semimanual, lo que significa que, al final de cada etapa, el ordenador enviará un correo electrónico de notificación al usuario y se detendrá en esa etapa hasta que el usuario le pida que continúe.

Se ejecutaron las etapas de cebado y de lavado de columna de la Tabla 5. La bolsa de reactivos que contenía la suspensión de partículas al 1,6 % se invirtió suavemente varias veces para dispersar las partículas sedimentadas, se colgó en posición vertical y se ejecutó la rutina de carga y concentración de partículas de la Tabla 5. Tras estas etapas, el bucle de TFF contenía aproximadamente 100 ml de aproximadamente un 3 % de suspensión de partículas. Se recolectó manualmente una muestra de partículas (aproximadamente 0,3 ml) a través de una abertura de jeringa en línea que se colocó en el bucle de TFF.

Se inició la etapa de deposición de PLL de la Tabla 5 y se realizaron un total de seis rondas de LBL automatizada, cada una de las cuales finalizó con una pausa y la recolección de muestras. Las muestras de partículas se secaron al vacío elevado en recipientes de digestión de vidrio tarado y se sometieron al procedimiento de AAA descrito en el Ejemplo 3. Los datos de AAA en la Figura 16A muestran una acumulación constante de homopolímeros de PLL y de PGA, y una película de LBL robusta. Además, se realizaron mediciones de potencial superficial zeta en un Zetasizer de Malvern Instruments, y los datos mostrados en la Figura 16B muestran el cambio previsto de aproximadamente 15 mV en la dirección positiva después de una etapa de deposición de PLL o en la dirección negativa después de una etapa de deposición de PGA. El examen de las partículas mediante microscopía mostró que estaban bien dispersas y tenían forma esférica.

Esta síntesis particular se detuvo en 7 capas. La adición de 25 ml de una solución peptídica diseñada de 2,5 mg/ml seguida de las etapas que se muestran en la etapa final de la Tabla 5 daría como resultado la sustancia farmacológica en micropartículas de vacuna tal como se describe en el Ejemplo 4.

50 Tabla 5

	Función	Válvulas	Estado	Tiempo de retardo (s) o permeado recolectado (g)	Volumen objetivo de bucle de TFF (ml)
55	Cebado	Cebat línea de tampón	1, 5, 6, 7, 8	Encendidas	8,0 s
			1, 5, 6, 7, 8	Apagadas	1,5 s
			1, 5, 6, 7, 8	Encendidas	5,0 s
60			1, 5, 6, 7, 8	Apagadas	4,0 s
	Cebat línea de PLL	2, 5, 6, 7, 8	Encendidas	1,0 s	
		2	Apagadas		
65		1	Encendidas	8,0 s	

ES 3 023 882 T3

	Función	Válvulas	Estado	Tiempo de retardo (s) o permeado recolectado (g)	Volumen objetivo de bucle de TFF (ml)
		1, 5, 6, 7, 8	Apagadas	4,0 s	
5	Cebiar línea de PGA	3, 5, 6, 7, 8	Encendidas	1,0 s	
		3	Apagadas		
		1	Encendidas	8,0 s	
10		1, 5, 6, 7, 8	Apagadas	5,0 s	
	Tampón a receptáculo de desechos	1	Encendidas	10,0 s	
15		1	Apagadas		
20	Lavar columna de TFF	1, 5, 6, 7, 8, 9	Encendidas	30 s	75
		11	Encendidas	10 s	
	Concentrar	1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	50 g	
25		11	Apagadas	5,0 s	25
	Ventilar depósito	10	Encendidas	8,0 s	25
		10	Apagadas	5,0 s	25
	Permear	1, 9, 11	Encendidas	300 g	25
30		1, 9, 11	Apagadas	5,0 s	25
	Adicionar 60 ml de tampón	1, 5, 6, 7, 8, 9	Encendidas	32,7 s	85
		1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	5,0 s	85
35	Ventilar depósito	10	Encendidas	8,0 s	85
		10	Apagadas	5,0 s	85
	Adicionar 10 ml de tampón	1, 5, 6, 7, 8, 9	Encendidas	7,0 s	95
40		1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	5,0 s	95
	Ventilar depósito	10	Encendidas	8,0 s	95
		10	Apagadas	5,0 s	95
45	Permeación	1, 9, 11	Encendidas	20 s	95
		1, 9, 11	Apagadas		95
50	Enviar correo electrónico y/o pausar				
	Adicionar partículas al depósito	12, 5, 6, 7, 8	Encendidas	4,8 s	95-110
55		9, 11	Encendidas	7,8 s	110-130
		12	Apagadas		110-130
	Descargar a depósito	1	Encendidas	7,4 s	110-130
60	Concentrar	1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	>15 g	110-130
	Repetir 5 etapas anteriores 8 veces				110-130
	Concentrar			280 g (desde inicio de suministro de partículas)	95
65		11	Apagadas		95

ES 3 023 882 T3

	Función	Válvulas	Estado	Tiempo de retardo (s) o permeado recolectado (g)	Volumen objetivo de bucle de TFF (ml)
5	Lavar	1, 9	Encendidas	200 g	95
		1, 9	Apagadas		95
	Enviar correo electrónico y/o pausar				
10	Deposición de PLL	2, 5, 6, 7, 8	Encendidas	5,9 s	95
		9	Encendidas	6,6 s	
		2	Apagadas		
15		1	Encendidas	8,6 s	
	Recircular	1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	300 s	125
	Concentrar	11	Encendidas	30 g	95
20	Permear	1, 9	Encendidas	500 g	95
		1, 9, 11	Apagadas		95
	Muestreo manual		Esperar	20 s	95
25	Enviar correo electrónico y/o pausar				
	Deposición de PGA	3, 5, 6, 7, 8	Encendidas	5,5 s	95
		9	Encendidas	7,0 s	
30		3	Apagadas		
		1	Encendidas	6,2 s	
	Recircular	1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	300 s	125
35	Concentrar	11	Encendidas	30 g	95
	Permear	1, 9	Encendidas	500 g	95
		1, 9, 11	Apagadas		95
40	Muestreo manual		Esperar	20 s	95
	Enviar correo electrónico y/o pausar				
	Deposición de PLL				95
45	Deposición de PGA				95
	Deposición de PLL				95
	Deposición de PGA				95
50	Deposición de PLL				95
	Deposición de PGA				95
55	Deposición de péptido diseñado	4, 5, 6, 7, 8	Encendidas	5,1 s	95
		9	Encendidas	7,4 s	
		4	Apagadas		
60		1	Encendidas	7,8 s	125
	Recircular	1, 5, 6, 7, 8, 9	Apagadas	300 s	125
	Concentrar	11	Encendidas	30 g	95
65	Permear	1, 9	Encendidas	500 g	95

	Función	Válvulas	Estado	Tiempo de retardo (s) o permeado recolectado (g)	Volumen objetivo de bucle de TFF (ml)
		1, 9, 11	Apagadas		95
5	Muestreo manual		Esperar	20 s	95
	Enviar correo electrónico y/o pausar				

10 Los ejemplos descritos en la presente memoria demuestran que se pueden preparar excelentes micropartículas de vacuna usando LBL automatizada o semiautomática por TFF.

Los aspectos adicionales contemplados incluyen el ensamblaje y el montaje de piezas (válvulas estranguladoras, alambres, etc.) en una plataforma vertical fija para proporcionar aspectos adicionales añadidos sin enredos.

15 En la Figura 5 se ilustra otro esquema ilustrativo de un sistema automatizado. Esta realización ilustrativa proporciona una bomba peristáltica 50 de 4 canales para suministrar el tampón 52 de lavado y el polipéptido 54 diseñado además de los HP (véanse PGA 56, PLL 58, suspensión 60 de CaCO_3 en la Figura 5). Las bolsas de reactivos solubles pueden soldarse de forma estéril (véase 62 en la Figura 5) al colector y colgarse en balanzas digitales que registrarán el tiempo y la cantidad de los suministros. Las válvulas controladas por ordenador, por ejemplo, las válvulas estranguladoras de 2 o 3 vías, se ilustran con la referencia 64. Un bucle de TFF ilustrativo se ilustra generalmente con la referencia 66. En realizaciones ilustrativas, el péptido diseñado puede no requerir una medición cuidadosa, ya que es probable suministrar todo ese reactivo en un solo bolo.

25 En realizaciones ilustrativas, los reactivos estériles en bolsas se unen a un sistema cerrado mediante soldadura (X) de tubos estériles. La suspensión de partículas de CaCO_3 se suministra al recipiente de depósito por gravedad, donde se mezcla suavemente mediante agitación mecánica. Las partículas circulan por el bucle de filtro de forma continua durante el procesamiento. Las soluciones madre concentradas de HP, el péptido diseñado y el tampón de lavado se introducen en el depósito en cantidades controladas y en tiempos preestablecidos a través de válvulas estranguladoras controladas por ordenador. Las básculas registran los cambios de peso para confirmar los suministros correctos. El exceso de reactivo soluble de las etapas de LBL se elimina tangencialmente del filtro de TFF, enviándose al receptáculo de desechos. Tras la etapa de lavado final, la suspensión de partículas de vacuna se suministra a una bolsa de producto para la formulación y ensayos de liberación fuera de línea.

35 En la Figura 6 se muestra un esquema de una red ilustrativa de tubos de bucle cerrado que se ajustaría a este diseño. Esta realización incluye segmentos 68 de tubo de longitud fija, uniones dentadas 70, una columna 72 de filtro de TFF, un depósito 74 con una barra agitadora 76 de otro dispositivo de mezcla interno, y bolsas receptoras para desechos 78 y producto 80. Se puede incluir etiquetado en cada unión para garantizar un montaje adecuado en el dispositivo y la correcta soldadura de los reactivos. En realizaciones ilustrativas, el bucle cerrado consiste completamente en tubos, uniones dentadas, la columna de filtro de TFF, el depósito de partículas cerrado con barra agitadora, y bolsas receptoras para desechos y producto.

45 En la Figura 11 se muestra un esquema de una red ilustrativa de tubos de bucle cerrado que se ajustaría a un colector de suministro de reactivos configurado con bombas separadas para cada reactivo. Esta realización incluye todos los componentes de la red mostrada en la Figura 6 e incluye sitios para la soldadura estéril de reactivos estériles al colector (84, 86, 87, 88, 89, 92 en la Figura 11). Como se explicó anteriormente, el bucle cerrado puede ensamblarse en condiciones de GMP, envasarse, esterilizarse y después almacenarse hasta su uso.

50 La Figura 7 ilustra un sistema ilustrativo para LBL automatizada por TFF. El sistema 100 puede incluir un servidor 101 (o simplemente un ordenador local). El servidor 101 puede incluir una pluralidad de información, que incluye, aunque no de forma limitativa, información y perfiles, algoritmos y módulos de procesamiento y otro almacenamiento de datos. El servidor 101 puede estar en comunicación con una red 106 a través de un canal 110 de comunicación.

