

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 655**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2019 PCT/EP2019/062757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2019 WO19219890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2019 E 19723461 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024 EP 3794013**

54 Título: **Método y sistema de extracción de proteínas**

30 Prioridad:

**17.05.2018 EP 18172904**

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

**28.08.2024**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING AG (100.0%)  
Wankdorfstrasse 10  
3014 Bern, CH**

72 Inventor/es:

**EL MENYAWI, IBRAHIM**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 977 655 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

Método y sistema de extracción de proteínas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método y sistema para extraer proteínas de precipitados, particularmente proteínas recombinantes y/o derivadas de plasma, incluyendo inmunoglobulinas (Ig) como la inmunoglobulina G (IgG).

10 Antecedentes de la invención

La demanda de proteínas purificadas, como los anticuerpos específicos, ha aumentado considerablemente. Estas proteínas purificadas pueden utilizarse con fines terapéuticos y/o de diagnóstico.

15 El plasma sanguíneo humano se ha utilizado industrialmente durante décadas para la producción de productos de proteínas plasmáticas ampliamente establecidos y aceptados como, p. ej., albúmina humana (HSA), inmunoglobulina (IgG), concentrados de factores de coagulación (Factor VIII de coagulación, Factor IX de coagulación, complejo de protrombina, etc.) e inhibidores (antitrombina, inhibidor de C1, etc.). En el curso del desarrollo de tales fármacos derivados del plasma, se han establecido métodos de fraccionamiento del plasma, que conducen a productos intermedios  
20 enriquecidos en ciertas fracciones proteicas, que luego sirven como composición de partida para el/los producto/s plasma-proteico/s. Los procesos típicos se revisan en, p. ej., Molecular Biology of Human Proteins (Schultze H.E., Heremans J.F.; Volumen I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317) y se ofrecen esquemas simplificados de dichos procesos. Este tipo de tecnologías de separación permiten la producción de varios productos proteínicos plasmáticos terapéuticos a partir de la misma reserva de donantes de plasma. Esto es  
25 económicamente ventajoso frente a la producción de un único producto plasma-proteína a partir de una reserva de donantes, y por ello se han adoptado como estándar industrial en el fraccionamiento del plasma sanguíneo.

En particular, el fraccionamiento en etanol frío del plasma fue iniciado por E.J Cohn y su equipo durante la Segunda Guerra Mundial, principalmente para la purificación de la albúmina (Cohn EJ, et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459-475).  
30 El proceso de fraccionamiento de Cohn consiste en aumentar la concentración de etanol por etapas, del 0% al 40%, al tiempo que se reduce el pH de neutro (pH 7) a aproximadamente 4,8, lo que provoca la precipitación de la albúmina. Aunque el fraccionamiento de Cohn ha evolucionado durante los últimos 70 años aproximadamente, la mayoría de los procesos comerciales de fraccionamiento de plasma se basan en el proceso original o en una variación del mismo (p. ej., Kistler / Nitschmann), aprovechando las diferencias de pH, fuerza iónica, polaridad del disolvente y concentración de alcohol para separar el plasma en una serie de fracciones principales de proteínas precipitadas (como las fracciones I a V en Cohn).

Se han desarrollado variaciones del fraccionamiento de Cohn con el objetivo de mejorar las recuperaciones de IgG polivalente. Por ejemplo, Oncley y colaboradores utilizaron las fracciones II+III de Cohn como material de partida con  
40 diferentes combinaciones de etanol frío, pH, temperatura y concentración de proteínas a las descritas por Cohn, para producir una fracción de suero de inmunoglobulina activa (Oncley et al., (1949) J. Am. Chem. Soc. 71, 541-550). Hoy en día, el método Oncley es el método clásico utilizado para la producción de IgG polivalentes. Sin embargo, se sabe que aproximadamente el 5% de las gamma-globulinas (porción rica en anticuerpos) se coprecipita con la Fracción I y alrededor del 15% de la gamma-globulina total presente en el plasma se pierde en la etapa de la Fracción II+III (Ver Tabla III, Cohn EJ, et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459-475). El método Kistler/Nitschmann pretendía mejorar la recuperación de IgG reduciendo el contenido de etanol de algunas de las etapas de precipitación (Precipitación B frente a Fracción III). Sin embargo, el aumento del rendimiento se produce a expensas de la pureza (Kistler & Nitschmann, (1962) Vox Sang. 7, 414-424).

50 Inicialmente, los preparados de inmunoglobulina G (IgG) derivados de estos procesos de fraccionamiento se utilizaron con éxito para la profilaxis y el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Sin embargo, como el fraccionamiento en etanol es un proceso relativamente rudimentario, los productos de IgG contenían impurezas y agregados hasta el punto de que sólo podían administrarse por vía intramuscular. Desde entonces, las mejoras adicionales en los procesos de purificación han dado lugar a preparados de IgG adecuados para la administración intravenosa (denominada IVIg) y subcutánea (denominada SCIG).

Se calcula que en 2010 se procesaron en todo el mundo aproximadamente 30 millones de litros de plasma, de los que se obtuvieron diversos productos terapéuticos, como aproximadamente 500 toneladas de albúmina y 100 toneladas de IGIV. El mercado de IGIV representa aproximadamente el 40-50% de todo el mercado de fraccionamiento de plasma (P. Robert, Worldwide supply and demand of plasma and plasma derived medicines (2011) J. Blood and Cancer, 3, 111-120). Por lo tanto, dado que la demanda de IGIV sigue siendo elevada (junto con la creciente demanda de SCIG), sigue siendo necesario mejorar la recuperación de inmunoglobulinas a partir de plasma y fracciones relacionadas. Preferiblemente, esto debe conseguirse de forma que se garantice que la recuperación de otras proteínas terapéuticas derivadas del plasma no se vea afectada negativamente.

65 Desde un punto de vista comercial, los procesos de fraccionamiento iniciales son críticos para el tiempo de producción

global y los costes asociados a la producción de una proteína terapéutica, en particular las proteínas derivadas del plasma, ya que las etapas de purificación posteriores dependerán del rendimiento y la pureza de la(s) proteína(s) de interés dentro de estas fracciones iniciales. Aunque se han desarrollado diversas variaciones del proceso de fraccionamiento en frío con etanol para las proteínas derivadas del plasma con el fin de mejorar el rendimiento proteínico con menores costes de explotación, los mayores rendimientos proteínicos suelen ir asociados a una menor pureza. La presente invención proporciona un método de fraccionamiento de precipitados que contienen proteínas, en particular inmunoglobulina G, que consigue un mayor rendimiento. En determinadas realizaciones, la recuperación mejorada de la proteína de interés se consigue minimizando el nivel de impurezas y/o pérdidas en otras proteínas terapéuticas.

Una de las técnicas de separación ampliamente utilizadas en el campo del fraccionamiento del plasma/biotecnología es la filtración por membrana, en la que la filtración por membrana es un proceso de separación impulsado por presión para separar componentes en función de su tamaño y/o su carga. Existen dos métodos principales de filtración por membrana, a saber: i) filtración de paso único o de flujo directo; y ii) filtración de flujo cruzado o tangencial.

Los sistemas convencionales de flujo tangencial están diseñados para controlar el patrón de flujo de fluido de una corriente de alimentación con el fin de mejorar el transporte del soluto retenido lejos de la superficie fija de la membrana y de vuelta a la mayor parte de la alimentación. De este modo, la corriente de alimentación puede recircularse a altas velocidades en un vector tangencial al plano de la membrana para aumentar el coeficiente de transferencia de masa y permitir la retrodifusión y limpiar la superficie de la membrana para evitar la obstrucción. En estos procesos de filtración se aplica un diferencial de presión a lo largo de la membrana para hacer que el fluido y los solutos filtrables fluyan a través del filtro. La solución puede pasarse repetidamente por la membrana, mientras que el fluido que atraviesa el filtro se extrae continuamente hacia una unidad separada. Sin embargo, existen limitaciones en el grado de purificación de proteínas alcanzable debido principalmente a los fenómenos de polarización de la concentración, ensuciamiento y a la distribución relativamente amplia en el tamaño de los poros de la mayoría de las membranas. Por lo tanto, se sabe que el uso eficaz de las capacidades de fraccionamiento macromolecular de las membranas de ultrafiltración para la resolución a gran escala de mezclas macromoleculares como las proteínas del plasma sanguíneo no suele ser práctico.

El documento US 2004/0167320 describe un proceso y un aparato para separar moléculas, incluidas inmunoglobulinas, de mezclas complejas como la leche (que normalmente contiene un 87% de agua y un 13% de sólidos) utilizando métodos convencionales de filtración de flujo tangencial y microfiltración. El proceso comprende una clarificación, una concentración/filtración y una etapa de filtración aséptica en la que se emplean tres operaciones de unidades de filtración. La etapa de clarificación elimina las partículas más grandes del producto y la etapa de concentración/filtración elimina la mayoría de las moléculas pequeñas para aumentar la pureza y reducir el volumen de la composición del producto resultante. Las etapas de clarificación y concentración/filtración se realizan bombeando la alimentación en un bucle para concentrar el retentado o el permeado. La primera y la segunda etapa están dimensionadas y programadas para ser procesadas conjuntamente, de modo que el permeado de la segunda etapa se devuelve a la primera y se mezcla con el retentado de la primera. Una vez acumulado el 95% del producto en el retentado de la ultrafiltración, se detiene la clarificación y se inicia una concentración/ diafiltración del material de ultrafiltración, en la que se concentra el producto y se añade tampón al depósito de alimentación de la ultrafiltración para lavar la mayor parte de las proteínas de pequeño peso molecular.

El documento US 2011/0130545 A1 divulga un proceso para producir composiciones de inmunoglobulina A secretora (S-IgA) a partir de leche que contiene S-IgA que utiliza una o más etapas de filtración por membrana microporosa. El proceso comprende etapas de desgrasado, microfiltración y ultrafiltración a través de una serie de ciclos de diafiltración, en los que el retentado microfiltrado se combina con un líquido de diafiltración. La combinación de retentado microfiltrado y líquido de diafiltración se somete a continuación a etapas posteriores de microfiltración y concentración. El proceso utilizado es una diafiltración continua. El proceso divulgado se basa en la técnica de filtración por membrana, en la que la característica esencial es que las partículas suspendidas en una corriente de alimentación líquida se separan en función de su tamaño.

El documento EP1262225 divulga un sistema continuo para la producción de una emulsión utilizando una o más membranas a través de las cuales un líquido se dispersa continuamente en otro líquido para conseguir una fase continua.

Existe la necesidad de un método y un sistema mejorados para la producción a escala industrial de proteínas como las inmunoglobulinas a partir de material precipitado que contenga inmunoglobulinas, por ejemplo derivado de plasma o suero, que deben cumplir estrictas normas de seguridad. Las tecnologías posteriores utilizadas actualmente son relativamente caras y su rendimiento no es óptimo. Además, los sistemas de filtración convencionales con membranas fijas tienen tendencia a ensuciarse rápidamente en presencia de soluciones que contienen precipitados de proteínas resuspendidas; estos son algunos de los problemas que hay que superar. Por lo tanto, existe una necesidad crucial de desarrollar métodos más eficaces, económicos y rápidos para la extracción y purificación de proteínas como las inmunoglobulinas a partir de suspensiones que contengan proteínas.

#### Resumen de la invención

El inventor de la presente invención ha encontrado una solución eficaz para los problemas antes mencionados mediante la introducción de un nuevo método y un nuevo sistema, en particular la primera unidad de proceso, como se reivindica

actualmente. El método según la invención proporciona una solución rentable, de alta eficiencia y fiable a los problemas existentes.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para extraer una proteína de interés de un precipitado, que comprende:

- a. mezclar el precipitado con un líquido en un primer depósito para formar una suspensión que tenga un primer factor de dilución;
- b. introducir la suspensión en una primera unidad de filtración que comprende un elemento filtrante dinámico adaptado para producir un primer retentado y un primer permeado enriquecidos con la proteína de interés;
- c. diluir la suspensión en el primer depósito añadiendo líquido hasta un segundo factor de dilución, opcionalmente vertiendo el primer retentado en el primer depósito; y
- d. recuperar el primer permeado enriquecido con la proteína de interés en un segundo depósito.

La precipitación de proteínas se utiliza ampliamente en el procesamiento posterior de productos biológicos para concentrar proteínas y purificarlas de diversos contaminantes. El mecanismo subyacente de la precipitación consiste en alterar el potencial de solvatación del disolvente, más concretamente, disminuyendo la solubilidad del soluto (es decir, la proteína) mediante la adición de un reactivo y/o la modulación de las condiciones (p. ej., como el pH o la conductividad). El precipitado resultante es un sólido insoluble que comprende la proteína de interés. A menudo se presenta en forma de gránulos o pasta. A veces, el precipitado puede emerger en forma de suspensión. A continuación, la porción sólida puede recogerse, por ejemplo, por filtración y/o centrifugación. Alternativamente, dicha suspensión puede añadirse directamente al primer depósito para formar el primer factor de dilución. Otra opción es añadir la suspensión al primer depósito y, a continuación, añadir líquido al primer depósito para formar el primer factor de dilución. Así, en una realización particular, el precipitado que comprende la proteína de interés está en forma de suspensión cuando se añade al primer depósito.

Este método es especialmente adecuado a escala industrial para producir la proteína de interés. Según una realización del primer aspecto de la presente invención, el método para extraer proteínas es un proceso a escala industrial.

En otra realización, el precipitado que comprende la proteína de interés es un producto intermedio de un proceso de fraccionamiento alcohólico, preferentemente de plasma sanguíneo, más preferentemente de plasma sanguíneo humano. En realizaciones preferidas, el precipitado se obtiene a partir de un plasma humano. Aún más preferentemente, el precipitado se obtiene a partir de 2500L a 6000L de un material de partida de plasma humano.

Según otra realización del primer aspecto de la presente invención, el precipitado es una fracción plasmática (intermedio). En determinadas realizaciones, la fracción es una fracción de Cohn. En una realización preferida, la fracción plasmática se selecciona del grupo que consiste en Fracción I de Cohn (Fr I), Fracción II+III de Cohn (Fr II+III), Fracción I+II+III de Cohn (Fr I+II+III), Fracción II de Cohn (Fr II), Fracción III de Cohn (Fr III), Fracción IV de Cohn (Fr IV), Fracción V de Cohn (Fr V), Precipitado A de Kistler/Nitschmann (KN A), Precipitado B de Kistler/Nitschmann (KN B), Precipitado C de Kistler/Nitschmann (KN C). En una realización particularmente preferida, la fracción plasmática se selecciona del grupo que consiste en la Fracción I de Cohn (Fr I), la Fracción II+III de Cohn (Fr II+III), la Fracción I+II+III de Cohn (Fr I+II+III), o el Precipitado A de Kistler/Nitschmann (KN A). La fracción plasmática puede ser una combinación de diferentes fracciones. Por ejemplo, la fracción plasmática puede ser una combinación de KN A y una o más de Fr I, Fr II+III y Fr I+II+III. En otra realización, el precipitado es un precipitado de ácido octanoico.

En otra realización, el precipitado que contiene proteínas se obtiene a partir de un sobrenadante de cultivo o de un material de partida de fermentación. En algunas realizaciones, el material de partida es leche que contiene la proteína de interés. En otras realizaciones, el material de partida no es la leche.

Según otra realización, la proteína de interés es una inmunoglobulina, preferiblemente inmunoglobulina G humana (IgG), como la inmunoglobulina G de plasma humano o una inmunoglobulina G producida recombinantemente.

Según otra realización de la presente invención, la suspensión se produce mezclando el precipitado que contiene proteínas con un líquido como un tampón o agua, proporcionando así la composición de partida con el primer factor de dilución. Cuando el precipitado que contiene proteínas es casi sólido (p. ej., una pasta muy espesa, un gránulo, etc.), la adición de un líquido al precipitado que contiene proteínas permite formar una suspensión como composición de partida.

La suspensión que tiene un primer factor de dilución de la etapa a) es una mezcla en la que las partículas similares al soluto, a veces denominadas aquí sólidos, están presentes en la solución. El tamaño de las partículas puede variar e incluye partículas de mayor tamaño que acabarán sedimentando si la solución no se mezcla o partículas de menor tamaño que no sedimentan (es decir, en forma de coloide).

El primer factor de dilución puede denominarse a veces porcentaje de sólidos en peso (% p/v). Se define como el peso de sólidos secos en un volumen determinado de la suspensión, dividido por el peso total de ese volumen de la suspensión, multiplicado por 100. En determinadas realizaciones, el porcentaje de sólidos por peso de la suspensión de la etapa a) es de al menos el 5% (es decir, un primer factor de dilución de aproximadamente 1:20), o de al menos el 7,5%, o de al menos el 10%, o de al menos el 12,5%, o de al menos el 15%, o de al menos el 17,5%, o de al menos el 20%, o de al menos el 22,5%, o de al menos el 25%, o de al menos el 27,5%, o de al menos el 30%, o de al menos el 35%, o de al menos el

40%, o de al menos el 50%. En algunas realizaciones, el porcentaje de sólidos por peso de la suspensión de la etapa a) es del 10% al 30%. En algunas realizaciones, el porcentaje de sólidos por peso de la suspensión de la etapa a) es del 15% al 25%. En realizaciones preferidas, el porcentaje de sólidos por peso de la suspensión de la etapa a) es del 17,5% al 22,5%. En una realización particular, el porcentaje de sólidos por peso de la suspensión de la etapa a) es del 20%.

Según otra realización de la presente invención, el primer factor de dilución es al menos 3 (1:3; partes precipitado:total), preferentemente entre 1 y 10, preferentemente entre 3 y 9, preferentemente entre 3 y 5, preferentemente alrededor de 3, 5, 6, 7, 9 ó 10. Por ejemplo, cuando el precipitado que contiene proteínas es un gránulo o una pasta, y en particular una pasta muy espesa (con una viscosidad muy alta), se necesita un líquido para suspender la pasta o el gránulo.

Por ejemplo, cuando el primer factor de dilución es 3 (1:3; 1 parte del precipitado que contiene proteínas:total), esto equivale a una relación de dilución de 1:2 (1 unidad de volumen de soluto (el material que debe diluirse) con 2 unidades de volumen del diluyente para dar 3 unidades totales de volumen total).

En otra realización, el primer factor de dilución (precipitado que contiene proteínas:total) en el primer depósito es de al menos 40, o al menos 30, o al menos 20, o al menos 17,5, o al menos 15, o al menos 12...5, o al menos 10, o al menos 9, o al menos 8, o al menos 7, o al menos 6, o al menos 5,5, o al menos 5, o al menos 4,5, o al menos 4, o al menos 3,5, o al menos 3, o al menos 2,5, o al menos 2, o al menos 1.5, o al menos 1.25. Preferentemente, el primer factor de dilución (precipitado que contiene proteínas:total) en el primer depósito es de al menos 4.

En algunas realizaciones, el primer factor de dilución (precipitado con proteínas:total) en el primer depósito está comprendido entre 1:1 y 1:20, o entre 1:2 y 1:20, o entre 1:3 y 1:20, o entre 1:4 a 1:20, o entre 1:5 y 1:20, o entre 1:6 y 1:20, o entre 1:7 y 1:20, o entre 1:8 y 1:20, o entre 1:10 y 1:20, o entre 1:1 y 1:15, o entre 1:2 y 1:15, o entre 1:3 y 1:15, o entre 1:4 y 1:15, o entre 1:5 y 1:15, o entre 1:6 y 1:15, o entre 1:7 y 1:15, o entre 1:8 y 1:15, o entre 1:10 a 1:15, o entre 1:1 y 1:10, o entre 1:2 y 1:10, o entre 1:3 y 1:10, o entre 1:4 y 1:10, o entre 1:5 y 1:10, o entre 1:6 a 1:10, o entre 1:7 y 1:10, o entre 1:8 y 1:10, o entre 1:9 y 1:10, o entre 1:3 y 1:7, o entre 1:3 y 1:8, o entre 1:3 y 1:9, o entre 1:4 y 1:7, o entre 1:4 y 1:8, o entre 1:4 y 1:9, o entre 1:5 y 1:7, o entre 1:5 y 1:8, o entre 1:5 y 1:9, o entre 1:35 a 1:5, o entre 1:4 y 1:5, o entre 1:1 y 1:3. Preferiblemente 1:9, 1:7, 1:5 o más preferiblemente 1:3 o 1:1.

De manera adecuada, la proteína en un precipitado que comprende proteína después de la resuspensión está en una concentración de aproximadamente 5-100 g/L, preferiblemente 10-50 g/L o más preferiblemente 25-45 g/L. Esto incluye 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 g/L y cualquier rango entre estas cantidades. En otras realizaciones, la proteína puede estar en una concentración de aproximadamente 5-20 g/L, p. ej., aproximadamente 8-12 g/L.

Según una realización preferida, la suspensión en el primer depósito tiene un pH de entre aproximadamente 3,0 y 9,0, preferentemente entre aproximadamente 4,0 y 7,0, entre aproximadamente 4,0 y 6,0, entre aproximadamente 4,0 y 5,0, entre aproximadamente 4,3 y 4,9, entre aproximadamente 4,4 y 4,8, más preferentemente entre aproximadamente 5,0. En general, el pH se mide en la solución antes de añadir el precipitado proteínico a la solución; o directamente después de mezclar el precipitado proteínico con la solución. Normalmente, el pH de la solución se mide justo después de mezclar los componentes precursores. Alternativamente, el pH también puede determinarse mediante cálculo basado en las cantidades y concentraciones previstas de los componentes de la mezcla.

Según una realización del primer aspecto de la presente invención, la suspensión se introduce continuamente en la primera unidad de filtración. En una realización preferida, la suspensión se introduce continuamente en la primera unidad de filtración hasta que la suspensión se haya diluido al menos hasta el segundo factor de dilución. En otra realización de la presente invención, el proceso de separación continua es un proceso de filtración continua en el que se pueden utilizar una o más membranas de filtración o diferentes tipos de membranas de filtración. El proceso de filtración continua, como la filtración dinámica de flujo cruzado, puede minimizar el riesgo de que se bloqueen los elementos filtrantes.

Como el método del primer aspecto de la invención implica añadir líquido adicional a la suspensión en el primer depósito, el segundo factor de dilución es mayor que el primer factor de dilución.

Según una realización del primer aspecto de la presente invención, el segundo factor de dilución (volumen de precipitado que contiene proteínas en relación con el volumen total de líquido recirculado) está comprendido entre 6 y 70, entre 10 y 70, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, preferentemente entre 20 y 50. En otras realizaciones, el segundo factor de dilución es aproximadamente 60, o aproximadamente 70 (1:70; partes de precipitado que contiene proteínas:total). En determinadas realizaciones, el segundo factor de dilución es de al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 60, o al menos 70. El inventor de la presente invención descubrió que unos factores de dilución tan elevados podían mejorar la eficacia de la extracción, obteniendo así un rendimiento mejorado.

En otra realización, el valor predeterminado de concentración de proteína en la suspensión es inferior a 0,1 g/L, preferiblemente entre 0,001 y 0,1 g/L; típicamente entre 0,05 y 0,1 g/L. Dicho valor se proporciona de forma que el proceso de separación pueda finalizar inmediatamente una vez alcanzado dicho umbral para evitar procesos de extracción y filtración ineficaces. Por ejemplo, cuando la concentración total de proteína en la suspensión o la solución es inferior a 0,1

g/L, se estima que la cantidad total de IgG es inferior a aproximadamente 40-50 mg/L, lo que hace menos económico continuar con la extracción y filtración continuas del producto de interés.

5 Según una realización del primer aspecto de la presente invención, el elemento filtrante dinámico de la primera unidad de filtración es un elemento filtrante dinámico de flujo cruzado. En una realización preferida, el elemento filtrante de flujo transversal dinámico es un elemento filtrante de flujo transversal rotativo. Más preferiblemente, el elemento filtrante de flujo transversal rotativo comprende un disco filtrante. Los discos filtrantes suelen estar montados sobre un miembro de eje. En una realización, el elemento filtrante de flujo transversal rotativo comprende al menos un disco filtrante y al menos un miembro de eje.

10 Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la membrana del disco filtrante es una membrana cerámica. Más preferiblemente, la membrana cerámica tiene un tamaño de poro en el rango de mayor o igual a 50 nm a menor o igual a 100 nm. Estos discos filtrantes son suministrados por Kerafol y Flowserve.

15 La primera unidad de filtración en realizaciones preferidas comprende un recipiente a presión. La suspensión del primer depósito puede introducirse continuamente en el recipiente a presión a través de un orificio de entrada. Puede conseguirse una distribución uniforme de la suspensión en el recipiente utilizando un colector de distribución. De ahí que, en determinadas realizaciones, el recipiente a presión comprenda un colector de distribución. En algunas realizaciones, la primera unidad de filtración comprende un elemento filtrante de flujo cruzado rotativo. Preferiblemente, el elemento filtrante contiene más de un disco filtrante espaciado uniformemente a lo largo de al menos un eje central hueco de recogida. Los discos filtrantes pueden disponerse horizontal o verticalmente. Cuando están en orientación horizontal, están espaciadas a lo largo de un eje colector hueco orientado verticalmente. El eje de recogida y los discos son giratorios. La suspensión en el recipiente a presión puede entonces penetrar la membrana exterior de los discos filtrantes giratorios para pasar a través de una porción central hueca del disco que, a su vez, se canaliza hacia el eje central de recogida. Típicamente, el filtrado (es decir, el primer permeado enriquecido en la proteína de interés) puede entonces extraerse de la parte del eje de la primera unidad de filtración a través de un puerto embrizado. Mientras que el retentado que queda en la carcasa a presión puede salir del recipiente a través de un orificio de salida. Generalmente, el retentado se recircula al primer depósito para diluir la suspensión. De este modo, el retentado de la primera unidad de filtración puede utilizarse para diluir la suspensión en el primer depósito hasta un segundo factor de dilución.

20 La filtración dinámica de flujo cruzado, como la filtración rotacional, proporciona la máxima eficacia filtrante. El efecto de flujo cruzado (limpieza por flujo tangencial de la superficie del filtro) se genera mediante la rotación de los discos filtrantes y no mediante el bombeo de grandes volúmenes a través de una membrana fija, como se utiliza en los sistemas convencionales (estáticos) de filtración de flujo cruzado. Las velocidades extremas de flujo cruzado generadas en las superficies de los discos filtrantes giratorios garantizan una limpieza muy eficaz de la superficie del filtro, al tiempo que consumen cantidades muy reducidas de energía en comparación con las técnicas convencionales de flujo cruzado.