55 Además, el sistema 100 puede acceder o interactuar con fuentes 103 de datos o servidores de terceros adicionales. Las fuentes 103 de datos de terceros pueden estar en comunicación con la red 106 a través de un canal 111 de comunicación. Se observa que, aunque se ilustra de forma separada, la fuente 103 puede incluir un servidor sustancialmente similar al servidor 101. El servidor 101 o la fuente 103 pueden incluir un proveedor de servicios de datos, por ejemplo, un proveedor de servicios celulares, un proveedor de información empresarial o cualquier otro proveedor o repositorio adecuado. El servidor 101 o la fuente 103 también pueden incluir un servidor de aplicaciones que proporcione aplicaciones y/o código ejecutable por ordenador que implementen cualquiera de las interfaces/metodologías descritas en la presente memoria. El servidor 101 o la fuente 103 pueden presentar una pluralidad de valores predeterminados, elecciones, ajustes y/o configuraciones de aplicación, de modo que un dispositivo pueda recibir y procesar la aplicación en consecuencia. El servidor 101 o la fuente 103 pueden presentar cualquier aplicación en una interfaz de visualización o navegador web de un dispositivo para que un observador pueda seleccionar el dispositivo de forma relativamente fácil. La interfaz de visualización o la página web renderizada para la selección de aplicaciones pueden tener la forma de una tienda de aplicaciones y/o un mercado de aplicaciones.

Alternativamente, otro componente de servidor o aparato informático local, por ejemplo, 104, 105 y/o 106, puede producir la interfaz de visualización y controlar la conectividad con el servidor 101 o la fuente 103. Además, el servidor 101 o uno o más de los aparatos informáticos 104, 105 y 106 locales pueden configurarse para que accedan periódicamente a la fuente 103 y almacenen en caché datos relevantes utilizados en realizaciones de la presente descripción.

La red 106 puede ser cualquier red adecuada, incluyendo Internet, una red de área amplia y/o una red local. El servidor 101 y la fuente 103 pueden estar en comunicación con la red 106 a través de los canales 110, 111 de comunicación. Los canales 110, 111 de comunicación pueden ser cualquier canal de comunicación adecuado, incluidos canales inalámbricos, de satélite, cableados o de otro tipo.

Un sistema 100 ilustrativo incluye además un aparato informático 105 en comunicación con la red 106, a través del canal 112 de comunicación. El aparato informático 105 puede ser cualquier aparato informático adecuado, incluido un ordenador personal (de ubicación fija), un ordenador portátil, un asistente digital personal, un teléfono celular, una tableta portátil, un reproductor de audio portátil o de otro tipo. Por ejemplo, el sistema 100 puede incluir aparatos informáticos 104 y 106 realizados como un teléfono celular portátil y una tableta, respectivamente. Los aparatos 104 y 106 pueden incluir medios 141, 161 de visualización y/o botones/controles 142. Los controles 142 pueden funcionar de forma independiente o en combinación con cualquiera de los controles indicados anteriormente.

Además, los aparatos 104, 105 y 106 pueden estar en comunicación entre sí a través de unos canales 115, 116 de comunicación (por ejemplo, canales cableados, inalámbricos, de Bluetooth, etc.); y pueden estar además en comunicación con la red 106 a través de los canales 112, 113 y 114 de comunicación.

Por lo tanto, todos los aparatos 104, 105 y 106 pueden estar en comunicación con uno o ambos del servidor 101 y la fuente 103, así como entre sí. Cada uno de los aparatos puede estar en comunicación separable con la red 106 y entre sí, de modo que los aparatos 104, 105 y 106 puedan funcionar sin una comunicación constante con la red 106 (por ejemplo, utilizando los controles de conexión de datos de una interfaz). Por ejemplo, si no hay disponibilidad de datos o si un observador solicita que un aparato funcione fuera de línea, por ejemplo, sin una conexión de red inmediata, los datos utilizados por cualquiera de los aparatos 104, 105 y 106 pueden basarse en información/parámetros almacenados o en caché. De ello se deduce que cada uno de los aparatos 104, 105 y 106 puede configurarse para que realice las metodologías descritas en las diversas realizaciones ilustrativas.

Además, utilizando cualquiera de los medios de comunicación ilustrados, los aparatos 104, 105 y 106 pueden manipular, compartir, transmitir y/o recibir diferentes datos producidos anteriormente o actualmente en cualquiera de los elementos ilustrados del sistema 100. Por ejemplo, los datos pueden estar disponibles en el servidor 101 y/o en la fuente 103. Además, los observadores de cualquiera de los dispositivos 104, 105 y 106 pueden manipular, transmitir, etc., datos de forma independiente, por ejemplo, para determinar por separado un valor actual del índice en un momento dado.

Además, y como se ha descrito anteriormente, las realizaciones ilustrativas de la presente descripción pueden realizarse en forma de procesos y aparatos implementados por ordenador para practicar tales procesos (por ejemplo, un software que controle la LBL por TFF). Por lo tanto, según una realización ilustrativa, las metodologías descritas anteriormente pueden implementarse mediante un sistema o aparato informático. Un sistema o aparato informático puede ser algo similar a los dispositivos móviles y aparatos informáticos descritos anteriormente, que pueden incluir elementos como los que se describen a continuación.

La Figura 8 ilustra un aparato informático según una realización ilustrativa. Pueden ejecutarse partes o la totalidad de las metodologías descritas en la presente memoria como instrucciones en un procesador 202 del sistema informático 200. El sistema informático 200 incluye una memoria 201 para almacenar instrucciones e información, un dispositivo o dispositivos 203 de entrada para la comunicación informática y un dispositivo 204 de visualización, que puede mostrar una interfaz 205 de usuario. La interfaz de usuario puede proporcionar al usuario indicaciones de llamada a la acción, tales como proporcionar indicar la necesidad de que el usuario haga un clic manual para iniciar un ciclo de deposición de polielectrolitos. El sistema informático 200 puede conectarse además a la red 206. Alternativamente, el control por ordenador incluye una interfaz de usuario configurada para mostrar el estado de al menos un ciclo de deposición de polielectrolitos.

Por lo tanto, la presente descripción puede implementarse, en software, por ejemplo, como cualquier programa informático adecuado en un sistema informático algo similar al sistema informático 200. Por ejemplo, un programa según la presente descripción puede ser un producto de programa informático que haga que un ordenador ejecute los métodos ilustrativos descritos en la presente memoria.

Por lo tanto, las realizaciones se pueden incorporar en forma de procesos implementados por ordenador y aparatos para poner en práctica esos procesos en un producto de programa informático. Las realizaciones incluyen el producto 300 de programa informático, tal como se representa en la Figura 9, en un medio 302 utilizable por ordenador con una lógica 304 de código de programa informático que contiene instrucciones incorporadas en medios tangibles como un

artículo de fabricación. Los artículos de fabricación ilustrativos para el medio 302 utilizable por ordenador pueden incluir dispositivos CD-ROM, discos duros, unidades flash de bus serie universal (USB) o cualquier otro medio de almacenamiento legible por ordenador, en donde, cuando se carga y ejecuta en un ordenador la lógica 304 de código de programa informático, el ordenador se convierte en un aparato para poner en práctica la presente descripción. Las realizaciones incluyen la lógica 304 de código de programa informático, por ejemplo, ya sea almacenada en un medio de almacenamiento, cargada en y/o ejecutada por un ordenador, o transmitida a través de algún medio de transmisión, tal como a través de cables o alambres eléctricos, a través de fibra óptica o mediante radiación electromagnética, en donde, cuando se carga y ejecuta en un ordenador la lógica 304 de código de programa informático, el ordenador se convierte en un aparato para poner en práctica la presente descripción. Cuando se implementan en un microprocesador de uso general, los segmentos de lógica 304 de código de programa informático configuran el microprocesador para crear circuitos lógicos específicos.

Puede utilizarse cualquier combinación de uno o más medios legibles por ordenador. El medio legible por ordenador puede ser un medio de señal legible por ordenador o un medio de almacenamiento legible por ordenador. Un medio de almacenamiento legible por ordenador puede ser, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un sistema, aparato o dispositivo eléctrico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo o semiconductor, o cualquiera combinación adecuada de los anteriores. Ejemplos más específicos (una lista no exhaustiva) del medio de almacenamiento legible por ordenador incluiría lo siguiente: una conexión eléctrica que tiene uno o más cables, un disquete de ordenador portátil, un disco duro, una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), una memoria de solo lectura programable y borrable (memoria EPROM o Flash), una fibra óptica, una memoria de solo lectura de disco compacto portátil (CD-ROM), un dispositivo de almacenamiento óptico, un dispositivo de almacenamiento magnético, o cualquier combinación adecuada de los anteriores. En el contexto de este documento, un medio de almacenamiento legible por ordenador puede ser cualquier medio tangible que pueda contener o almacenar un programa para su uso por parte de o en conexión con un sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones.

Un medio de señal legible por ordenador puede incluir una señal de datos propagada con un código de programa legible por ordenador incorporado en la misma, por ejemplo, en banda base o como parte de una onda portadora. Dicha señal propagada puede adoptar cualquiera de diversas formas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, electromagnética, óptica o cualquier combinación adecuada de las mismas. Un medio de señal legible por ordenador puede ser cualquier medio legible por ordenador que no sea un medio de almacenamiento legible por ordenador y que pueda comunicar, propagar o transportar un programa utilizado por o en conexión con un sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones.

El código de programa incorporado en un medio legible por ordenador puede transmitirse usando cualquier medio apropiado, incluyendo, pero sin limitarse a, inalámbrico, cable de fibra óptica, RF, etc., o cualquier combinación adecuada de los anteriores.

El código de programa informático para llevar a cabo operaciones para aspectos de la presente descripción puede escribirse en cualquier combinación de uno o más lenguajes de programación, incluido un lenguaje de programación orientado a objetos, tal como Java, Smalltalk, C++ o similares, y lenguajes de programación procedimentales convencionales, tales como el lenguaje de programación "C" o lenguajes de programación similares. El código de programa puede ejecutarse completamente en el ordenador del observador, parcialmente en el ordenador del observador, como un paquete de software independiente, p. ej. desde un sistema en red, parcialmente en el ordenador del observador y parcialmente en un ordenador remoto, o completamente en el ordenador o servidor remoto. En este último caso, el ordenador remoto puede estar conectado al ordenador del observador a través de cualquier tipo de red, incluida una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN), o la conexión puede realizarse a un ordenador externo (por ejemplo, a través de Internet utilizando un proveedor de servicios de Internet).

Como se ha descrito anteriormente, las características de las realizaciones ilustrativas incluyen otras características únicas que no se encuentran en la técnica.

Los métodos y aparatos descritos en la presente memoria son útiles para depositar una película multicapa sobre un núcleo de sustrato, tal como un núcleo de nanopartículas o un núcleo de micropartículas. Los tamaños de núcleo en el orden de 5 nanómetros (nm) a 50 micrómetros (μm) de diámetro son particularmente útiles. Los núcleos pueden estar compuestos por muchos materiales siempre que tengan una distribución de tamaño controlable y tengan suficiente carga superficial (positiva o negativa) para unir polielectrolitos. Algunos núcleos ilustrativos compuestos por materiales inorgánicos incluyen micropartículas de CaCO_3 , nanopartículas de CaCO_3 y otras sales inorgánicas tales como MgCO_3 , fosfato de calcio, partículas de sílice y partículas de óxido de hierro. Algunos ejemplos de partículas de núcleo compuestas por polímeros orgánicos incluyen nanopartículas y micropartículas compuestas por ácido poliláctico (PLA), copolímero de ácido poliláctico y ácido glicólico (PLGA), polietilenglicol (PEG), quitosano, látex, ácido hialurónico y gelatina. Además, los núcleos pueden estar compuestos por materiales tanto inorgánicos como orgánicos, por ejemplo, micropartículas de CaCO_3 coprecipitadas con poli-L-glutamato, sal sódica.

La generalidad y la relativa simplicidad del proceso de película de LBL permiten la deposición de muchos tipos diferentes de polielectrolitos sobre muchos tipos diferentes de superficie. Las películas multicapa de polipéptidos son un subconjunto de películas multicapa de polielectrolitos, que comprenden al menos una capa que comprende un

polipéptido cargado, tal como un polipéptido diseñado. Una ventaja clave de las películas multicapa de polipéptidos sobre las películas compuestas por otros polímeros es su biocompatibilidad. Las películas LBL también se pueden usar para la encapsulación. Las aplicaciones de las películas y microcápsulas de polipéptidos incluyen, por ejemplo, nanorreactores, biosensores, células artificiales, vacunas y vehículos de administración de fármacos.

El término “polielectrolito” incluye materiales policatiónicos y polianiónicos que tienen un peso molecular superior a 1 000 y al menos 5 cargas por molécula. Los materiales policatiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, polipéptidos y poliaminas. Los polipéptidos incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como poli-L-lisina (PLL), poli-L-arginina, poli-L-ornitina, poli-D-lisina y poli-DL-lisina. Las poliaminas incluyen, por ejemplo, polivinilamina, poli (aminoestireno), poli (aminoacrilato), poli (N-metilaminoacrilato), poli (N-etilaminoacrilato), poli (N, N-aminoacrilato de dimetilo), poli (N, N-dietilaminoacrilato), poli (aminometacrilato), poli (aminometacrilato de N-metilo), poli (aminometacrilato de N-etilo), poli (N, N-dimetil aminometacrilato), poli (N, N-dimetil aminometacrilato), i (etilenimina), poli (dialilo) cloruro de dimetilamonio), poli (cloruro de N, N, N-trimetilaminoacrilato), poli (cloruro de metiacrilamidopropiltrimetilamonio), quitosano y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales policatiónicos anteriores. Los materiales polianiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, un polipéptido tal como ácido poli-L-glutámico (PGA), ácido poli-L-aspartico, ácido poliD-aspartico, ácido poli-L-gamma-glutámico, un ácido nucleico tal como ADN y ARN, alginato, carragenano, furcellarén, pectina, xantano, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparán, sulfato de estaño, sulfato de dermatán, sulfato de dextrano, ácido poli (met) acrílico, celulosa oxidada, carboximetilcelulosa, polisacáridos ácidos y croscarmelosa, polímeros y copolímeros sintéticos que contienen grupos carboxilo colgantes, y combinaciones que comprenden uno o más de los materiales polianiónicos anteriores. En un ejemplo, el epítipo de RSV y el polielectrolito tienen el mismo signo de carga.

Un homopolímero se define en la presente memoria como un polímero compuesto por una única subunidad monomérica repetitiva. Para los fines de la fabricación LBL, la subunidad monomérica generalmente lleva al menos una sola carga, positiva o negativa. Por lo tanto, para los fines de la LBL, el homopolímero es normalmente un polielectrolito. Hay una amplia variedad de homopolímeros útiles en la LBL. De particular importancia son los aminoácidos poliméricos tales como poli-L-glutamato, poli-L-aspartato, poli-L-lisina y poli-L-arginina, entre otros. Cuando un homopolímero está compuesto de aminoácidos repetidos, también puede denominarse homopolipéptido. En la presente memoria, la abreviatura usada para homopolipéptido es HP.

En un ejemplo, una o más capas de polielectrolitos de la película comprenden un polipéptido (DP) diseñado. Opcionalmente, por conveniencia, los polipéptidos diseñados se sintetizan químicamente. Los principios de diseño de los polipéptidos adecuados para la deposición electrostática capa por capa se explican en la publicación de patente US-2005/0069950. En resumen, las principales preocupaciones de diseño son la longitud y la carga del polipéptido. La electrostática supone la preocupación de diseño más importante porque es la base de la LBL electrostática. Sin propiedades de carga adecuadas, un polipéptido podría no ser sustancialmente soluble en solución acuosa con un pH de 4 a 10 y no podrá usarse fácilmente para la fabricación de una película multicapa mediante LBL electrostática. Otros problemas de diseño incluyen la estructura física de los polipéptidos, la estabilidad física de las películas formadas a partir de los polipéptidos y la biocompatibilidad y bioactividad de las películas y los polipéptidos constituyentes. En un aspecto específico, el polipéptido diseñado comprende un epítipo para un virus, bacteria, parásito u hongo y es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria.

Un polipéptido diseñado significa un polipéptido que tiene una carga suficiente para la unión estable a una superficie con carga opuesta, es decir, un polipéptido que puede depositarse en una capa de una película multicapa en la que la fuerza impulsora para la formación de la película es electrostática. Una película corta estable es una película que, una vez formada, retiene más de la mitad de sus componentes tras la incubación en PBS a 37 °C durante 24 horas. En casos específicos, un polipéptido diseñado tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos y la magnitud de la carga neta por desecho del polipéptido es mayor o igual a 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 a pH 7,0. Los aminoácidos naturales con carga positiva (básicos) a pH 7,0 son la arginina (Arg), la histidina (His), la ornitina (Orn) y la lisina (Lys). Los desechos de aminoácidos naturales cargados negativamente (ácidos) a pH 7,0 son el ácido glutámico (Glu) y el ácido aspártico (Asp). Se puede emplear una mezcla de desechos de aminoácidos de carga opuesta siempre que la relación neta global de carga cumpla con los criterios especificados. En una realización, un polipéptido diseñado no es un homopolímero. En otra realización, un polipéptido diseñado no está ramificado.

En una realización, un polipéptido diseñado comprende un único epítipo antigénico flanqueado por dos regiones de adsorción superficial, una región de adsorción superficial N-terminal y una región de adsorción superficial C-terminal. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un único epítipo antigénico flanqueado por una región de adsorción superficial unida al terminal N del epítipo. En otra realización, un polipéptido diseñado comprende un único epítipo antigénico flanqueado por una región de adsorción superficial unida al terminal C del epítipo.

Cada una de las regiones independientes (por ejemplo, epítopos y regiones de adsorción superficial) del polipéptido diseñado pueden sintetizarse por separado mediante síntesis peptídica en fase de solución, síntesis peptídica en fase sólida o ingeniería genética de un organismo hospedador adecuado. La síntesis de péptidos en fase de solución es el método utilizado para la producción de la mayoría de los productos farmacéuticos peptídicos aprobados en el mercado actual. Se puede usar una combinación de métodos en fase de solución y en fase sólida para sintetizar péptidos relativamente largos e incluso proteínas pequeñas. Las empresas de síntesis de péptidos tienen los conocimientos y

la experiencia para sintetizar péptidos difíciles a cambio de una tarifa por el servicio. Las síntesis se realizan en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP) y a una escala adecuada para los ensayos clínicos y el lanzamiento comercial de fármacos.

5 Alternativamente, las diversas regiones independientes se pueden sintetizar juntas como una única cadena polipeptídica mediante síntesis peptídica en fase de solución, síntesis peptídica en fase sólida o ingeniería genética de un organismo hospedador adecuado. La elección del enfoque en cualquier caso particular será una cuestión de conveniencia o de economía.

10 Debe enfatizarse que las realizaciones descritas anteriormente de la presente descripción, en particular, cualquier análisis detallado de ejemplos particulares, son simplemente posibles ejemplos de implementaciones y se exponen para una comprensión clara de los principios de la descripción.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la síntesis automatizada de partículas, conteniendo las partículas al menos una capa de polielectrolito depositada sobre un núcleo de sustrato, comprendiendo el sistema:
 - un ordenador,
 - un componente de filtración de flujo tangencial (TFF), y
 - un componente colector de adición de reactivos solubles;
 - comprendiendo el componente de TFF un bucle (12) de TFF y una válvula (28) de permeado, en donde el bucle (12) de TFF comprende:
 - una bomba (18, 67) de bucle circulatorio TFF,
 - un depósito (16) de partículas que contiene núcleos de sustrato,
 - un medio de conexión, y
 - un filtro (20) de TFF conectado al depósito de partículas mediante el medio de conexión;
 - estando el ordenador dispuesto para controlar la válvula (28) de permeado para liberar selectivamente permeado desde el filtro (20) de TFF;
 - incluyendo el componente colector de adición de reactivos solubles al menos un reactivo soluble (32, 34; 56, 58; 88, 89) y al menos una válvula (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivo, en donde el reactivo soluble (32, 34; 56, 58; 88, 89) incluye un polielectrolito;
 - estando el ordenador dispuesto para controlar la al menos una válvula (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivo para suministrar el al menos un reactivo soluble (32, 34; 56, 58; 88, 89) desde el componente colector de suministro de reactivos solubles al componente de TFF para formar una mezcla con los núcleos de sustrato;
 - caracterizado porque**
 - el componente colector de suministro de reactivos solubles comprende una pluralidad de reactivos solubles (32, 34; 56, 58; 88, 89) y una pluralidad de válvulas (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivo, incluyendo los reactivos (32, 34; 56, 58; 88, 89) polielectrolitos con cargas opuestas; y
 - el ordenador está dispuesto para controlar la válvula (28) de permeado y la pluralidad de válvulas (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivo para realizar la formación automática capa por capa de películas multicapa que contienen una pluralidad de capas de polielectrolitos con cargas opuestas, mientras que la bomba (18, 67) de bucle circulatorio de TFF recircula la mezcla a través del bucle (12) de TFF al:
 - suministrar automatizadamente un volumen definido de un primero de los reactivos solubles (32, 34; 56, 58; 88, 89) al componente de filtración de flujo tangencial;
 - mezclar el primer reactivo soluble (32, 34; 56, 58; 88, 89) con las partículas del núcleo de sustrato durante un tiempo definido;
 - eliminar el exceso del primer reactivo soluble (32, 34; 56, 58; 88, 89) por permeación para un volumen definido; y
 - suministrar un volumen definido de un segundo de los reactivos solubles (32, 34; 56, 58; 88, 89) que tiene una polaridad opuesta a la del polielectrolito presente en el primer reactivo soluble.
2. El sistema de la reivindicación 1, en donde la válvula de permeado y las válvulas (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivo están completamente automatizadas.
3. El sistema de la reivindicación 1, en donde el ordenador está dispuesto para controlar el suministro de un tampón de lavado a un receptáculo de desechos, al componente de TFF, o a ambos.
4. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente colector de suministro de reactivos solubles comprende al menos una bomba (36, 50, 98) de reactivos configurada para impulsar los reactivos solubles (32, 34; 56, 58; 88, 89) a través de las válvulas (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivos hasta el depósito (16) de partículas.
5. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente colector de suministro de reactivos solubles está configurado para suministrar los reactivos (32, 34; 56, 58; 88, 89) impulsados por bombeo, gravedad, jeringuilla o gas comprimido.
6. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente de TFF y/o el componente colector de suministro de reactivos solubles comprenden además al menos un respiradero controlado por ordenador.
7. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente colector de suministro de reactivos solubles comprende un dispositivo de medición de reactivos configurado para indicar el volumen o el peso del reactivo soluble (32, 34; 56, 58; 88, 89) administrado o no administrado, en donde el dispositivo de medición está

configurado para transmitir datos al ordenador con el fin de registrar los tiempos y las cantidades del reactivo soluble suministrado.