25 La temperatura influye en la viscosidad de una solución proteica y también en el flujo tras la filtración con una membrana. La suspensión de partida que se utilizará en el método de la invención debe tener una temperatura comprendida entre 0 °C y la temperatura a la que se desnaturaliza la proteína en cuestión. La temperatura puede oscilar entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 50 °C. En determinadas realizaciones, la temperatura está comprendida entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 35 °C. Según una realización preferida, la temperatura en la primera unidad de proceso está controlada, preferiblemente entre 2 y 25 °C, más preferiblemente entre 2 y 10 °C. Dicha temperatura garantiza un proceso óptimo de extracción y separación, manteniendo la biorreactividad de la proteína de interés a lo largo de los procesos.

30 La filtración se realiza con una presión de filtración transmembrana que es igual o inferior al nivel que puede soportar la membrana, dependiendo del material de la membrana que se utilice en este caso, por ejemplo con presiones de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3 bares. La presión transmembrana suele ser de 0,1 a 2,5 bares, preferiblemente de 0,2 a 2,4 bares, más preferiblemente de 0,4 a 2,0 bares, de 0,5 a 1,8 bares, de 0,6 a 1,6 bares, de 0,6 a 1,5 bares, de 0,7 a 1,5 bares, más preferiblemente de 0,8 a 1,5 bares. Según otra realización, se suministra a la primera unidad de proceso una presión de hasta 2 bares, preferiblemente entre 0,1 y 2,0 bares, o alrededor de 1,5 bares, 1,0 bares o 0,5 bares.

35 Según otra forma de realización, el proceso de extracción continua se facilita aún más regulando el caudal y/o el tiempo de permanencia de la suspensión o la solución en la primera unidad de proceso y/o el caudal del primer retentado/refino y/o el caudal del primer permeado/extracto. Por ejemplo, en una realización, la velocidad lineal de la suspensión o la solución en el recipiente a presión (primera unidad de proceso) puede ser de aproximadamente 0,27 a 1,66 m/s. En otro ejemplo, la velocidad lineal del primer retentado puede ser de 0,25 a 1,33 m/s. En otro ejemplo, la velocidad lineal del primer permeado/extraído puede ser de 0,03 a 0,33 m/s. La velocidad lineal multiplicada por el área de la sección transversal da el caudal volumétrico. Además, puede crearse una turbulencia en la primera unidad de proceso como resultado de la velocidad de los discos filtrantes giratorios, en la que la velocidad (a veces denominada velocidad tangencial) puede estar comprendida entre 1 y 7 m/s aproximadamente. Según una realización de la presente invención, la velocidad de los filtros de disco giratorio está comprendida entre 1 y 10 m/s. En una realización preferida de la presente invención, la velocidad de los filtros de disco giratorio está comprendida entre 5 y 7 m/s. Más preferiblemente, la velocidad de los filtros de disco giratorio es de 7 m/s a 60 hercios (800 rpm). La velocidad de rotación del elemento filtrante

transversal rotativo está comprendida entre aproximadamente 600 rpm (50 Hz) y aproximadamente 1600 rpm (100 Hz), preferiblemente entre aproximadamente 800 rpm (60 Hz) y aproximadamente 1200 rpm (80 Hz), preferiblemente aproximadamente 800 rpm (60 Hz), aproximadamente 1000 rpm (70 Hz) o aproximadamente 1200 rpm (80 Hz). Tal como se utiliza aquí, la velocidad de rotación en Hz se refiere a la velocidad del motor. Esto puede correlacionarse con la velocidad en rpm utilizando una curva de calibración adecuada.

5

Este método permite realizar una extracción continua y un proceso de separación para maximizar la recuperación de la proteína de interés a partir del precipitado/material de partida. Gracias al proceso de extracción, casi toda la proteína de interés se extrae del precipitado proteico y se recupera en etapas posteriores. Este método también permite que el líquido o diluyente, p. ej., el tampón o el agua, recircule en un sistema cerrado, por lo que la cantidad de líquido se mantiene durante todo el proceso y se reducen las huellas (es decir, el volumen de los depósitos). Se estima que el método y el sistema aquí divulgados recuperan al menos el 95%, o típicamente al menos el 98% de la proteína de interés de la proteína de interés originalmente presente en el precipitado que contiene proteínas. Por lo tanto, en realizaciones particulares del primer aspecto de la presente invención, el método proporciona una recuperación de al menos el 95%, o al menos el 96%, o al menos el 97%, o al menos el 98% o al menos el 99% de la proteína de interés a partir del precipitado. En una realización preferida, la recuperación es de al menos el 97% de la proteína de interés a partir del precipitado.

10

15

El primer permeado del segundo depósito puede someterse a una etapa de concentración. Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el proceso de concentración es una ultrafiltración realizada en una segunda unidad de proceso.

20

Según una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el método comprende además someter el primer permeado en el segundo depósito a un proceso de concentración continua en una segunda unidad de filtración, produciendo así un segundo retentado enriquecido con la proteína de interés y un segundo permeado empobrecido de la proteína de interés.

25

Según una realización del primer aspecto de la presente invención, la segunda unidad de filtración comprende un elemento filtrante de flujo transversal dinámico.

En realizaciones preferidas de la invención, el elemento filtrante de flujo cruzado dinámico o el dispositivo filtrante de ultrafiltración comprende una membrana con un peso molecular de corte inferior al peso molecular de la proteína de interés. En estas realizaciones, el corte de la membrana se selecciona para retener la proteína de interés en el segundo retentado. Como guía general, puede seleccionarse un corte de membrana nominal al menos 3 veces inferior al peso molecular de la proteína de interés para garantizar la retención de la proteína en el retentado. En una realización, el elemento filtrante de flujo cruzado dinámico o el elemento filtrante de ultrafiltración estática comprende una membrana con un peso molecular de corte superior al peso molecular de la proteína de interés. En tales realizaciones, el corte nominal de la membrana se selecciona para garantizar que la proteína de interés atraviesa la membrana y se recoge en el segundo permeado.

30

De acuerdo con una realización del primer aspecto de la presente invención, el método comprende además la dilución de la suspensión en el primer depósito mediante el flujo continuo del segundo permeado o del segundo retentado empobrecido en la proteína de interés al primer depósito, contribuyendo así a que la suspensión se diluya hasta el segundo factor de dilución.

40

Según una realización del primer aspecto de la presente invención, el método comprende además la dilución de la suspensión en el primer depósito mediante el flujo continuo del retentado de la primera unidad de filtración y del segundo permeado de la segunda unidad de filtración en el primer depósito, diluyendo así la suspensión hasta el segundo factor de dilución.

45

Según otra realización preferida, se proporciona un segundo depósito para recibir el primer permeado y/o el segundo retentado, en el que la velocidad de flujo del primer permeado y del segundo permeado se controla de forma que se mantenga un volumen de producto sustancialmente constante en el segundo depósito. En determinadas realizaciones, se añade tampón fresco al primer depósito además del primer permeado y/o el segundo retentado.

50

Según una realización del primer aspecto de la presente invención, el primer permeado/extracto se recoge en un depósito de retención (segundo depósito), y una vez que la suspensión del primer depósito está completamente filtrada/extraída, el primer permeado/extracto del depósito de retención se somete al proceso de concentración continua. Esta etapa del método es especialmente adecuada para un proceso a escala industrial más pequeño en el que los volúmenes muertos en el equipo de producción y los tubos pueden afectar significativamente al rendimiento de la proteína de interés. Un ejemplo son los productos de inmunoglobulina hiperinmune.

55

60

Según una realización preferida del primer aspecto de la invención, se proporciona un método a escala industrial para extraer una proteína de interés en alto rendimiento de un precipitado, que comprende:

65

- a. mezclar el precipitado con un líquido en un primer depósito para formar una suspensión que tenga un primer factor de dilución;
- b. introducir la suspensión en una primera unidad de filtración que comprende un elemento filtrante de flujo cruzado

rotativo con un disco filtrante dotado de una membrana cerámica con un tamaño medio de poro comprendido entre 5 nm y 5000 nm; el elemento filtrante está adaptado para producir un primer retentado y un primer permeado enriquecido con la proteína de interés;

c. diluir la suspensión en el primer depósito añadiendo líquido hasta un segundo factor de dilución, en parte mediante el vertido del primer retentado en el primer depósito;

d. recuperar el primer permeado enriquecido con la proteína de interés en un segundo depósito; y

e. someter el primer permeado del segundo depósito a un proceso continuo de concentración en una segunda unidad de filtración que incluya un elemento filtrante de flujo cruzado, produciendo así un segundo retentado enriquecido con la proteína de interés y un segundo permeado empobrecido en la proteína de interés;

f. opcionalmente, diluir la suspensión en el primer depósito mediante el flujo continuo del segundo permeado al primer depósito, diluyendo así la suspensión hasta el segundo factor de dilución; y

g. devolver el segundo retentado enriquecido con la proteína de interés al segundo depósito y/o recoger el segundo retentado enriquecido con la proteína de interés. Según una realización preferida de la invención, el primer retentado y el segundo permeado se introducen continuamente en el primer depósito para diluir la suspensión hasta el segundo factor de dilución.

De acuerdo con una realización de la invención, la primera unidad de filtración comprende además un dispositivo de raspado ajustable adaptado para controlar la altura de la cama de ayuda de filtro y / o material precipitado en una superficie externa de la membrana de disco de filtro de cerámica.

De acuerdo con una realización de la invención, la primera unidad de filtración comprende más de un eje hueco adaptado para recoger el primer permeado, cada eje conectado al menos a un disco filtrante que comprende una membrana cerámica.

De acuerdo con una realización de la invención, la segunda unidad de filtración comprende un elemento filtrante de flujo cruzado dinámico. En otras realizaciones, la segunda unidad de filtración comprende un elemento filtrante estático de flujo cruzado. En una realización preferida, el elemento filtrante estático de flujo cruzado es un dispositivo de ultrafiltración que comprende una membrana que retiene la proteína de interés en el segundo retentado.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las etapas b) a c) o las etapas b) a f) se repiten hasta que se alcanza un segundo factor de dilución o un valor predeterminado de concentración de proteínas de la suspensión o la solución en el primer depósito. Este segundo factor de dilución predeterminado (a veces denominado factor de dilución final), que también puede determinarse utilizando un valor predeterminado de concentración de proteínas en el Depósito 1, garantiza que pueda cosecharse un rendimiento óptimo antes de que resulte demasiado antieconómico continuar con el proceso de extracción. La concentración de proteína puede controlarse en el Depósito 1 mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluida la absorbancia UV, por ejemplo a 280 nm.

Opcionalmente, se puede emplear un coadyuvante de filtración en las fases adecuadas del proceso. Puede utilizarse un coadyuvante de filtración, por ejemplo, en una o varias etapas de la preparación del precipitado. Por consiguiente, en una realización, el precipitado comprende un coadyuvante de filtración. En una realización, el precipitado no contiene coadyuvante de filtración. En esta realización, un auxiliar de filtración puede no haberse utilizado en absoluto en el proceso (incluidas las etapas precedentes) o, si está presente, se elimina antes de introducir la suspensión que contiene el precipitado en la primera unidad de filtración, es decir, antes de la etapa b). Preferiblemente, el auxiliar de filtración se elimina antes de la etapa b).

Los métodos según el primer aspecto de la invención son adecuados para extraer una proteína de interés de otros sólidos que contienen proteínas. Los ejemplos incluyen liofilizados y formas sólidas cristalizadas que comprenden la proteína de interés.

El producto de los métodos descritos anteriormente puede someterse a continuación a un procesamiento posterior que incluya una o varias etapas de cromatografía, etapas de inactivación de virus, concentración y formulación de forma que el producto final sea adecuado para su administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un sistema cerrado para extraer una proteína de interés de un precipitado, que comprende

a. un primer depósito adaptado para contener el precipitado en forma de suspensión con un primer factor de dilución;

b. una primera unidad de filtración que comprende un elemento filtrante dinámico, en conexión con el primer depósito para recibir la suspensión y el elemento filtrante adaptado para producir un primer permeado enriquecido con la proteína de interés y un primer retentado empobrecido de la proteína de interés, en el que la primera unidad de filtración está adaptada para devolver el primer retentado al primer depósito;

c. un segundo depósito en conexión con la primera unidad de filtración para recuperar el primer permeado enriquecido con la proteína de interés;

d. una segunda unidad de filtración para concentrar el primer permeado en el segundo depósito, adaptada para producir un segundo retentado enriquecido con la proteína de interés y un segundo permeado empobrecido en la proteína de interés, en el que la segunda unidad está opcionalmente adaptada para devolver el segundo retentado al segundo depósito y/o el segundo permeado al primer depósito.

El sistema cerrado de la presente invención reduce el coste de bienes como el agua, los tampones y los productos químicos necesarios para la separación de la proteína de interés, y también reduce el espacio o las huellas de todo el sistema en comparación con otros sistemas de uso común, al tiempo que permite lograr una recuperación de alto rendimiento.

5

Según una realización del segundo aspecto de la invención, la primera unidad de filtración comprende además un dispositivo rascador adaptado para controlar la altura del lecho de material auxiliar de filtración y/o precipitado en una superficie exterior de una membrana de disco filtrante. Este dispositivo también puede ayudar a controlar las tasas de flujo de filtración y/o evitar el bloqueo del filtro. En algunas realizaciones, el dispositivo de raspado es ajustable en altura con respecto a la distancia a la superficie de la membrana del disco filtrante. En realizaciones particulares, el dispositivo de raspado se coloca a una distancia de al menos 20 cm, o al menos 15 cm, o al menos 10 cm, o al menos 9 cm, o al menos 8 cm, o al menos 7 cm, o al menos 6 cm, o al menos 5 cm, o al menos 4 cm, o al menos 3 cm, o al menos 2,5 cm, o al menos 2 cm, o al menos 1,5 cm, o al menos 1 cm, o al menos 0,5 cm, o al menos 0,25 cm de una membrana de disco filtrante.