- 5 8. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente de TFF comprende un dispositivo de medición de volumen configurado para enviar al ordenador los datos del volumen del bucle de TFF, en donde el ordenador está configurado para mantener el volumen de la mezcla dentro del bucle (12) de TFF dentro de un intervalo establecido mediante la activación de las válvulas (28, 31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) para aumentar el volumen mediante la adición de un reactivo (32, 34; 56, 58; 88, 89) o disminuir el volumen por permeación.
- 10 9. El sistema de la reivindicación 1, que incluye una interfaz de usuario conectada al ordenador y configurada para proporcionar al usuario indicaciones para que este tome medidas, en donde las indicaciones incluyen la indicación de la necesidad de que el usuario haga clic manualmente para iniciar un ciclo de deposición de polielectrolitos.
- 15 10. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente de TFF comprende un dispositivo de medición dispuesto para medir la cantidad de un permeado que pasa a través del filtro de TFF durante una etapa particular del ciclo de deposición de polielectrolitos y para informar de la cantidad medida al ordenador, en donde el ordenador está dispuesto para terminar automáticamente una etapa del ciclo de deposición de polielectrolitos al medir una cantidad de permeado especificada por el usuario.
- 20 11. El sistema de la reivindicación 10, en donde el dispositivo de medición es una báscula electrónica dispuesta para medir continuamente la cantidad de permeado que sale del bucle (12) de TFF.
- 25 12. El sistema de la reivindicación 1, en donde el bucle (12) de TFF comprende una red de tubos estériles de bucle cerrado que incluye el filtro (20) de TFF, el depósito (16) de partículas y el medio de conexión, en donde la red de tubos de bucle cerrado se monta en la bomba (18, 67) de bucle circulatorio de TFF, la válvula (28) de permeado y las válvulas (31, 33, 35, 37, 44, 93, 95) de reactivo.

30

35

40

45

50

55

60

65

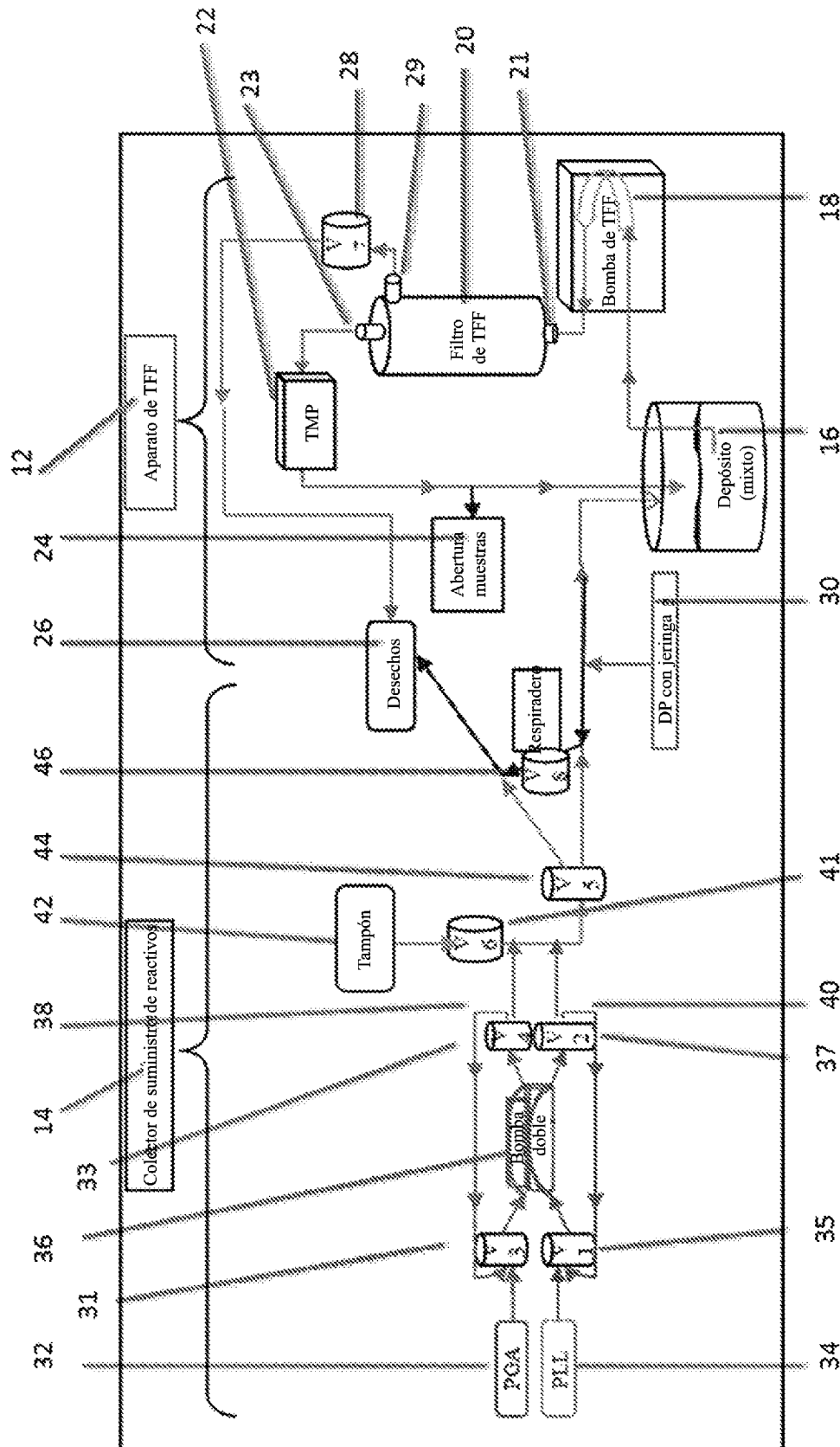


Figura 1A

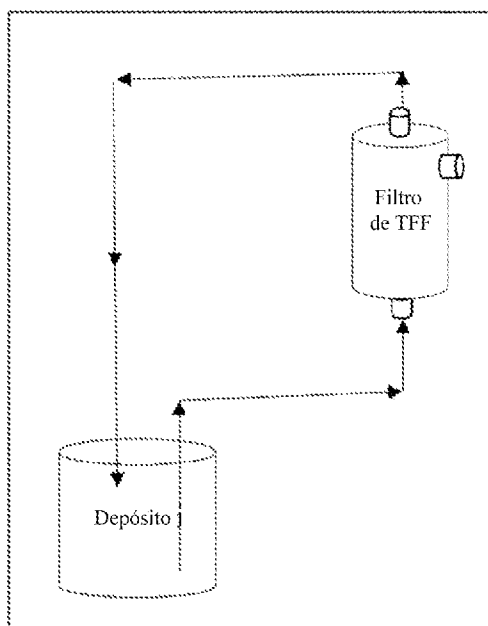


Figura 1B

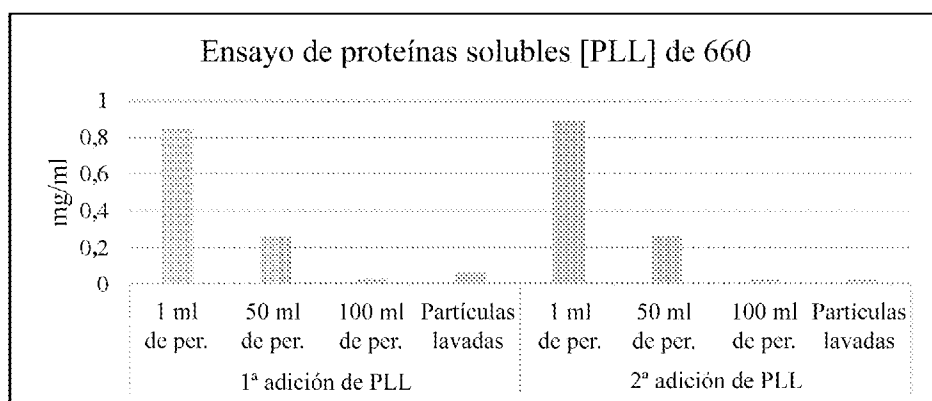


Figura 2

Figura 3A

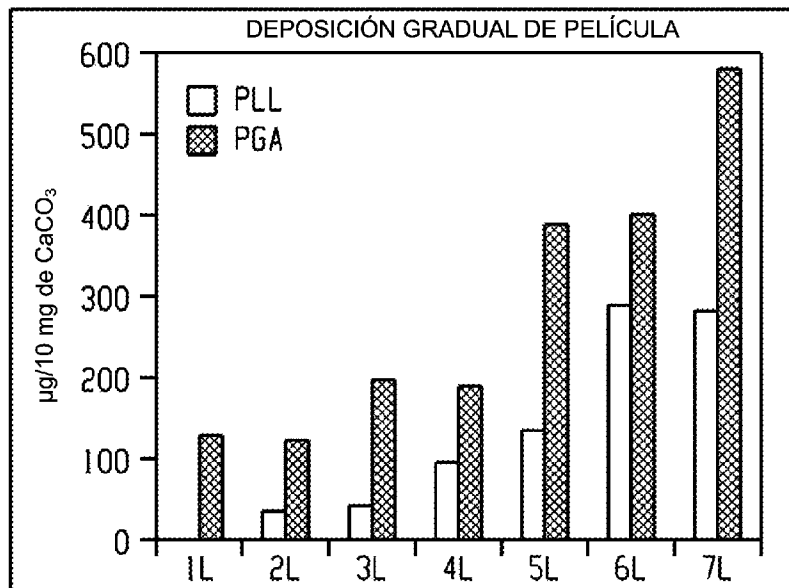
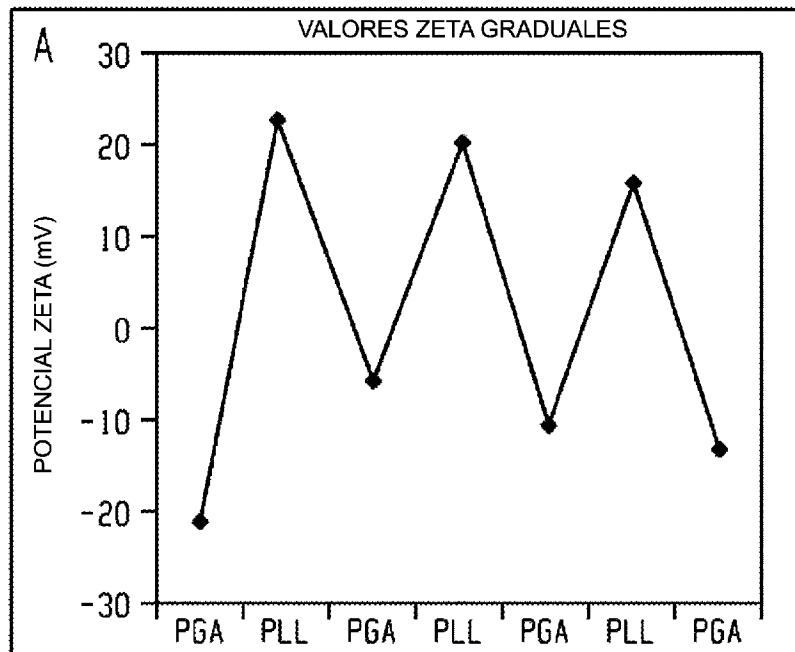
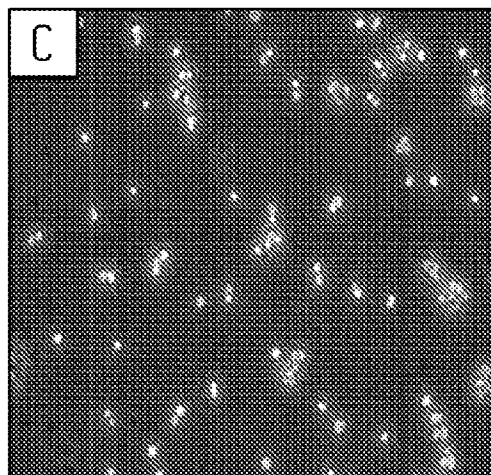


Figura 3B

Figura 3C



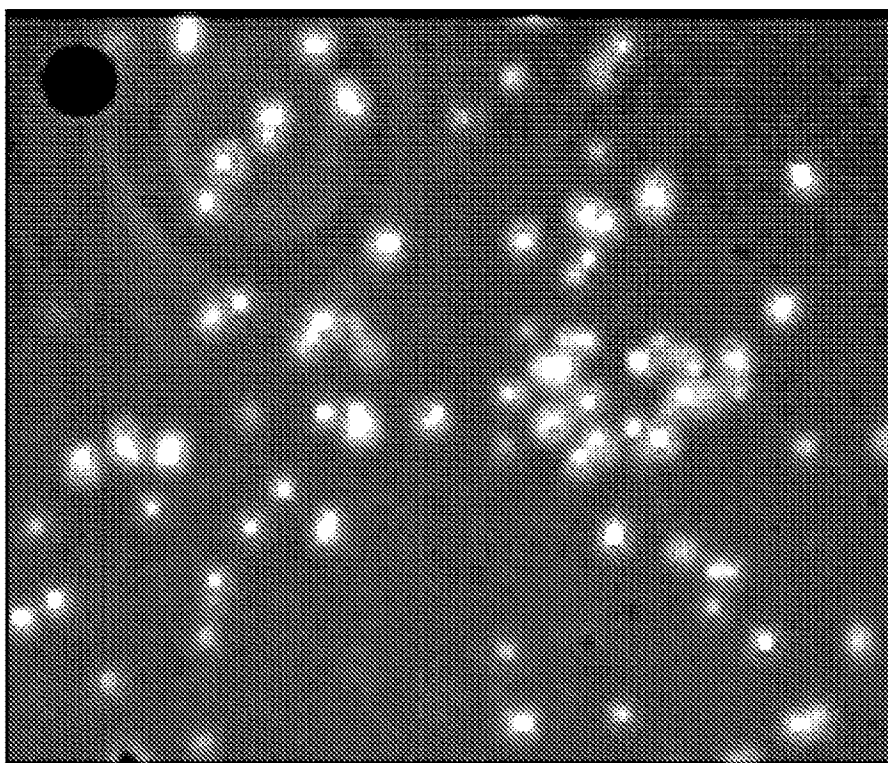


Figura 4A

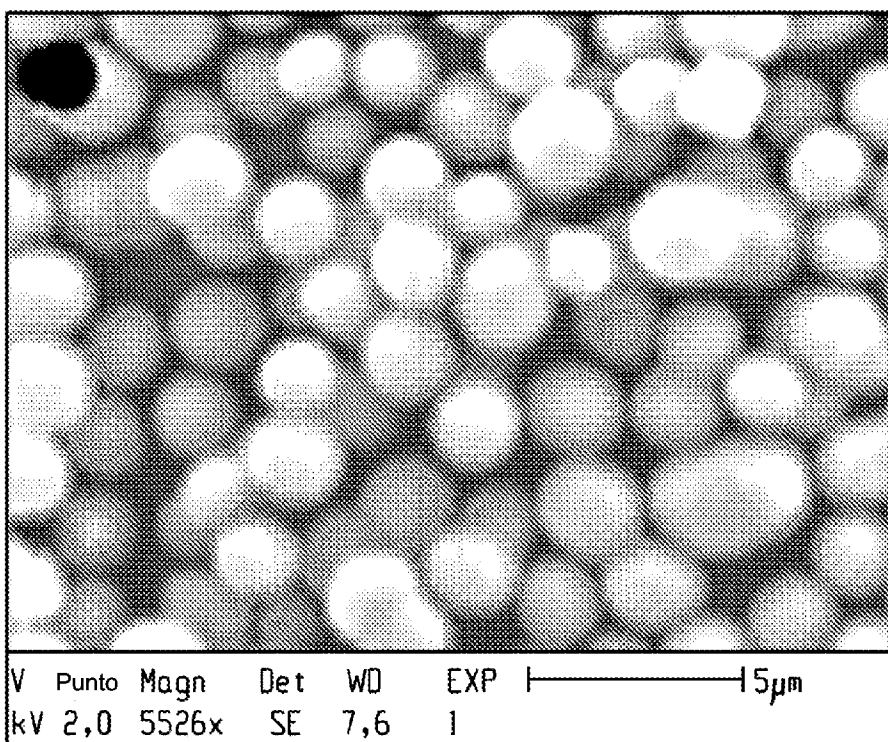


Figura 4B

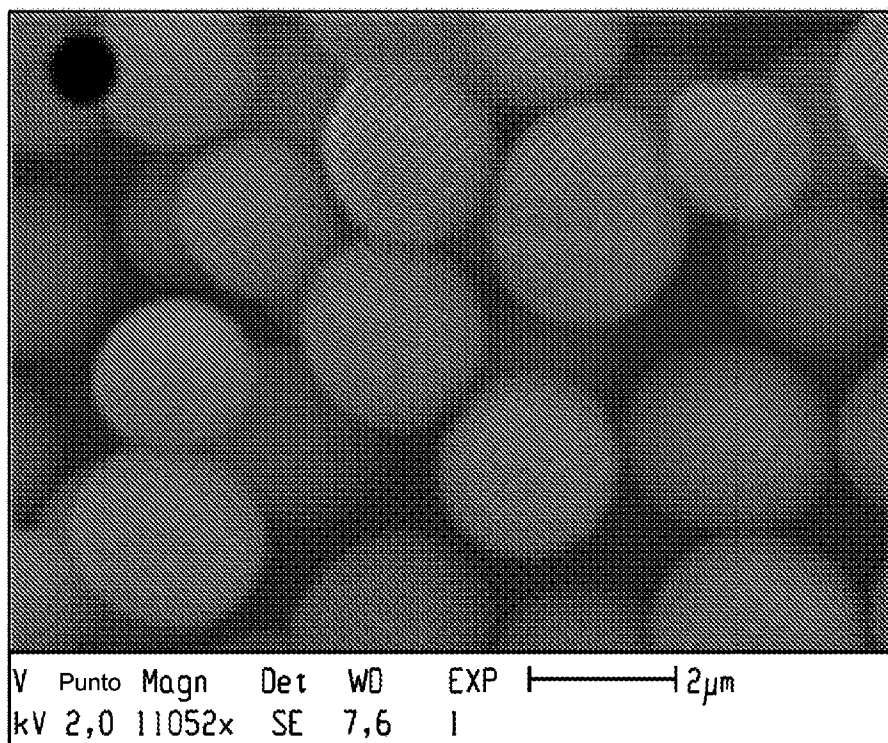


Figura 4c

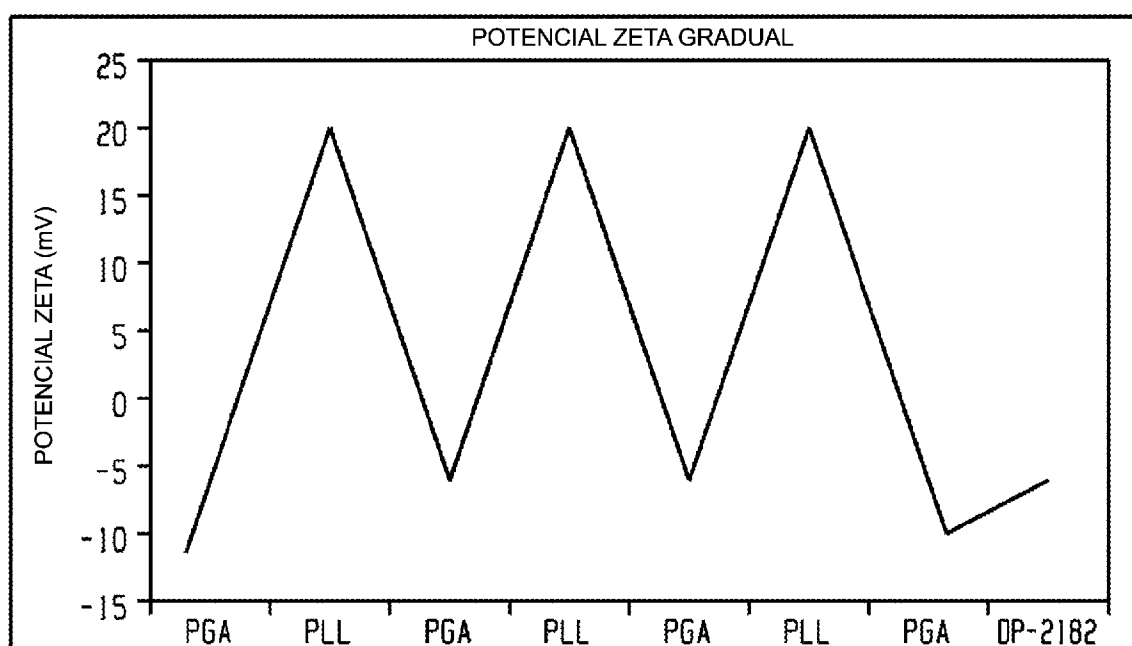


Figura 4D

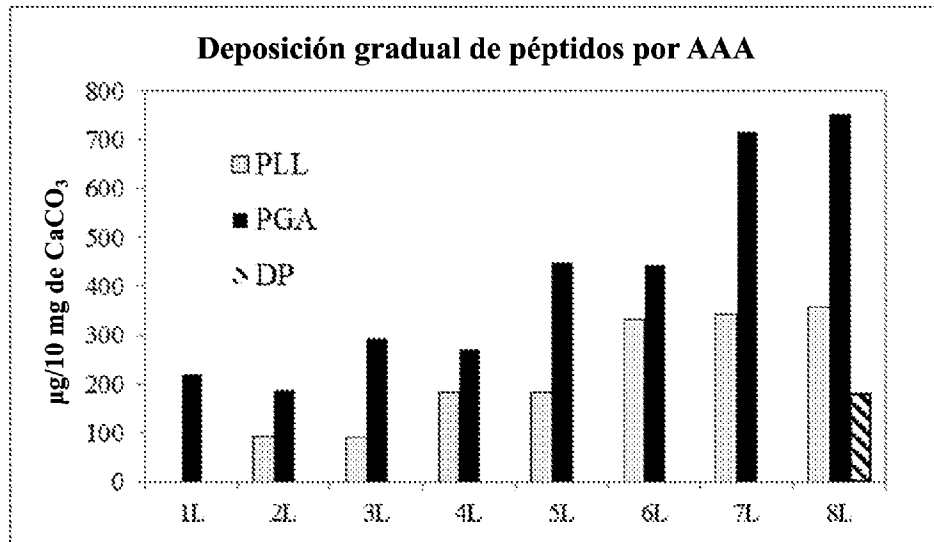


Figura 4E