10

Según otra realización del segundo aspecto de la presente invención, la segunda unidad de proceso comprende un dispositivo de ultrafiltración.

15

Según otra realización, la primera unidad de proceso de filtración está equipada con discos filtrantes giratorios (elemento filtrante dinámico) y, opcionalmente, deflectores para mezclar turbulentamente el contenido de la primera unidad de proceso; preferentemente, la velocidad tangencial de los discos está comprendida entre 1 y 7 m/seg aproximadamente. Las turbulencias pueden ser producidas por los deflectores de tal manera que la extracción de la proteína de interés puede ser aumentada, con lo que se consigue un alto rendimiento de recuperación de proteínas.

20

Según otra realización preferida, el primer elemento de filtración comprende una membrana de filtración que tiene un tamaño medio de poro de entre 5 nm y 5000 nm, preferiblemente de entre 5 nm y 2000 nm, de entre 5 nm y 1000 nm, de entre 5 nm y 500 nm, de entre 5 nm y 200 nm, de entre 7 nm y 1000 nm, más preferiblemente de entre 7 nm y 500 nm, aún más preferiblemente de entre 7 nm y 100 nm, más preferiblemente de entre 7 nm y 80 nm. Por supuesto, el tamaño medio de los poros puede estar en otras combinaciones de la gama indicada anteriormente. Los fabricantes de filtros suelen asignar a los filtros comerciales términos como tamaño de poro nominal o medio, que suelen indicar el cumplimiento de determinados criterios de retención de partículas o microorganismos más que el tamaño geométrico de los poros reales.

25

30

En una realización particular, el elemento filtrante de flujo transversal rotativo comprende un disco filtrante. En algunas realizaciones, el disco filtrante comprende una membrana con un tamaño de poro medio de un microfiltro. En otras realizaciones, el disco filtrante comprende una membrana con un tamaño de poro medio de un ultrafiltro. En una realización, el tamaño medio de los poros de la membrana del disco filtrante oscila entre 5 nm y 2  $\mu\text{m}$ . En determinadas realizaciones, el tamaño medio de los poros de la membrana del disco filtrante oscila entre 50 nm y 0,5  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la membrana del disco filtrante tiene un tamaño medio de poro en el intervalo de mayor o igual a 50 nm a menor o igual a 100 nm, o en el intervalo de mayor o igual a 60 nm a menor o igual a 90 nm, o en el intervalo de mayor o igual a 60 nm a menor o igual a 80 nm. En algunas realizaciones, la membrana del disco filtrante tiene un tamaño medio de poro de 60 nm u 80 nm.

35

40

En una realización preferida, el elemento filtrante de flujo cruzado rotativo comprende un disco filtrante con una membrana cerámica.

45

Los filtros cerámicos pueden estar compuestos, por ejemplo, de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , o  $\text{ZrO}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  o  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ . Los filtros de discos cerámicos suelen estar diseñados de forma que el filtrado se transporta a través de la membrana cerámica desde el exterior hasta un canal interior hueco desde el que se puede recoger el filtrado.

50

Los filtros de discos cerámicos están disponibles en varios tamaños, entre ellos con diámetros exteriores de 374 mm (superficie de 0,2  $\text{m}^2$ ), 312 mm (superficie de 0,14  $\text{m}^2$ ) y 152 mm (superficie de 360  $\text{cm}^2$ ). Normalmente, los filtros de disco cerámicos tienen un grosor que oscila entre 4,5 y 6 mm aproximadamente.

55

En las realizaciones de la presente invención, el disco filtrante cerámico tiene una membrana con un tamaño de poro medio de un microfiltro. En otras realizaciones, el disco filtrante cerámico tiene una membrana con un tamaño de poro medio de un ultrafiltro. En determinadas realizaciones, el tamaño medio de los poros de la membrana cerámica está comprendido entre 5 nm y 2  $\mu\text{m}$ . En particular, la membrana cerámica tiene un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  a 2  $\mu\text{m}$ . En determinadas realizaciones, la membrana cerámica tiene un tamaño medio de poro comprendido entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 100 nm. En otras realizaciones, el tamaño medio de los poros de la membrana cerámica oscila entre 50 nm y 0,2  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la membrana filtrante cerámica tiene un tamaño medio de poro en el rango de mayor o igual a 50 nm a menor o igual a 100 nm, o en el rango de mayor o igual a 60 nm a menor o igual a 90 nm. En una realización preferida, la membrana filtrante cerámica tiene un tamaño medio de poro comprendido entre 60 nm y 80 nm. En otra realización preferida, la membrana cerámica tiene un tamaño medio de poro de 60 nm. En otra realización preferida, el disco de membrana cerámica tiene un tamaño medio de poro de 80 nm.

60

65

De acuerdo con otra realización preferida, un segundo elemento de filtración comprende un dispositivo de ultrafiltración que comprende una membrana con un valor de corte de peso molecular medio inferior a 50 kD, preferiblemente inferior a 30 kD, más preferiblemente inferior a 10 kD o más preferiblemente inferior a 5 kD.

5 En realizaciones de la invención, la capacidad de filtración de la primera unidad de proceso es de al menos 25 kg o al menos 50 kg o al menos 75 kg o al menos 100 kg o al menos 200 kg o al menos 300 kg o al menos 350 kg o al menos 400 kg o al menos 450 kg o al menos 500 kg o al menos 550 kg o al menos 600 kg o al menos 650 kg o al menos 700 kg o al menos 750 kg o al menos 1000 kg del precipitado de partida por m<sup>2</sup> de superficie de filtración.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un sistema y un método para maximizar la recuperación de proteínas y el rendimiento mediante el uso de una novedosa primera unidad de proceso o, además, con una segunda unidad de proceso. La combinación de un método de extracción y separación se utiliza en la presente invención para procesar un precipitado  
15 sólido que contiene proteínas, es decir, un material intermedio (p. ej., pasta derivada de un material de partida) en el que el precipitado puede suspenderse en un líquido o diluyente, p. ej., agua o tampón, para formar una suspensión.

Los precipitados típicos que contienen proteínas se forman durante la purificación de proteínas tras la exposición a precipitantes como el etanol. El sólido suele denominarse precipitado o pasta. El precipitado puede mezclarse con líquido  
20 para formar una suspensión en la que las partículas sólidas se distribuyen por el líquido. En determinadas condiciones de extracción, la proteína contenida en estas partículas puede disolverse progresivamente en la fase líquida.

La proporción de disolución en los procesos de fabricación a escala industrial plantea un problema debido al gran volumen de agua o tampón necesario. En el caso de los procesos de fraccionamiento del plasma utilizados para fabricar proteínas como la albúmina y las inmunoglobulinas, esta etapa puede implicar muchos miles de litros. Incluso cuando se dispone de depósitos para contener volúmenes tan grandes que permitan grandes proporciones de disolución, el efecto deseado de un mayor rendimiento puede no materializarse debido a un equilibrio (principio de Chatelier) entre la proteína disuelta en la solución y la que permanece en el precipitado o la pasta. Dicha proteína atrapada en el precipitado puede no ser recuperable para su posterior transformación en producto final. Este fenómeno está relacionado en parte con el equilibrio de solubilidad. Como es sabido, existe equilibrio de solubilidad cuando un compuesto en fase sólida está en equilibrio químico con el compuesto disuelto en la solución. El equilibrio es un ejemplo de equilibrio dinámico en el que algunas moléculas individuales migran entre las fases sólida y líquida de forma que las tasas de disolución y precipitación son iguales entre sí.

Esta invención pretende resolver el problema de la recuperación de proteínas a partir de precipitados mediante el desplazamiento continuo del equilibrio de solubilidad. Esto se consigue mediante: 1 ) aumentar la eficacia de la extracción (utilizando un sistema de filtración dinámico que puede incorporar elementos filtrantes de disco giratorio hueco) con componentes incorporados para permitir el contacto íntimo de las fases de forma repetitiva; 2) eliminar continuamente la proteína disuelta del precipitado que contiene proteína (aplicando el principio de Le Chatelier - Cuando cualquier sistema en equilibrio se somete a un cambio de concentración (p. ej., volumen), temperatura o presión, entonces el sistema se reajusta para contrarrestar (parcialmente) el efecto del cambio aplicado y se establece un nuevo equilibrio. Esto significa que aumentando continuamente el volumen en el lugar de resuspensión y eliminando continuamente la proteína disuelta a través del filtro dinámico, se puede utilizar el principio de Le Chatelier para garantizar la máxima transferencia de proteína del precipitado a la fase líquida. En algunos casos se puede aumentar el volumen reciclando el permeado durante una etapa de concentración continua de la proteína, reduciendo así el consumo de tampón.

La escala grande o industrial con respecto a la presente invención representa procedimientos de producción basados en al menos 200 L, preferiblemente al menos 500 L, incluso más preferiblemente al menos 2000 L de un material de partida como el plasma humano. Por ejemplo, los tamaños típicos de las reservas comerciales de donantes de plasma utilizados en la fabricación de proteínas a escala industrial oscilan entre 2500 L y 6000 L de plasma por lote. En determinadas realizaciones de la invención, el precipitado se obtiene a partir de 2500 L a 6000 L de plasma. Algunos procesos comerciales de fabricación son capaces de utilizar reservas de donantes de plasma incluso mayores, incluyendo hasta 7500 L, hasta 10000 L, y/o hasta 15000 L de plasma.

El método y el sistema de la invención también pueden utilizarse no sólo para aplicaciones a gran escala industrial, sino como sistema y/o método autónomo para aplicaciones a menor escala de producción (donde el material de partida puede ser inferior a 200 L).

Se pueden utilizar muchos métodos diferentes para precipitar selectivamente las proteínas de la solución, por ejemplo mediante la adición de sales, alcoholes y/o polietilenglicol con la combinación de un ajuste del pH y/o una etapa de enfriamiento. Por lo tanto, se prevé que la presente invención será aplicable a la mayoría de los precipitados de proteínas, como los precipitados de proteínas que contienen inmunoglobulina G, independientemente de cómo se preparen inicialmente. Cabe señalar que la presente invención también puede aplicarse en la separación de otros tipos de proteínas, incluida la albúmina, inmunoglobulinas (Ig), como IgA, IgD, IgE o IgM, ya sea cada tipo de inmunoglobulina por separado o una mezcla de las mismas. Se prevé que las proteínas recombinantes también sean adecuadas a este respecto.

A tal fin, cabe señalar que, si el método se aplica a la producción de IgG, el precipitado que contiene proteínas puede ser cualquier material que contenga IgG (p. ej., en forma de pasta, precipitado o cuerpos de inclusión) o derivado de un material de partida como una solución a partir de la cual las IgG pueden precipitarse mediante, por ejemplo, uno o varios de los métodos explicados anteriormente, ya sea a partir de plasma o suero de origen humano o animal, caldo de fermentación, cultivo celular, suspensión proteica, leche u otras fuentes originales. El material o solución que contiene inmunoglobulina puede contener inmunoglobulina(s) monoclonal(es) o policlonal(es). En algunas realizaciones, el material de partida que contiene inmunoglobulinas es una solución que comprende anticuerpos policlonales. En otras realizaciones, el material de partida comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. Por lo tanto, un experto sabe que el término "inmunoglobulina", tal como se utiliza en el presente documento, también puede identificarse como anticuerpo, incluidos los anticuerpos monoclonales o policlonales, ya sean naturales o recombinantes.

Por ejemplo, las inmunoglobulinas (p. ej., IgG) pueden aislarse de sangre humana o animal o producirse por otros medios, como la tecnología del ADN recombinante o la tecnología del hibridoma. En realizaciones preferidas, las inmunoglobulinas se obtienen a partir de plasma sanguíneo, típicamente de una reserva de plasma sanguíneo derivado de muchos donantes. Para obtener las inmunoglobulinas a partir del plasma, éste suele someterse a un fraccionamiento alcohólico, que puede combinarse con otras técnicas de purificación como la cromatografía, la adsorción o la precipitación. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procesos. Por ejemplo, el precipitado que contiene proteínas puede ser el precipitado II+III según los métodos de Cohn, como el Método 6, Cohn et. al. J. Am; Chem. Soc., 68 (3), 459-475 (1946), el Método 9, Oncley et al. J. Am; Chem. Soc., 71, 541-550 (1946), o el precipitado I+II+III, el Método 10, Cohn et al. J. Am; Chem. Soc., 72, 465-474 (1950); así como el método de Deutsch et al. J. Biol. Chem. 164, 109-118 (1946) o el Precipitado-A de Nitschmann y Kistler Vox Sang. 7, 414-424 (1962); Helv. Chim. Acta 37, 866-873 (1954). Los precipitados alternativos que comprenden la proteína de interés incluyen pero no se limitan a otras fracciones de Oncley que contienen inmunoglobulina G, fracciones de Cohn, precipitados de sulfato de amonio de plasma descritos por Schulze et al. en la patente estadounidense 3,301,842. Otros precipitados alternativos que comprenden la proteína de interés incluyen, entre otros, precipitados de ácido octanoico, como se describe, por ejemplo, en el documento EP893450.

El "plasma normal", el "plasma hiperinmune" (como el plasma hiperinmune anti-D, antitetánico o antihepatitis B) o cualquier plasma equivalente al mismo puede utilizarse como material de partida en los procesos de fraccionamiento en etanol frío descritos en el presente documento.

El término "criosobrenadante" (también llamado plasma crioprecipitado, plasma pobre en crioprecipitado y similares) se refiere al plasma (derivado de donaciones de sangre total o plasmaféresis) del que se ha eliminado el crioprecipitado. La crioprecipitación es la primera etapa en la mayoría de los métodos de fraccionamiento de proteínas plasmáticas que se utilizan hoy en día, para la producción a gran escala de terapias con proteínas plasmáticas. Por lo general, el método consiste en mezclar plasma congelado que se descongela en condiciones controladas (p. ej., a 6 °C o menos) y el precipitado se recoge por filtración o centrifugación. La fracción sobrenadante, conocida por los expertos en la materia como "criosobrenadante", suele conservarse para su uso. El plasma crio-pobre resultante tiene niveles reducidos de Factor VIII (FVIII), factor von Willebrand (VWF), Factor XIII (FXIII), fibronectina y fibrinógeno. Mientras que los niveles de FVIII se reducen en gran medida, los niveles de fibrinógeno pueden alcanzar el 70% de los niveles originales. El criosobrenadante es una materia prima habitual para la fabricación de una serie de proteínas terapéuticas, como la alfa-1-antitripsina (AAT), la apolipoproteína A-I (APO), el fibrinógeno, la antitrombina III (ATIII), el complejo de protrombina formado por los factores de coagulación (II, VII, IX y X), la albúmina (ALB) y las inmunoglobulinas, como la inmunoglobulina G (IgG).

El sobrenadante del precipitado de etanol al 8% (método de Cohn et al.; Schultze et al. (véase más arriba), p. 251), el precipitado II+III (método de Oncley et al.; Schultze et al. (véase más arriba), p. 253) o el precipitado B (método de Kistler y Nitschmann; Schultze et al. (véase más arriba), p. 253) son ejemplos de una fuente de IgG compatible con el fraccionamiento de plasma a escala industrial. El material de partida para un proceso de purificación para obtener IgG en alto rendimiento puede ser alternativamente cualquier otro material adecuado de diferentes fuentes como la fermentación y el cultivo celular u otras suspensiones de proteínas.

En el método de fraccionamiento de Cohn, la primera etapa de fraccionamiento da lugar a la fracción I, que comprende principalmente fibrinógeno y fibronectina. El sobrenadante de esta etapa se procesa de nuevo para precipitar la fracción II+III y luego las fracciones III y II. Normalmente, la fracción II+III contiene aproximadamente un 60% de IgG, junto con impurezas como fibrinógeno, IgM e IgA. A continuación, la mayoría de estas impurezas se eliminan en la fracción III, que se considera una fracción residual y normalmente se desecha. A continuación, se trata el sobrenadante para precipitar la fracción principal que contiene IgG, la fracción II, que puede contener más del 90% de IgG. Los valores en% anteriores se refieren al% de pureza de la IgG. La pureza puede medirse por cualquier método conocido en la técnica, como la electroforesis en gel o la inmunonefelometría. En el método Kistler & Nitschmann, la fracción I es equivalente a la fracción I del método Cohn. El siguiente precipitado/fracción se denomina precipitado A (fracción A). Este precipitado es equivalente en líneas generales, aunque no idéntico, a la fracción II+III de Cohn. A continuación, se vuelve a disolver el precipitado y se ajustan las condiciones para precipitar el precipitado B (fracción B), que equivale a la fracción III de Cohn. De nuevo, se considera una fracción residual y normalmente se desecha. A continuación, el sobrenadante del precipitado B se procesa de nuevo para producir el precipitado II, que corresponde a la fracción II de Cohn.

Los precipitados que contienen proteínas particulares pueden comprender proteínas plasmáticas, hormonas peptídicas,

factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de inmunoglobulinas policlonales, proteínas plasmáticas seleccionadas entre factores de coagulación de la sangre humana y animal, incluyendo fibrinógeno, protrombina, trombina, complejo de protrombina, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII y FXIIIa, factor de von Willebrand, proteínas de transporte que incluyen albúmina, transferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, hemoglobulina y hemopexina, inhibidores de proteasa que incluyen b-antrombina, o antitrombina, a-2-macroglobulina, C1 -inhibidor, inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), cofactor II de la heparina, inhibidor de la proteína C (PAI-3), proteína C y proteína S, proteínas inhibidoras de la a-1 esterasa, a-1 antitripsina, proteínas antiangiónéticas, incluida la antitrombina latente, proteínas altamente glicosiladas, incluida la a-1 -glicoproteína ácida, antiqumotripsina, inhibidor de la intertripsina, glicoproteína a-2-HS y proteína C reactiva y otras proteínas como la glicoproteína rica en histidina, lectina de unión a manano, proteína de unión a C4, fibronectina, globulina GC, plasminógeno, factores sanguíneos como eritropoyetina, interferón, factores tumorales, TPA, yCSF.

En realizaciones particulares, el precipitado que contiene proteínas se utiliza en la fabricación de proteínas terapéuticas derivadas del plasma, incluidas inmunoglobulinas como la inmunoglobulina G, albúmina, fibrina, trombina, complejo de protrombina, fibrinógeno, plasminógeno, alfa 1 - antitripsina, inhibidor de C1, apolipoproteína A1, alfa glicoproteína ácida, haptoglobina, hemopexina, transferrina y factores de coagulación como Factor VII, Factor VIII y Factor IX.

La concentración de proteína(s) en una muestra (p. ej., en el sobrenadante o en una preparación posteriormente purificada del mismo) puede medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Algunos ejemplos de ensayos adecuados son la cromatografía líquida de alta presión (HPLC; p. ej., HPLC de exclusión por tamaño), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunonefelometría. Estas técnicas pueden utilizarse para evaluar la pureza de una muestra. Además, se puede utilizar la electroforesis en gel como SDS-PAGE con tinción y densitometría para evaluar la pureza de la muestra y detectar la presencia de proteínas contaminantes. Puede utilizarse un agente reductor como el ditioneitol con SDS-PAGE para escindir cualquier polímero ligado a disulfuro.

La inmunoglobulina G-conteniendo empezando material preferentemente tiene una concentración de proteína total de aproximadamente 0,5 a 6,5% p/v, más preferentemente aproximadamente 1,0 a 4,0% p/v, todavía más preferentemente aproximadamente 1,5 a 3,0% p/v, más preferentemente aproximadamente 1,8 a 2,5% p/v, p. ej. aproximadamente 2,0% p/v.

En una realización, el líquido comprende un tampón que comprende uno o más de acetato de sodio, fosfato y ácido cítrico. En una realización, el fosfato es un fosfato de sodio, como el dihidrógeno fosfato de sodio deshidratado. Preferiblemente, se utiliza un tampón de baja conductividad, como un tampón con una conductividad inferior a 5 mS/cm, preferiblemente inferior a 4 mS/cm, más preferiblemente entre 0,01 mS/cm y 4 mS/cm.

El método según la presente invención permite recuperar la proteína de interés en alto rendimiento a partir del precipitado que contiene proteínas (p. ej., pasta). El rendimiento recuperado (producto ultrafiltrado), en la etapa posterior a la concentración, es típicamente de al menos el 95% (p/p), preferiblemente de al menos el 96% (p/p), más preferiblemente de al menos el 97% (p/p), más preferiblemente de hasta el 98% (p/p), que se define como la cantidad total de inmunoglobulina G en la solución filtrada final comparada con la cantidad total de inmunoglobulina G en el material de partida.

A continuación se presenta un ejemplo que demuestra cómo puede obtenerse el cálculo de la tasa de recuperación del contenido de inmunoglobulina G según la presente invención. Una primera etapa consiste en la determinación del contenido de IgG en el precipitado que contiene proteínas (disolución total), seguida de una segunda etapa que consiste en la determinación de la recuperación de IgG utilizando el método o sistema de extracción continua de la presente invención.

Como primera etapa, el precipitado que contiene proteínas (aproximadamente 50 g para cada experimento) se disuelve en un tampón (p. ej., 0,12 M a 0,25 M de tampón fosfato, pH 7,6 a 8,0) para obtener un factor de dilución final de 20 (1:20; o una relación de dilución final de 1: 19 en peso). Tras un tiempo de resuspensión de 2 h utilizando un mezclador impulsor, la suspensión se centrifuga a 4500 G. De este modo se obtiene un primer sobrenadante y un primer precipitado. El volumen de sobrenadante puede determinarse por métodos estándar, y el contenido de IgG del sobrenadante puede determinarse, por ejemplo, por nefelometría. El precipitado resultante se resuspende y se trata de nuevo utilizando el mismo tampón descrito anteriormente para obtener un factor de dilución final de 20 (1 parte de sobrenadante obtenido: 19 partes de nuevo tampón). Se determina de nuevo el volumen del sobrenadante resultante y el contenido de IgG. Este proceso se repite por ejemplo cinco veces, o tantas veces como sea necesario para que el contenido de IgG en el último sobrenadante sea inferior a 10 mg/L (el límite de cuantificación es aproximadamente de aproximadamente 3,6 mg/L). Este procedimiento garantiza que el contenido de IgG en el precipitado que contiene proteínas se disuelve o extrae de forma completa u óptima con el tampón. Este experimento se repite varias veces (en este caso se repitieron 12 experimentos individuales). Este proceso se repitió con diferentes precipitados de partida generados a partir del fraccionamiento del plasma fuente que dieron resultados fiables similares. La tabla 1 muestra el contenido de proteína total y de IgG recuperado del precipitado proteico.

65

Tabla 1: Determinación del contenido de IgG en el precipitado que contiene proteínas (disolución total).

	Factor de dilución acumulativo (pasta tampón)	Recuperación proteína total (g/kg de pasta)	Recuperación IgG (g/kg de pasta)
	peso.peso	(min-max)	(min-max)
Después de 1 extracción	1:20	131,8 – 158,9	68,7 – 72,8
Después de 2 extracciones	1:40	16,2 – 23,1	7,1 – 10,5
Después de 3 extracciones	1:60	3,5 – 7,4	0,6 – 1,8
Después de 4 extracciones	1:80	1,1 – 2,3	0,05 – 0,2
Después de 5 extracciones	1:100	0,2 – 0,4	0,01 – 0,03
Extracción total		152,8 – 192,1	76,5 – 85,3

En la segunda etapa, se utiliza el mismo precipitado que contiene proteínas para el experimento con el método o sistema continuo de extracción y separación según la presente invención. Una cantidad total de 1 kg del precipitado que contiene proteínas (Precipitado A) se disuelve en el tampón (p. ej., 10 mM de fosfato, 10 mM de acetato y 2 mM de ácido cítrico) durante 30 minutos para obtener una suspensión inicial con una primera relación de dilución de 5 (1:6 en peso; o igual a un primer factor de dilución de 6 (1:6)). El pH de la suspensión es de 4,6. La suspensión se transfiere de un primer depósito a una primera unidad de proceso de filtración para un proceso continuo de extracción y separación. El filtrado (primer permeado) se recoge en un segundo depósito. Por cada 100 a 200 ml de filtrado recogido, se añaden 100 a 200 ml de tampón fresco (o tampón recirculado (es decir, segundo permeado) tras la etapa de UF) al primer depósito, de manera que el volumen de la suspensión filtrada permanezca constante en el primer depósito. La filtración se termina al cabo de 4 horas, cuando se espera que la concentración total de proteínas en la suspensión sea inferior a 0,1 g/L y/o que la concentración de IgG sea inferior a 50 mg/L. La siguiente Tabla 2 muestra la tasa de recuperación de la IgG.

Tabla 2: Determinación de la recuperación de IgG mediante el sistema de filtración de extracción continua utilizado en la presente invención

Precipitado de partida utilizado	Precipitado A
Cantidad de precipitado inicial (kg)	1,0
Primer factor de dilución (pasta: total en peso)	1,6
Cantidad total de proteínas (con el primer factor de dilución) (g/kg de pasta)	116,4
Cantidad de IgG (con el primer factor de dilución) (g/kg de pasta)	61,7
Factor de dilución final (final de la extracción y filtración continuas)	1,31
Cantidad total de proteínas (tras alcanzar el factor de dilución final) (g/kg de pasta)	168
Cantidad de IgG (tras alcanzar el factor de dilución final) (g/kg de pasta)	78,9
Cantidad de IgG (tras ultra) (g/kg de pasta)	78,5

En este ejemplo, el experimento se realiza fuera de línea para mostrar el mayor rendimiento de proteína total e IgG utilizando la unidad de filtración de extracción continua. "Fuera de línea" significa que el tampón añadido no se obtiene de una segunda unidad de filtración. La ultrafiltración en la segunda unidad de filtración se realiza por separado. También se muestra en la Tabla 2 que la cantidad de IgG es menor en el primer factor de dilución (1:6 = 61,7 g/kg) en comparación con la cantidad de IgG al final del último (segundo) factor de dilución (1:31 = 78,9 g/kg). Esto se debe al hecho de que no toda la IgG se extrae o disuelve en el tampón a la vez, sino que se extrae o disuelve a lo largo de un periodo o de un procedimiento de disolución repetitivo. Por lo tanto, el rendimiento de IgG se incrementa mediante el proceso continuo de extracción y filtración según la presente invención.

Se consigue un rendimiento de la inmunoglobulina G según la presente invención con una tasa de recuperación de al menos el 95%, como se muestra en las Tablas 1 y 2 anteriores. La tasa de recuperación (de la extracción y filtración continuas según la presente invención) se calcula mediante la relación (de la cantidad total de IgG en el filtrado continuo: cantidad media de IgG por disolución total de la Tabla 1) multiplicada por 100.