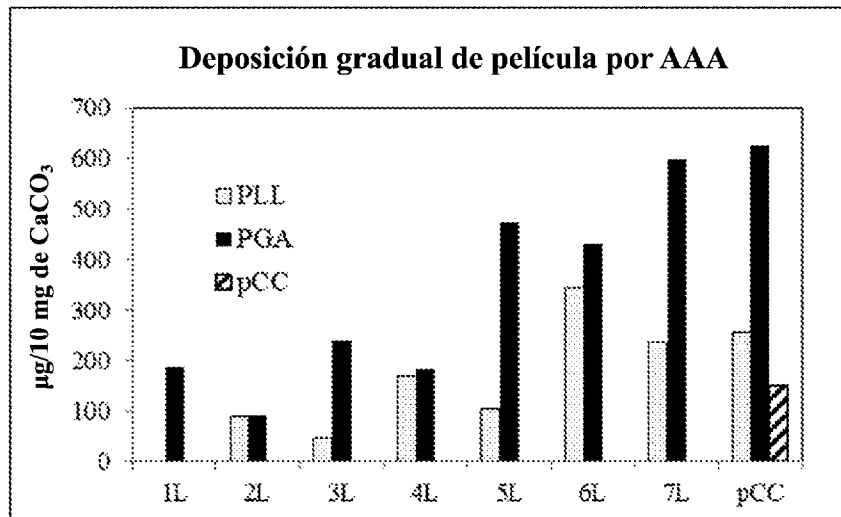


Figura 4F

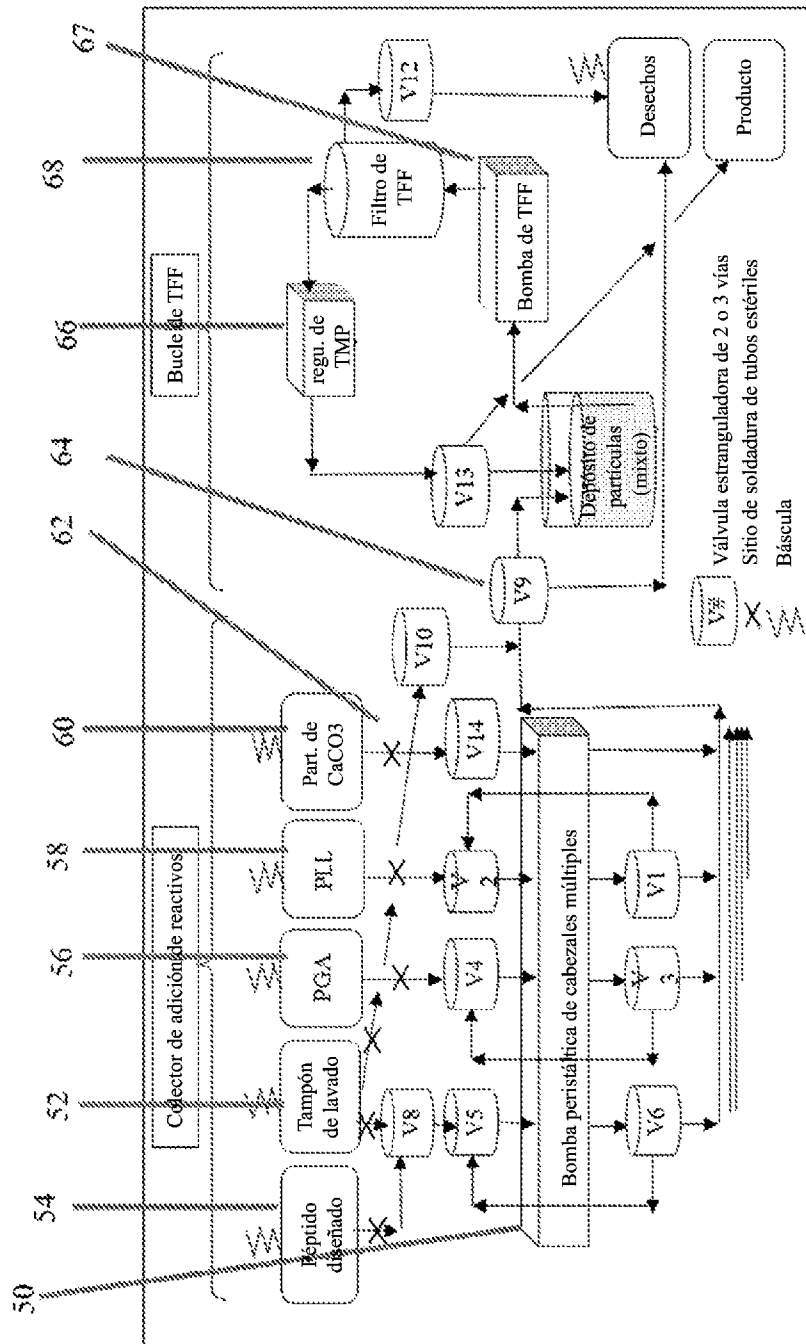


Figura 5

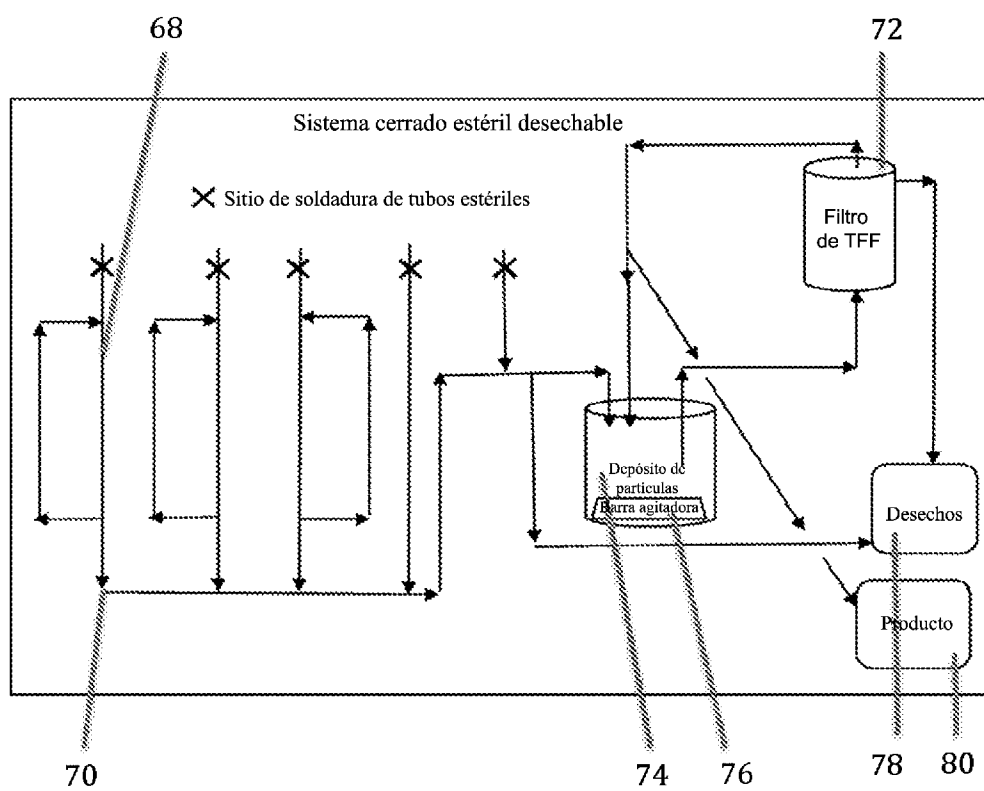


Figura 6

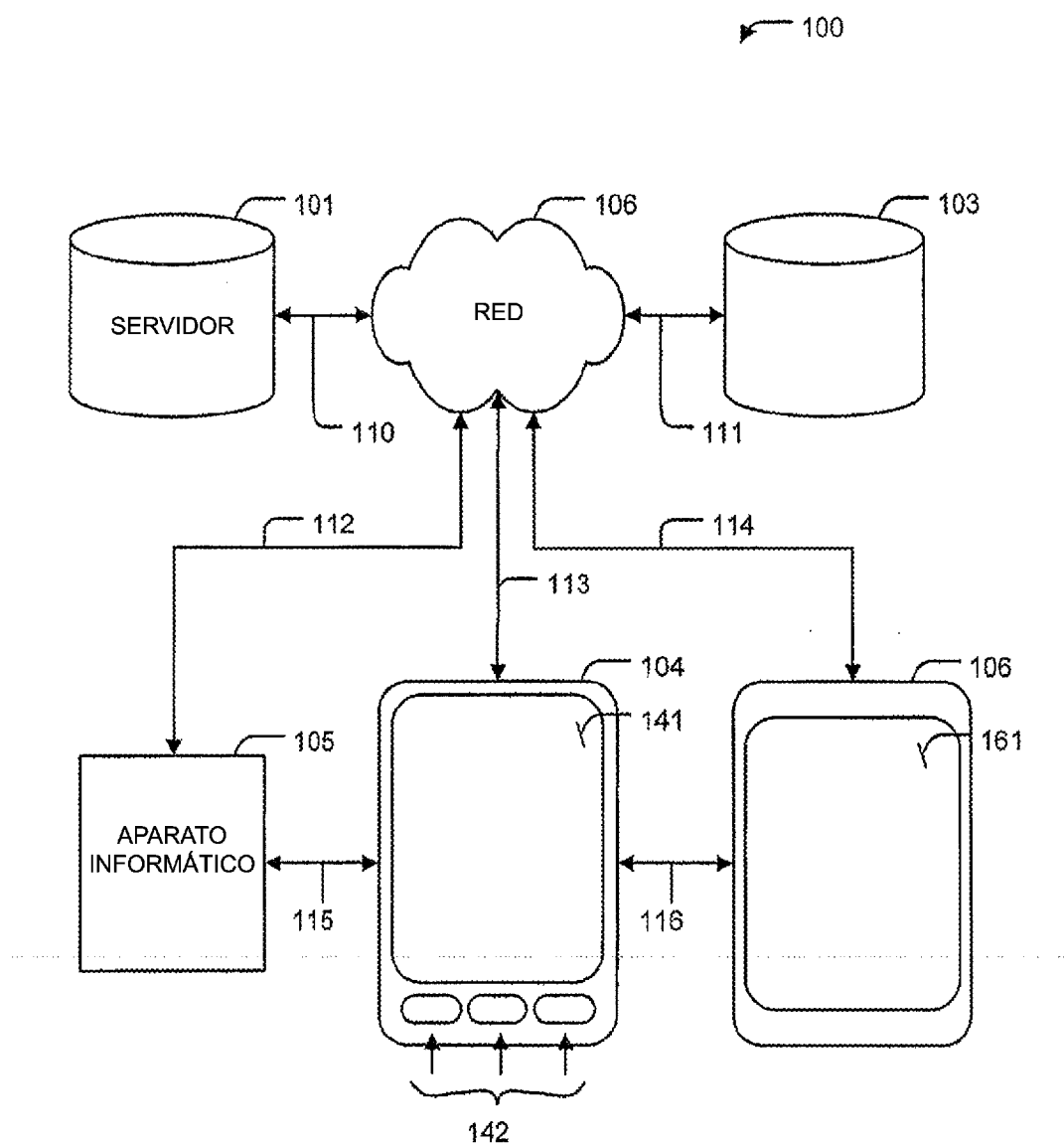


Figura 7

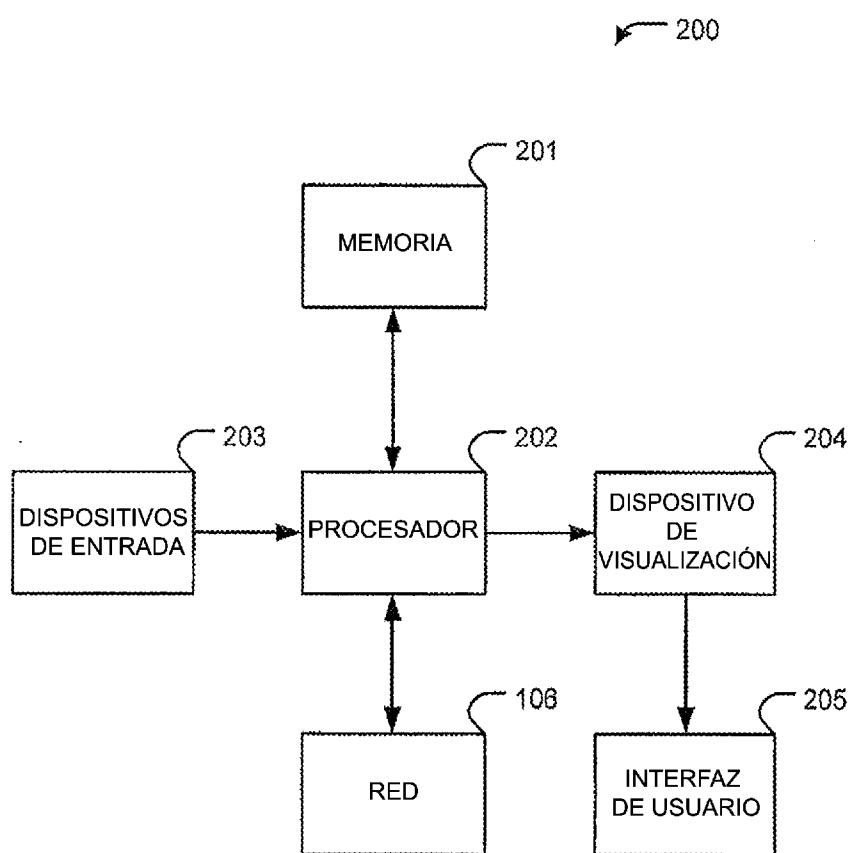
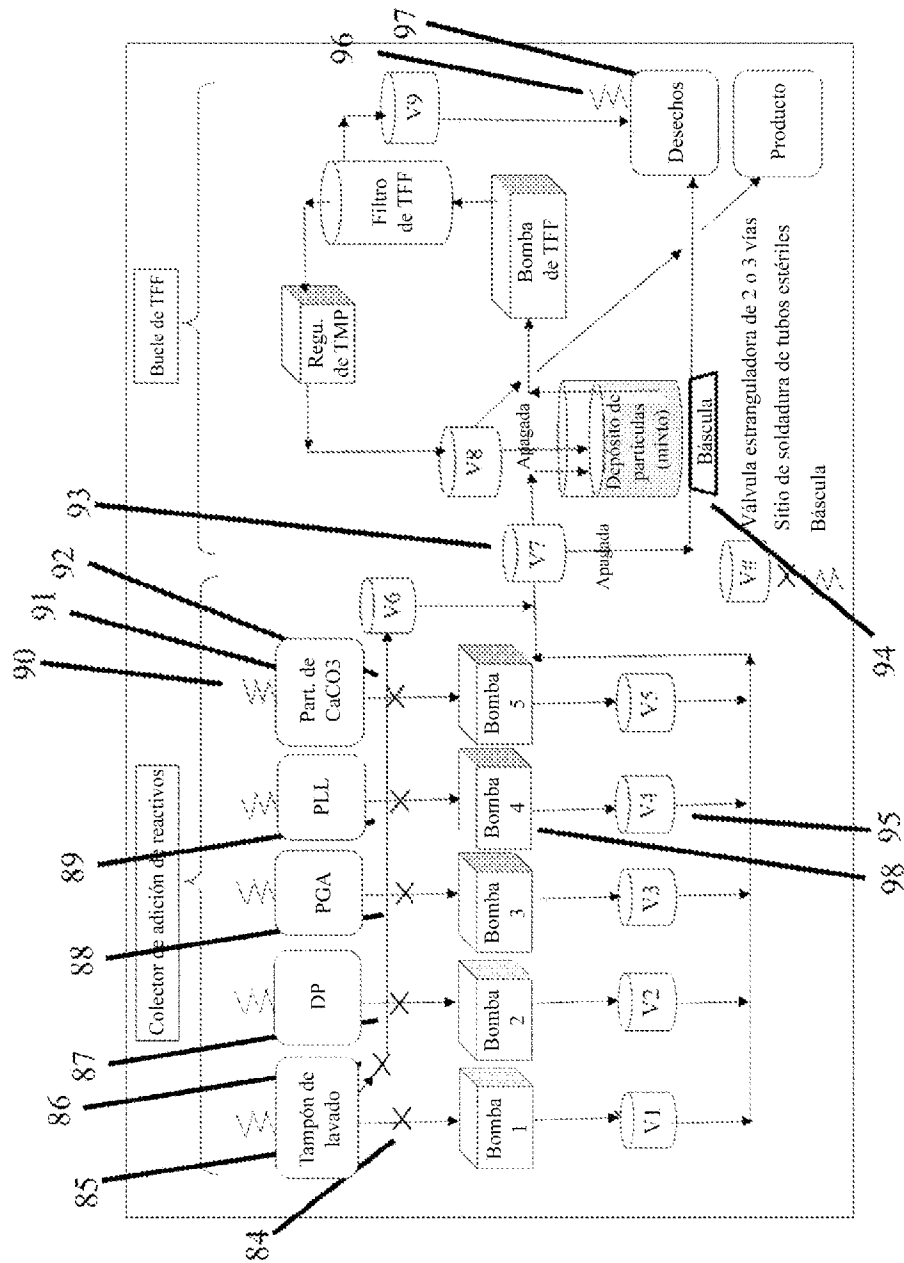


Figura 8



Figura 9



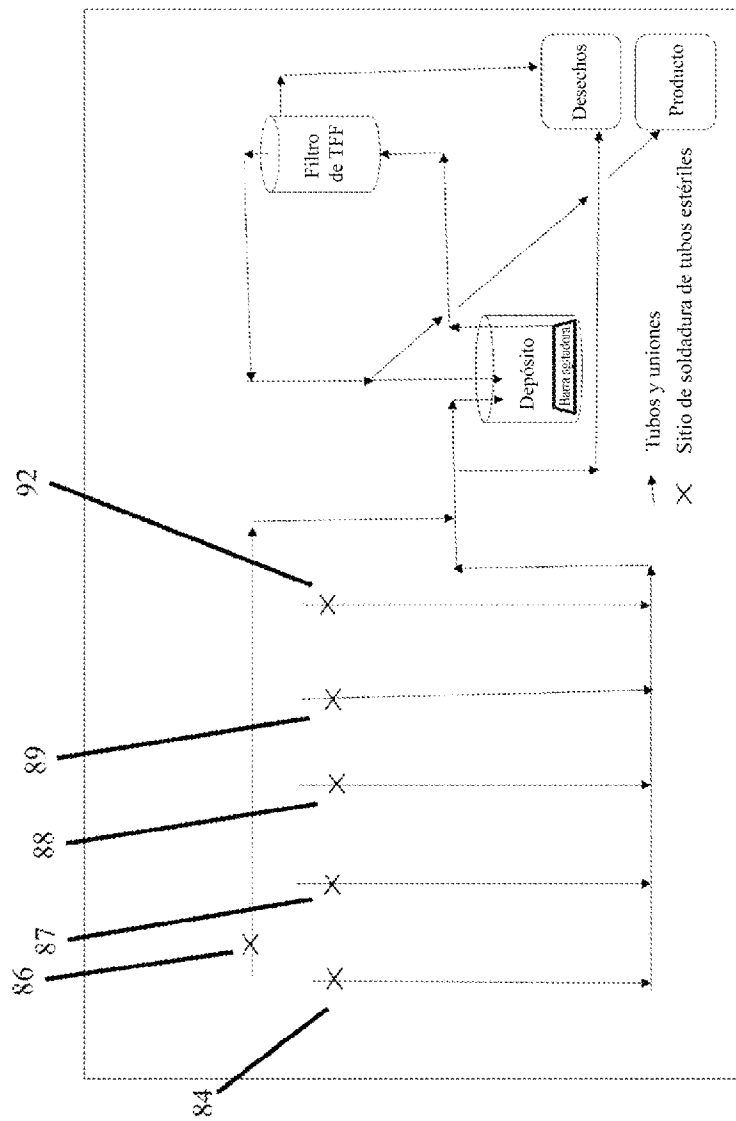


Figura 11

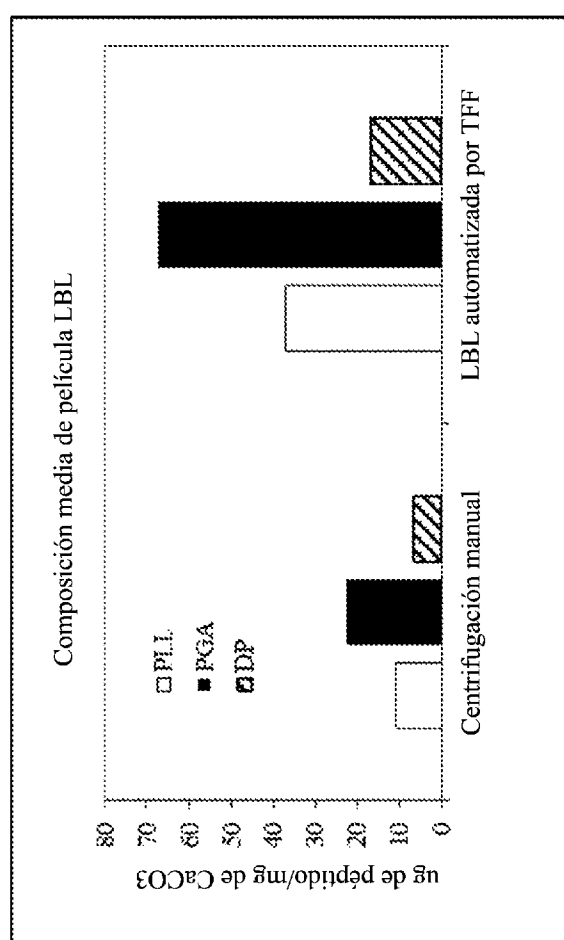


Figura 12

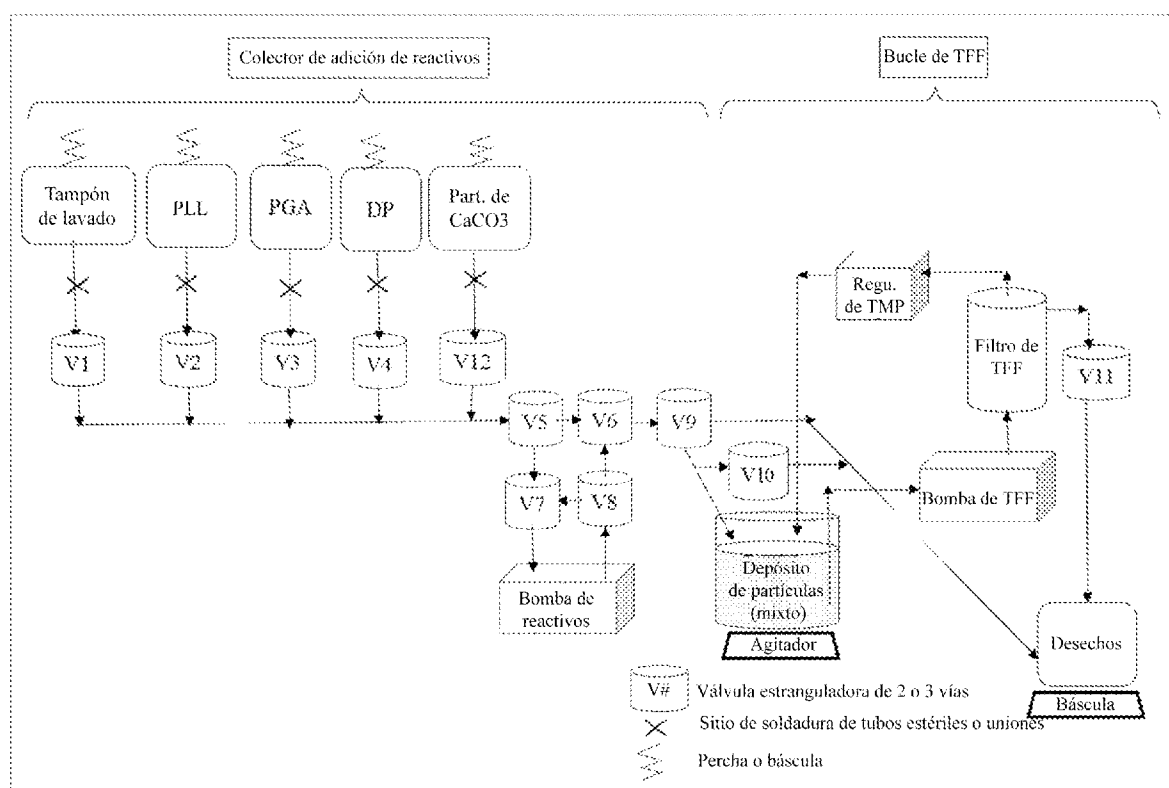


Figura 13