Cantidad total de IgG (tras alcanzar el factor de dilución final) = 78,9 g/kg  
 Extracción media total de IgG (Tabla 1) =  $(76,5+85,3)/2 = 80,9$  g/kg

Rendimiento de IgG (Tasa de recuperación) =  $78,9/80,9 \times 100\% = 97,53\%$ .

Por lo tanto, se demuestra por la presente que se puede conseguir al menos un 95% o aproximadamente un 98% de tasa de recuperación de IgG según la presente invención.

5 Una alta recuperación en esta primera etapa del proceso (antes de las etapas posteriores de transformación) es un requisito previo para lograr mayores rendimientos en la fase final a granel. La presente invención utiliza el proceso de extracción, en el que el precipitado que contiene proteínas (p. ej., pasta) se suspende con un factor de dilución elevado (por ejemplo, entre 40 y 70; 1:40 y 1:70). A modo de ejemplo, 1 kg de precipitado que contiene proteínas (p. ej., pasta) se resuspende en 3 kg de líquido (por ejemplo, tampón), lo que da lugar a una suspensión inicial con un primer factor de dilución de 4 (1:4). La recirculación de 66 kg de la corriente de alimentación de tampón da como resultado un factor de dilución final de 70 (1:70). El proceso de extracción utilizado en la presente invención permite liberar mayores cantidades de inmunoglobulina G en la suspensión/solución, desplazando así el equilibrio (como se verá más adelante), lo que permite una separación más eficaz de la inmunoglobulina G de la suspensión.

15 En una realización preferida, el precipitado de proteína que contiene inmunoglobulina G cruda (es decir, el precipitado que contiene proteína) se suspende en un tampón para obtener la suspensión inicial. En algunas realizaciones, el tampón puede contener acetato o fosfato o, además, ácido cítrico.

20 En la realización más preferida, el producto extraído y filtrado de la suspensión o solución enriquecida con inmunoglobulina G comprende inmunoglobulina humana, en la que al menos el 95% o hasta el 98% del contenido de inmunoglobulina G se recupera del precipitado inicial, o menos de 0,1 mg/ml, preferiblemente menos de 0,05 mg/ml de concentración de proteína de inmunoglobulina G puede detectarse en la suspensión final después de alcanzar el segundo factor de dilución. La distribución aproximada de las subclases de inmunoglobulina G se parecerá normalmente a la distribución media de subclases en el plasma humano.

25 Además, normalmente 1 kg de precipitado A (precipitado que contiene proteínas) contiene alrededor de 170 g de proteínas totales (rango: 150-190 g de proteína/kg de precipitado). La proteína total se compone aproximadamente de un 50% a un 60% de IgG (por tanto, oscila entre 75-95 g/kg de precipitado). Según uno de los métodos de la presente invención, cuando se alcanza una tasa de recuperación de aproximadamente el 98% de IgG, esto significa que se obtiene una cantidad total de 73,5-93,1 g/kg de IgG a partir del precipitado que contiene proteínas (Precipitado A).

30 Como se ilustrará en detalle en los ejemplos que siguen, debido al proceso de extracción mejorado para extraer inmunoglobulina G divulgado en el presente método, en el que el método mejorado consiste en tratar la pasta (es decir, el precipitado/material que contiene proteínas) con un volumen mayor de tampón, independientemente del pH del tampón, puede obtenerse una tasa de recuperación sorprendentemente alta de aproximadamente el 98% de la inmunoglobulina G. Actualmente es habitual en la técnica utilizar un factor de dilución final más bajo (p. ej., de 5 y hasta entre 14 y 15). Por ejemplo, en documento W02016012803 el peso de la fracción de residuos respecto al disolvente será generalmente de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10. Preferiblemente, el peso del disolvente puede ser aproximadamente cuatro veces el peso de la fracción residual, es decir, una relación en peso de aproximadamente 1:4 de fracción residual y disolvente. Por lo tanto, la presente invención permite mejorar las recuperaciones proporcionando un medio para exponer el precipitado que contiene inmunoglobulina a un volumen mayor (factor de dilución final elevado de 20, 30, 40 o superior). Otros factores que también contribuyen son la introducción de turbulencias en la suspensión, una presión de hasta 2 bares en la primera y/o segunda unidades de proceso, así como el sistema de filtración cerrado según la presente invención, que ha aumentado la eficacia de la extracción, lo que ha dado lugar a una elevada tasa de recuperación de la inmunoglobulina G extraída del precipitado de partida. Por otra parte, aparte del rendimiento de recuperación inesperadamente alto, la presente invención también ofrece otras ventajas, en particular la escalabilidad, por la que permite que el método de la invención se utilice en las instalaciones existentes debido a las huellas más pequeñas, y los costes más bajos asociados con el manejo de volúmenes totales más bajos; además, todavía permite la controlabilidad de los parámetros que podrían afectar a la calidad y la estabilidad de la inmunoglobulina G. Por último, el uso de una filtración dinámica permite que las suspensiones de alto contenido sólido se filtren eficazmente.

35 En química, por ejemplo en la separación de proteínas, el principio de Le Chatelier o "Ley del Equilibrio" puede utilizarse para predecir el efecto de un cambio en las condiciones sobre un equilibrio químico. Cuando cualquier sistema en equilibrio se ve sometido a un cambio de concentración, temperatura, volumen o presión, el sistema se reajusta para contrarrestar (parcialmente) el efecto del cambio aplicado y se establece un nuevo equilibrio. En otras palabras, siempre que se perturbe un sistema en equilibrio, éste se ajustará de tal manera que se anule el efecto del cambio. Por ejemplo, en equilibrio, las concentraciones de inmunoglobulina en suspensión a ambos lados son constantes. Si en el equilibrio se extrae de la reacción una pequeña cantidad de inmunoglobulina, debido al cambio de la concentración de inmunoglobulina, esto desplazará el equilibrio hacia el lado que reduciría ese cambio de concentración. Según el principio de Le Chatelier, el sistema intentará oponerse parcialmente al cambio afectado para volver al estado de equilibrio original. A su vez, la velocidad de reacción, el alcance y el rendimiento de los productos se verán alterados en función del impacto sobre el sistema.

60 Si un sistema está en equilibrio y se aumenta la concentración de una de las especies que intervienen en la reacción, el sistema se reajustará de forma que disminuya la concentración de esa especie. Así, la reacción procederá de tal manera

que se consuma parte del aumento de concentración. Del mismo modo, si la concentración de una sustancia disminuye, la reacción se producirá para compensar la pérdida de concentración.

5 En otras palabras, si se retira constantemente inmunoglobulina (p. ej., IgG) del sistema y, al mismo tiempo, se reduce la concentración de inmunoglobulina en el disolvente de la suspensión mediante dilución, se produce un aumento de la retirada de inmunoglobulina de una fase de la suspensión, es decir, del precipitado a la fase líquida. A través de la repetición de este procedimiento, esencialmente toda la inmunoglobulina incluida en el precipitado de la suspensión puede extraerse del precipitado que contiene proteínas, en particular la presente invención divulga un alto factor de dilución final de al menos 30, preferiblemente p. ej., 40 (1:40) o superior, y puede ayudarse aún más utilizando, por ejemplo, las composiciones tampón propuestas, o ayudarse adicionalmente utilizando un pH más alto para maximizar la recuperación de inmunoglobulina G del precipitado que contiene proteínas. En comparación con la técnica anterior, el método y el sistema de la presente invención permiten recuperar casi toda la inmunoglobulina G del precipitado que contiene proteínas (p. ej., pasta o precipitado).

15 El producto ultrafiltrado puede someterse posteriormente a otros procesos, como etapas de cromatografía, etapas de inactivación de virus, concentración y formulación, de modo que el producto final pueda administrarse, por ejemplo, al cuerpo humano. El producto final puede utilizarse en el tratamiento de afecciones inmunitarias, en particular enfermedades autoinmunes y determinadas enfermedades neurológicas. Estas afecciones incluyen la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico (SLE), el síndrome antifosfolípido, la trombocitopenia inmunitaria (ITP), la enfermedad de Kawasaki, el síndrome de Guillain Barre (GBS), la esclerosis múltiple (MS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), neuropatía motora multifocal (MMN), miastenia gravis (MG), enfermedades ampollasas de la piel, esclerodermia, dermatomiositis, polimiositis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer relacionada con el síndrome de Down, angiopatía amiloide cerebral, demencia con cuerpos de Lewy, degeneración lobar frontotemporal o demencia vascular. Además, los productos finales IVIG y SCIG pueden utilizarse en otros procedimientos médicos, como en el trasplante de células y órganos.

30 Con este fin, se reitera que la primera unidad de proceso según la presente invención proporciona un proceso continuo de extracción y separación, en particular un proceso de filtración, gracias a su diseño único. La primera unidad de proceso puede estar provista de un elemento de filtración de rotación dinámica, por ejemplo, compuesto por un disco de membrana de base cerámica. La filtración por rotación permite una velocidad de flujo cruzado extrema (debido a su gran eficacia en la limpieza de la superficie del filtro) y tiene un consumo de energía muy bajo en comparación con las técnicas de flujo cruzado convencionales. El efecto de flujo cruzado (limpieza tangencial de la superficie del filtro) se genera por la rotación de los discos filtrantes y no por el bombeo de grandes volúmenes. El disco filtrante cerámico tiene una mayor resistencia a las tensiones químicas y térmicas, un alto flujo de filtración y una vida útil muy larga, y puede regenerarse mediante lavado a contracorriente o esterilización por vapor caliente.

40 Los discos filtrantes cerámicos giratorios suelen montarse en una carcasa presurizada. El diseño de los discos muestra canales de drenaje en el interior. El filtrado se transporta del exterior al interior de los discos. La rotación de los discos genera fuerzas de cizallamiento en la superficie de la membrana. Con esta técnica se evita el aumento de la torta de filtración, lo que se traduce en un elevado flujo de filtración. Algunos de los principales parámetros de la filtración por rotación son la velocidad de rotación del disco filtrante cerámico y el contenido de sólidos (concentración de líquidos debido a la eliminación del filtrado).

45 El término "precipitado que contiene proteínas" se refiere a cualquier material que contenga la proteína de interés. En el contexto de la inmunoglobulina como proteína de interés, este término puede referirse a plasma, suero, precipitados producidos a partir de plasma o suero, caldos de fermentación, cuerpos de inclusión, sobrenadantes de cultivos celulares o precipitados producidos a partir de dichos materiales. Típicamente, en el contexto de la presente invención, se refiere a precipitados de plasma, como los precipitados de etanol de Cohn u Oncley, o los precipitados de Kistler-Nitschmann.

50 El término "composición de partida" se refiere a una suspensión o solución, producida a partir del precipitado que contiene proteínas, normalmente por dilución con agua o tampón según un (primer) factor de dilución. En algunos casos, si no se requiere dilución del precipitado que contiene proteínas, el precipitado que contiene proteínas puede ser la suspensión de partida.

55 Por "alto rendimiento" se entiende que el rendimiento de la proteína de interés tal como la inmunoglobulina G (así como otras proteínas e inmunoglobulinas) es de al menos el 95% de la cantidad de la proteína de interés en el precipitado que contiene proteínas, preferentemente de al menos el 96%, más preferentemente de al menos el 98%, más preferentemente de más del 98%.

60 La concentración de inmunoglobulina en una muestra (p. ej., en el precipitado o en una preparación purificada de grado farmacéutico del mismo) puede medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Se entenderá que el método utilizado para medir la inmunoglobulina puede depender de la naturaleza de la muestra. Por ejemplo, se entenderá que, cuando la muestra sea un precipitado que contenga inmunoglobulina, puede ser necesario disolver el precipitado (o una muestra del mismo) en un tampón adecuado antes de la medición. Ejemplos de ensayos adecuados para medir una proteína de interés incluyen la cromatografía líquida de alta presión (HPLC; p. ej., HPLC de exclusión por tamaño), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunonefelometría cuantitativa.

Por "aproximadamente" en relación con un valor numérico dado de porcentaje, pH, cantidad o un período de tiempo u otras referencias, se entiende incluir valores numéricos dentro del 10% del valor especificado.

5 A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

10 La referencia en esta especificación a cualquier publicación previa (o información derivada de ella), o a cualquier asunto conocido, no es, y no debe ser tomado como un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que esa publicación previa (o información derivada de ella) o asunto conocido forma parte del conocimiento general común en el campo de esfuerzo al que se refiere esta especificación.

15 Cabe señalar que, tal como se utilizan en la especificación, las formas singulares "un/una", y "el/la" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye una sola proteína, así como dos o más proteínas.

20 Varias realizaciones preferidas de la presente invención se describirán ahora en detalle con referencia a la figura adjunta, en la que algunas de las características menos o no esenciales de la figura incorporada aquí se han omitido por concisión.

#### Breve descripción de los dibujos

25 Los siguientes dibujos no están necesariamente dibujados a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de diversas realizaciones. En la siguiente descripción, se describen diversas realizaciones de la invención con referencia al siguiente dibujo:

30 La figura 1 es un diagrama de flujo esquemático del sistema de la presente invención, que se describe con más detalle a continuación.

La figura 2 muestra el caudal a lo largo del tiempo a través de la primera unidad de filtración en presencia (cuadrados) y ausencia (círculos) de coadyuvante de filtración.