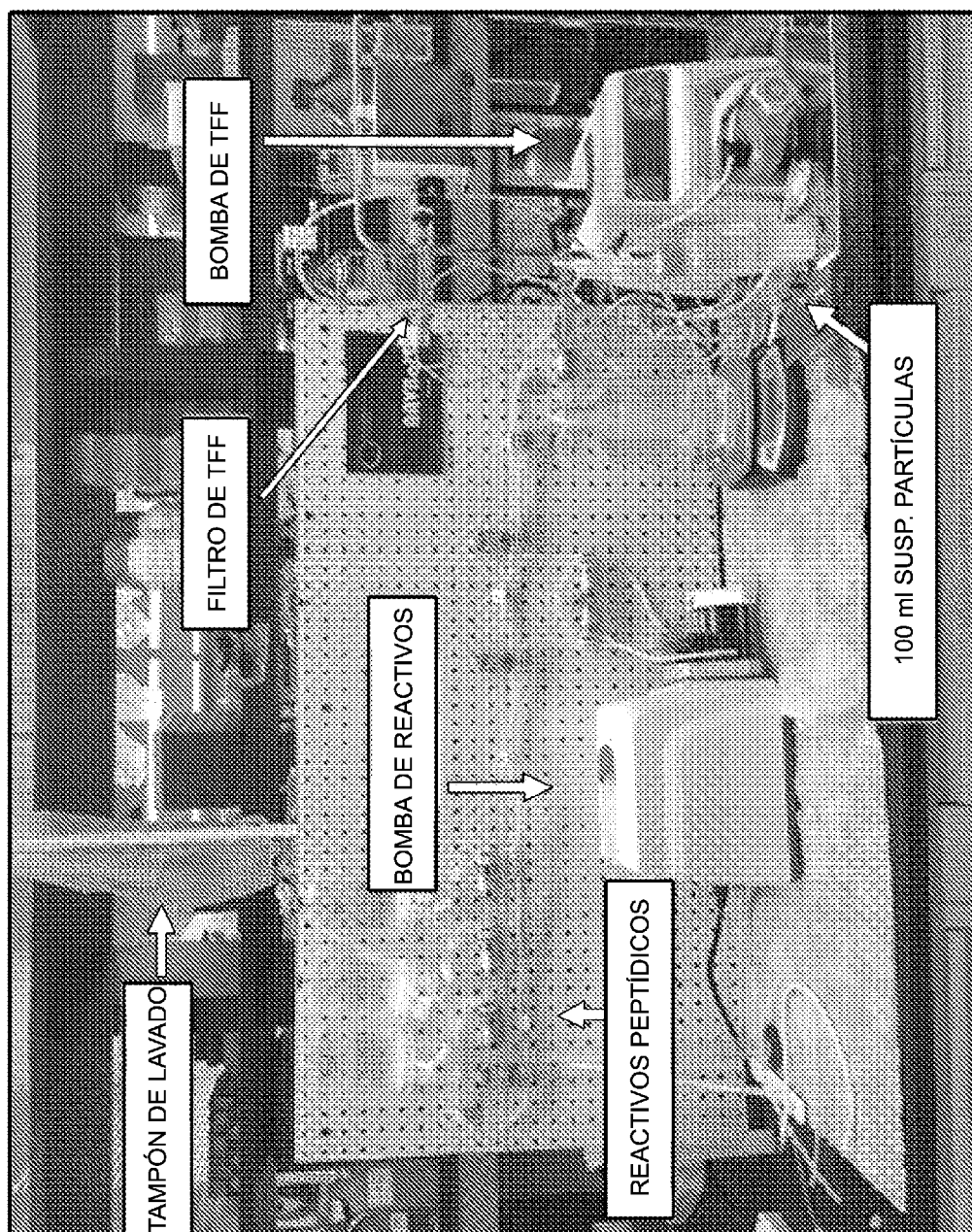


Figura 14

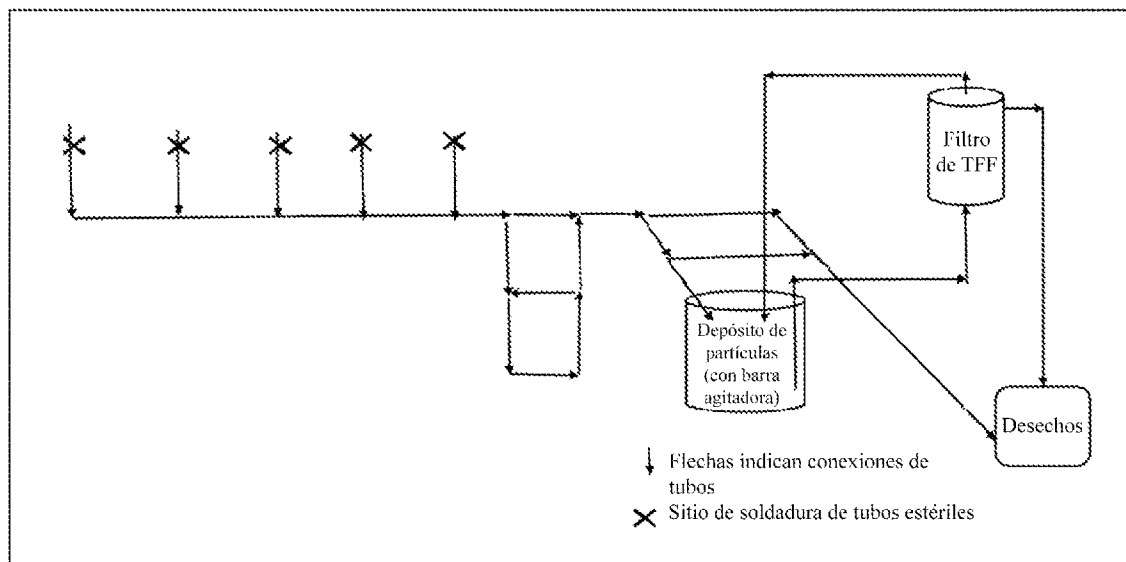


Figura 15

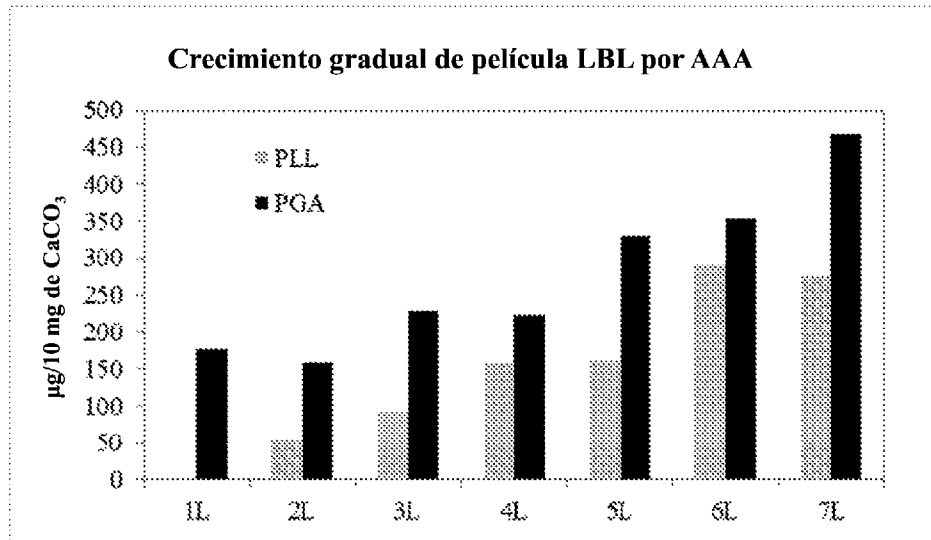


Figura 16A

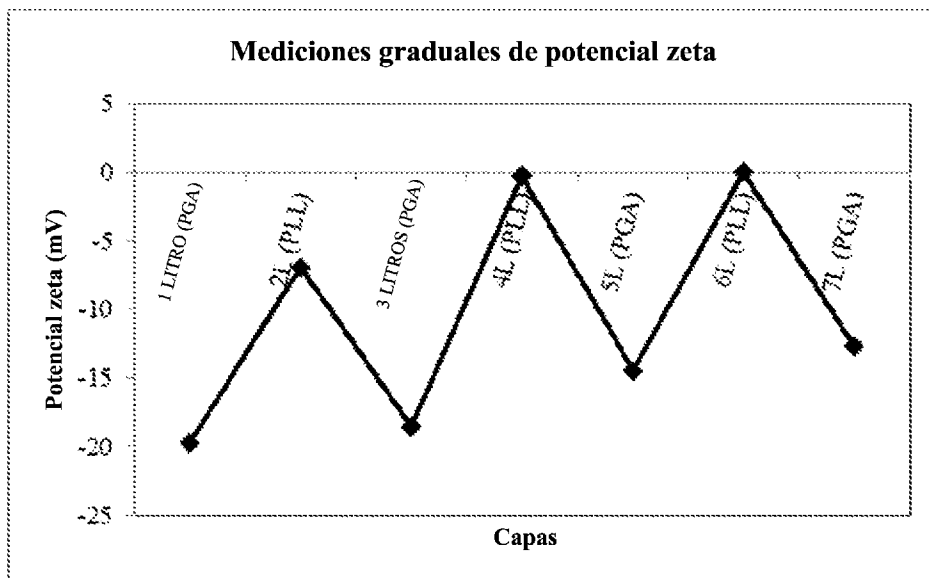


Figura 16B