35 La figura 1 ilustra un diagrama de flujo esquemático del sistema 100 y el método según una realización preferida de la presente invención. El precipitado que contiene proteínas, p. ej., en forma de suspensión, o en forma de pasta o precipitado, se suspende con un líquido, p. ej., un tampón. Las composiciones y la concentración del tampón se ajustan al método descrito anteriormente para generar una composición de partida como una suspensión que tenga un primer factor de dilución, p. ej., entre 3 y 10 (1:3 a 1:10). La suspensión se aloja en un primer depósito 1. La suspensión puede introducirse en una primera unidad de filtración 5, a través de la bomba 2, pudiéndose utilizar varios tipos de bombas (p. ej., de pistón, rotativas, centrífugas y de membrana) y la válvula reguladora de caudal 3 de una tubería 12. La primera unidad de filtración 5 está equipada con un eje hueco giratorio en el que están montados los discos filtrantes (el filtrado fluye desde el exterior hacia el interior del eje hueco). La primera unidad de filtración 5 está equipada además con rascadores ajustables en altura para mantener constante el espesor de la torta de filtración y lograr así un flujo constante de filtrado. La presión de filtración deseada se controla y regula mediante la válvula de rebose (salida de la suspensión no filtrada). Los discos filtrantes utilizados pueden ser una membrana cerámica, capas filtrantes de profundidad y discos filtrantes de metal poroso sinterizado. Una vez que el recipiente de la primera unidad de filtración 5 se llena con la suspensión, puede iniciarse una extracción y separación a presión continua. La primera unidad de filtración 5, que puede comprender una unidad/recipiente a presión, está provista de ajustes y condiciones internas adecuadas para aumentar simultáneamente la eficacia de la extracción y el proceso de filtración. La eficacia de la extracción aumenta gracias a la mezcla por turbulencia en la unidad 5, sin necesidad de utilizar un mezclador. No obstante, puede preverse que se disponga de un mezclador adicional para ayudar al proceso de extracción mediante la creación de turbulencias. Además, un factor de dilución final más alto, p. ej., 40 o 70, como se describe en la presente invención, también aumenta la eficacia de la extracción, lo que conduce a un alto rendimiento de proteínas (p. ej., IgG). Por supuesto, también puede contemplarse cualquier otro factor de dilución final más elevado (superior a 70).

55 El filtrado fluye a través de un caudalímetro 6 instalado en la tubería (o canal) 14 y se recoge en el segundo depósito 7. La suspensión no filtrada fluye de vuelta a través de la salida regulada 3 instalada en la tubería 13 del depósito 1. Cuando se alcanza un volumen definido en el segundo depósito 7, puede iniciarse el proceso de concentración de UF 8 en la segunda unidad de filtración. El filtrado en el segundo depósito 7 fluye a través de la tubería 15 hacia el sistema de ultrafiltración (UF) 8. La presión transmembrana se ajusta de modo que el caudal de permeado 17 sea idéntico o casi idéntico al del primer caudal de filtrado en el tubo 14. El permeado del sistema de UF 8 fluye a través de la tubería (o línea o canal) 17 de vuelta al primer depósito 1, mientras que el retentado del sistema de UF (= proteína concentrada) fluye a través de la tubería 16 de vuelta al segundo depósito 7.

65 De acuerdo con la invención, la primera unidad de proceso 5 está provista de uno o más discos filtrantes giratorios que comprenden uno o más del primer elemento filtrante para la mezcla por turbulencia del contenido de la primera unidad de

proceso 5 para producir el primer retentado y el primer permeado. El primer retentado puede devolverse al primer depósito 1 a través de un canal 13 mediante una válvula de control 3, mientras que el primer permeado puede alimentarse a un segundo depósito 7 a través de otro canal 14. El primer elemento filtrante puede ser una membrana de filtración basada en un material cerámico, con un diámetro de poro de entre aproximadamente 5 nm y 5000 nm, preferiblemente de entre 20 nm y 100 nm o más preferiblemente de entre 30 nm y 80 nm. También se puede prever que las membranas inorgánicas o cualquier otra membrana adecuada también podrían proporcionar un efecto similar al de la membrana de base cerámica. La primera unidad de filtración 5 puede estar provista de un dispositivo de control de la presión 4, como un manómetro, para regular la presión en su interior. Del mismo modo, puede instalarse un caudalímetro 6 en el sistema de la presente invención para medir el caudal de la suspensión o solución.

La corriente de alimentación del segundo depósito 7 puede entonces alimentar una segunda unidad de filtración 8 a través de un canal 15 para que se lleve a cabo un segundo proceso de separación. El segundo proceso de separación puede ser un proceso de concentración continua (p. ej., UF). La segunda unidad de filtración 8 está provista de uno o más segundo(s) elemento(s) filtrante(s) de flujo cruzado, en el que el segundo elemento filtrante de flujo cruzado puede comprender una membrana de ultrafiltración con un valor de corte de peso molecular medio inferior a 50 kD. Sin embargo, la membrana también puede ser inferior a 10 kD o, más preferiblemente, inferior a 5 kD. Así pues, la membrana de ultrafiltración produce un segundo retentado que se canaliza de vuelta al segundo depósito 7 a través de un canal 16, mientras que el segundo permeado se introduce en el primer depósito 1 a través de un canal 17. A tal fin, cabe señalar que la presión de la segunda unidad de filtración 10 puede regularse durante la etapa de concentración (ultrafiltración) de modo que la velocidad de flujo de los canales 14 y 17 sea sustancialmente igual.

En la siguiente descripción, se describen detalladamente los métodos según la presente invención en varios ejemplos experimentales.

#### Ejemplo 1

Según la presente invención, la inmunoglobulina G se extrajo mediante un proceso continuo de extracción y separación en una primera unidad de proceso.

Se disolvió una cantidad de 1 kg de precipitado con proteínas (Precipitado A) en tampón de acetato sódico 10 mM, fosfato 10 mM y ácido cítrico 2 mM durante 30 minutos para obtener un primer factor de dilución de 10 (es decir, 1 kg del precipitado disuelto en 9 kg de tampón), siendo el pH de la suspensión de aproximadamente pH 4,6. La suspensión se preparó en el primer depósito y se alimentó a la primera unidad de proceso para un proceso continuo de extracción y separación. La primera unidad de proceso estaba provista de un elemento de filtración de rotación que comprendía un disco de membrana de base cerámica, que tenía una membrana de filtración con un tamaño medio de poro de 80 nm. El filtro cerámico utilizado fue un Ceramic Filter Disc 152 que tenía un diámetro  $\varnothing_o$  152 mm /  $\varnothing_i$  25,5 mm; espesor  $d = 4,5$  mm; y superficie de membrana 360 cm<sup>2</sup>. La velocidad tangencial del disco era de aproximadamente 7 m/s a 60 Hz (800 rpm). La velocidad media de filtración era de aproximadamente 200 ml/min. Durante el proceso continuo de extracción y separación, por cada 200 ml de filtrado (primer permeado) recogido en un segundo depósito, se devolvían 200 ml de tampón al primer depósito a partir de un segundo permeado obtenido de una segunda unidad de filtración (ultrafiltración). Al cabo de 4 horas se detuvo la filtración, en la que la concentración predeterminada de proteínas en el primer depósito era inferior a 0,1 g/L (equivale a un factor de dilución final de 31). Una cantidad total de 3 kg del filtrado se concentró aún más (membrana ultrafiltrante de 10 kD) en la segunda unidad de filtración hasta 20 g/L.

Se realizó un experimento comparativo según un método del estado de la técnica utilizando filtración de flujo en profundidad. En este experimento se utilizó el mismo lote de Precipitado A, en el que el precipitado se suspendió en 0,22 M de tampón de acetato sódico. Para este experimento se utilizó un factor de dilución final de 6 (es decir, 1 kg del precipitado disuelto en 5 kg de tampón). La suspensión se mezcló durante 4 horas antes de la filtración en profundidad. Por último, el filtrado se concentró a 20 g/L, utilizando una membrana de ultrafiltración con un peso molecular medio de corte de 10 kD.

Los resultados del rendimiento de inmunoglobulina G se muestran en la Tabla 3. El rendimiento de IgG obtenido con el método de extracción continua fue superior al del método de la técnica anterior. Como se ha explicado anteriormente, el método de extracción garantiza que el precipitado se exponga a un mayor volumen de líquido (o factor de dilución final). Se cree que esto desplaza el equilibrio de disolución a favor de una mayor extracción de inmunoglobulina G del material precipitado, que podría recuperarse en el primer permeado de la primera unidad de filtración. Como se muestra en la Tabla 3, el sistema de filtración dinámica de la presente invención permitió un aumento en el rendimiento de IgG de aproximadamente 0.68 g/L de equivalente plasmático (PEQ) en comparación con el método del arte previo. Esto equivale a aproximadamente el 10% de las IgG en cada litro de plasma mezclado.

Tabla 3: Comparación del rendimiento de IgG entre el proceso actual y el nuevo en distintas etapas del proceso. (PEQ significa equivalente plasmático, es decir, la cantidad de IgG de cada litro de plasma).

	Control (proceso del estado de la técnica)	Inventi3n actual (nuevo proceso)	
5			
	Primer factor de diluci3n	6 (1:6)	10 (1:10)
	Tiempo de resuspensi3n (h)	2 - 8	0,5
10	Rendimiento de IgG (g/L PEQ) en Composici3n inicial (suspensi3n)	5,86	5,80
15	Factor de diluci3n final	6 (1:6)	31 (1:31)
	Filtrado	5,53	No aplicable.
20	Rendimiento de IgG (g/L PEQ) tras extracci3n continua y separaci3n	No aplicable.	6,20
25	Rendimiento de IgG (g/L PEQ) tras Ultraconcentraci3n	5,48	6,16

### Ejemplo 2

En este ejemplo, se compararon los rendimientos de IgG resultantes del uso de diferentes composiciones tamp3n y diferentes factores de diluci3n final utilizando m3todos y equipos similares a los descritos en el Ejemplo 1.

Como se muestra en la Tabla 4, se aplic3 un factor de diluci3n final de 6 al control (Muestra A). Este factor de diluci3n final representa un factor de diluci3n final com3n ampliamente practicado en la t3cnica. Por ejemplo, documento W02016012803 (p.15, l3nea 30) sugiere diluir en factores de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10. Por el contrario, la presente invenci3n proporciona un medio pr3ctico que permite utilizar relaciones de diluci3n m3s elevadas. En el presente ejemplo se utiliz3 un factor de diluci3n final de 40 para las Muestras B y C.

El tamp3n de la Muestra A comprende acetato s3dico 0,22 M. El tamp3n de la Muestra B comprende 5 mM de acetato y 5 mM de fosfato, mientras que el tamp3n de la Muestra C comprende 10 mM de acetato y 10 mM de fosfato. Las muestras B y C conten3an adem3s 3cido c3trico 2 mM para mantener un pH constante tras la resuspensi3n del precipitado que conten3a prote3nas. El pH de la composici3n de partida en forma de suspensi3n de todas las muestras era de aproximadamente 4,8.

El factor de diluci3n final para la muestra A de 6 se obtuvo disolviendo en primer lugar aproximadamente 1 kg de precipitado I+II+III seg3n el m3todo Cohn 10 en el tamp3n descrito anteriormente (acetato 0,22 M; una parte de precipitado y 5 partes de tamp3n; 1:6 p/p; precipitado:total). La suspensi3n se mezcl3 durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuaci3n, la suspensi3n se filtr3 a trav3s de un filtro de profundidad (0,2 a 0,45 μm, polipropileno), y finalmente se ultraconcentr3 a trav3s de una membrana de 10 kD (Pellicon®3) hasta 20 g de prote3na/L.

Se disolvi3 una cantidad total de 1 kg de precipitado que conten3a prote3nas, tanto para la Muestra B como para la Muestra C, en el tamp3n descrito anteriormente durante 30 min para obtener un primer factor de diluci3n de 6, en el que el pH de la suspensi3n se ajust3 a aproximadamente 4,6. La suspensi3n se prepar3 en el primer dep3sito y se aliment3 a la primera unidad de proceso para un proceso de extracci3n continuo. Durante el proceso de extracci3n continua, por cada 100 a 200 ml de filtrado recogido en un segundo dep3sito, se devolv3an al primer dep3sito de 100 a 200 ml de tamp3n procedente del segundo permeado de la segunda unidad de proceso (ultrafiltraci3n). El proceso de filtraci3n se detuvo cuando el factor de diluci3n total fue de aproximadamente 40. El filtrado se concentr3 a 20 g/L en la segunda unidad de filtraci3n utilizando una membrana de ultrafiltraci3n con un peso molecular medio de corte de 10 kD.

Se utilizaron seis lotes diferentes para los experimentos (comparando el mismo lote con cada tamp3n de prueba, respectivamente). A continuaci3n se compararon los rendimientos en prote3nas e inmunoglobulina G. Los resultados de rendimiento mostraron aumentos de 0,56 g de inmunoglobulina G por L de PEQ (promedio) tanto para las Muestras B y C en comparaci3n con la Muestra A (ver Tabla 4).

Tabla 4: Comparaci3n entre el m3todo de la t3cnica anterior (control) y los m3todos utilizados en la presente invenci3n tras la etapa de concentraci3n por ultrafiltraci3n.

5	Muestra	Control	Inventi3n actual	
		(estado de la t3cnica)	B	C
	Tamp3n	Acetato (0,22 M)	Acetato y Fosfato (5 mM, 5 mM)	Acetato y Fosfato (10 mM, 10 mM)
10	Primer factor de diluci3n	5 (1:5)	5 (1:5)	5 (1:5)
	Factor de diluci3n final	5 (1:5)	40 (1:40)	40 (1:40)
15	Rendimiento de IgG (g/L PEQ)	4,38±0,24	4,69±0,18	5,04±0,14

20

### Ejemplo 3

En este ejemplo se demuestra el impacto de un pH diferente en el rendimiento de inmunoglobulina G, M y A y otras impurezas utilizando el sistema de extracci3n continua de la presente invenci3n. Se realizaron dos experimentos en los que se compararon las recuperaciones de IgG utilizando un tamp3n de 3cido c3trico y un tamp3n de fosfato. El precipitado que contiene prote3nas utilizado en este ejemplo fue 1 kg de precipitado I+II+III derivado de plasma tratado con etanol seg3n el m3todo Cohn 10 o seg3n el m3todo Kistler y Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414).

La muestra de pH m3s bajo se obtuvo resuspendiendo el precipitado descrito anteriormente en un tamp3n de 3cido c3trico (citrato de natrio-3cido c3trico) para obtener un primer factor de diluci3n de 5 (1:5) a un pH de 3,5 a 3,9. La suspensi3n se agit3 a 20 °C durante 30 minutos.

A continuaci3n, la suspensi3n se transfiri3 al primer dep3sito que, posteriormente, se aliment3 a la primera unidad de proceso de filtraci3n para un proceso continuo de extracci3n y separaci3n como el descrito en el Ejemplo 1. La primera unidad de proceso se puso en marcha en cuanto el sistema se llen3 con la suspensi3n. Se produjo un primer permeado/extracto a partir de la primera unidad de proceso, en la que el primer permeado/primer extracto se recogi3 en un segundo dep3sito antes de someterse a una etapa de ultraconcentraci3n (segunda unidad de filtraci3n). Un segundo permeado empobrecido en la prote3na de inter3s obtenida en la etapa de ultraconcentraci3n se devolvi3 al primer dep3sito. El proceso continuo de extracci3n y filtraci3n se detuvo cuando la concentraci3n de prote3nas en el primer dep3sito fue inferior a 0,05 g/L y/o el factor de diluci3n final fue 40 (1:40).

La muestra de pH m3s elevado se obtuvo resuspendiendo el precipitado descrito anteriormente en un tamp3n fosfato (hidrogenofosfato dis3dico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y dihidrogenofosfato s3dico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) con el fin de obtener un primer factor de diluci3n de 5 (1:5), y un pH de 8,0. La suspensi3n se agit3 a 20 °C durante 30 minutos. Aparte del valor de pH, todas las dem3s condiciones y etapas utilizadas en la muestra de pH m3s alto fueron id3nticos a los de la suspensi3n de pH bajo (como se ha descrito anteriormente).

Las Tablas 5 y 6 muestran los resultados despu3s de que la suspensi3n se haya sometido a la etapa de ultraconcentraci3n en la segunda unidad de filtraci3n.

50

Tabla 5: Rendimiento de IgG, IgA e IgM en la etapa ultraconcentrada.

	Citrato	Fosfato
55 pH	3,7	8,0
IgG (g/L PEQ)	6,28	6,42
IgA (g/L PEQ)	0,79	0,81
IgM (g/L PEQ)	0,48	0,50

60

Los resultados demuestran que las condiciones de extracci3n del pH no afectaron al rendimiento de IgG, IgA o IgM. Sin embargo, se observaron efectos con respecto a otros par3metros, por ejemplo, las condiciones de tamp3n de pH bajo dieron lugar a preparaciones con niveles reducidos de PKA y de actividad proteol3tica. Estos par3metros pueden tener un impacto negativo en la estabilidad/calidad de una preparaci3n de inmunoglobulina. Los par3metros  $\alpha$ 1-Antitripsina,  $\alpha$ 2-Macroglobulina, Transferrina, Alb3mina, Apo-AI, Ceruloplasmina, Haptoglobina, Fibrin3geno, Fibronectina, Hemopexina y distribuci3n de subclases de IgG se determinaron mediante ensayos de inmunonefelometr3a. Los niveles de fosfol3pidos,

65

triglicéridos y colesterol se determinaron mediante ensayos enzimáticos. La composición proteínica se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. La distribución del tamaño molecular (agregado, dímero, monómero y fragmento) se determinó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La determinación de la PKA y la actividad proteolítica se realizaron mediante ensayos cromogénicos con sustratos.

Tabla 6: Perfil de impurezas tras la etapa de ultraconcentración

Impurezas	Tampón citrato [g/L]	Tampón fosfato [g/L]
Alfa 1 -Antitripsina	0,0931	0,0639
Alfa2-Macroglobulina	0,972	0,703
Transferrina	0,215	0,203
Albumina	1,32	1,29
Apo-AI	0,149	0,106
Cenitoplasmina	0,205	0,104
Haptoglobina	0,0763	0,07
Fibrinógeno	1,16	1,79
Fibronectina	0,052	0,030
Hemopexina	0,0617	0,05
Fosfolípidos	0,2	0,25
Tnglicéidos	0,14	0,19
Colesterol	0,19	0,28
Composición proteínica	Porcentaje (%)	
Albumina	8,1	8,07
Alfa-Beta-Globulina	16,8	23,9
Gamma-Globulina	75,1	68,1
Distribución del tamaño molecular	Porcentaje (%)	
Agregado	28,5	29,6
Dímero	(Continuación)	6,6
Monómero	64,9	60,0
Fragmento	0,1	3,7
Subclase IgG	Porcentaje (%)	
IgG1 [%]	62,1	61,4
IgG2 [%]	27,9	30,3
IgG3 [%]	3,7	3,1
IgG4 [%]	6,3	5,2
Otro parámetro		

#### Ejemplo 4

En este ejemplo se comparó la recuperación de IgG a partir de un precipitado i) disolviendo el precipitado en un volumen fijo de acetato sódico 220 mM (pH 4,8 ± 0,2), lo que dio lugar a un factor de dilución final de 6, y recuperando la proteína disuelta mediante filtración en profundidad; ii) disolviendo el precipitado en acetato sódico 220 mM (pH 4,8 ± 0,2) y recuperar la proteína disuelta utilizando el proceso de extracción continua de la invención para alcanzar un factor de dilución final de 31 ; y iii) utilizando el proceso de extracción continua de la invención por el que la suspensión en el primer depósito se reponía continuamente con tampón fresco para alcanzar un segundo factor de dilución de 31 .

Parte i: 1 kg del mismo lote de precipitado se suspendió en 5 kg de acetato de sodio 220 mM (pH 4,8 ± 0,2), utilizando el mismo mezclador impulsor (ID 10 cm) para obtener un factor de dilución final de 6 (es decir, 1 kg del precipitado disuelto en 5 kg de tampón). La suspensión se mezcló durante 8 horas. Antes de la filtración en profundidad, se añadió ayuda filtrante (FA = 10 g/kg de Celpure C100, Advanced World Mineral) y se mezcló durante 30 min. La filtración en profundidad se realizó utilizando hojas de filtro combinadas (polipropileno de Dolder CH, celulosa, CH9 de Filtrix) en un filtro prensa (marcos de 20x20 cm; de Filtrix) a una presión máxima de 2,5 bares. La superficie filtrante utilizada fue de 3200 cm<sup>2</sup>. Una

vez finalizada la filtración, se inició el poslavado utilizando 2,5 L del tampón de resuspensión. El resultado fue un filtrado total de 6,9 L y una concentración de proteínas de 18 g/L. La concentración de proteínas se determinó mediante los ensayos de Kjeldahl, Biuret y A280. Por último, el filtrado se concentró de nuevo a 20 g/L, utilizando una membrana de ultrafiltración con un valor de corte de peso molecular medio de 10 kD, tal como se ha descrito anteriormente. El rendimiento en un volumen final de ultrafiltrado de 5,9 L y una concentración de proteínas de 20,7 g/L (Tabla 7).

Parte ii: Una cantidad de 1 kg de precipitado congelado con proteínas en forma de precipitado que contenía alrededor de 100 g de ayuda de filtración, procedente del proceso Kistler-Nitschman (KN), se resuspendió en un tampón de acetato de sodio 220 mM (pH 4,8 ± 0,2) durante 30 min utilizando un mezclador impulsor (ID 10 mm) para obtener un primer factor de dilución de 10 (es decir, 2 kg del precipitado disueltos en 18 kg de tampón). La suspensión en el primer depósito (20 L de volumen de trabajo) se bombeó utilizando una bomba de diafragma a un caudal de 1000 mL/min a la primera unidad de proceso de filtración dinámica. La unidad de proceso contenía un disco de membrana de base cerámica de doble capa (capa superior de membrana de 80 nm y capa inferior de 100 nm). El disco filtrante cerámico 152 (KERAFOL Keramische Folien GmbH, 92676 Eschenbach) tenía un diámetro de 152 mm, un espesor de 4,5 mm y una superficie de membrana de 360 cm<sup>2</sup>. La velocidad tangencial del disco era de aproximadamente 7 m/s a 60 Hz (equivalente a 800 rpm). Se fijó una velocidad media de filtración de aproximadamente 200 ml/min.

Una vez llena la primera unidad de proceso, se hizo circular la suspensión durante 10-15 minutos a una presión constante de 1 bar (rango: 0 a 2 bar) mediante la válvula de rebose (que modula el caudal de retorno del primer retentado desde la primera unidad de proceso al primer depósito). En este punto se inició el proceso de extracción continua con la presión transmembrana (PTM) mantenida entre 0,5-1,5 bar. El primer permeado se recogía en un segundo depósito (20 L de volumen de trabajo) a un caudal de 100-200 mL/min. La suspensión de retentado sin filtrar volvió al primer depósito, a un caudal de 800-900 mL/min, a través de la válvula de salida regulada. Cuando se recogió un volumen definido (2000-4800 mL) en el segundo depósito (= depósito de filtrado), se inició la ultrafiltración (segunda unidad de filtración) utilizando un filtro Ultracel® / o Biomax® (Milipore) de 0,2 m<sup>2</sup>, corte 10 kD. La presión transmembrana (TMP: 0,8-1,5 bar) se fijó de forma que el caudal de permeado del sistema de UF fuera similar al caudal de filtrado del permeado (100- 200 mL/min) para garantizar un proceso de extracción continuo. El permeado de la unidad de filtración UF-segunda se devolvió al primer depósito a un caudal de 100-200 mL/min. Después de 4 horas se detuvo la filtración, en la que el valor predeterminado de concentración de proteína en el primer depósito (depósito de suspensión = depósito de alimentación) era inferior a 0,1 g/L. Esto equivale a una relación de dilución final de 1:31. El proceso de ultrafiltración continuó hasta que la concentración de proteínas alcanzó los 20 g/L. Durante esta concentración final, el segundo permeado se envió a los residuos. El volumen final del ultrafiltrado fue de 7,3 L con una concentración de proteínas de 21,4 g/L (Tabla 7). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo Kjeldahl.

Parte iii: En una tercera parte de este experimento, la primera unidad de filtración se utilizó como sistema autónomo (es decir, desconectado del segundo sistema de UF). Una cantidad de 1 kg del mismo precipitado se resuspendió en 5 kg para obtener un factor de dilución de 6 (es decir, 1 kg del precipitado disuelto en 5 kg de tampón), siendo el pH de la suspensión de aproximadamente 4,6 a 5,0. Todos los demás parámetros de este experimento fueron los mismos que los descritos en la parte ii), con la excepción de que se añadió tampón fresco al primer depósito en lugar de permeado del sistema de UF. Una vez llena la primera unidad de filtración, la suspensión se recirculó durante 10-15 minutos a una presión constante de 1 bar (rango: 0 a 2 bar) mediante la válvula de retorno por rebose antes de iniciar el proceso de extracción continua. El filtrado se recogía en un segundo depósito (50 L de volumen de trabajo) a un caudal de 100- 200 mL/min. La suspensión no filtrada volvió al primer depósito, a un caudal de 800- 900 mL/min, a través de la válvula de retorno regulada. Cuando se recogía un volumen definido (2000-4800 mL) en el segundo depósito (= depósito de filtrado) se añadía tampón fresco al depósito de suspensión a un caudal similar al del primer caudal de filtrado de permeado (es decir, 100-200 mL/min). Después de aproximadamente 4 horas se detuvo la filtración, en la que el valor predeterminado de concentración de proteínas en el primer depósito (depósito de suspensión = depósito de alimentación) era inferior a 0,1 g/L. El volumen de filtrado recogido fue de unos 31 L con una concentración de proteínas de 4,8 g/L. Este volumen equivale a la relación de dilución final de 1:31. El filtrado se concentró de nuevo hasta una concentración de proteínas de 20,6 g/L para obtener un volumen final de 7,2 L (Tabla 7).

Los resultados del rendimiento de IgG se muestran en la Tabla 7. El rendimiento de IgG según el método de la presente invención (que implica un proceso continuo de extracción y filtración) dio un rendimiento mayor que el método de la técnica anterior. Como se ha explicado anteriormente, utilizando el método de extracción y filtración divulgado en la presente invención, se consigue un cambio en la concentración aumentando el volumen (o factor de dilución final), con lo que el equilibrio de disolución se desplaza a favor de una mayor extracción de inmunoglobulina G para conseguir un mayor rendimiento global.

Tabla 7: Comparación del rendimiento de IgG entre el proceso actual y el nuevo en distintas etapas del proceso. (Tiempo de disolución inicial: es el tiempo de mezcla previo al inicio de la unidad de extracción y filtración continua; PEQ significa equivalente plasmático, es decir, la cantidad de IgG de cada litro de plasma).

## ES 2 977 655 T3

	Control	Continuo proceso de recuperación	Continuo proceso de recuperación
	Parte i)	Parte ii)	Parte iii)
5	Factor de dilución inicial	1:6	1:10
10	Tiempo de disolución inicial (h)	8	0,5
15	Volumen de suspensión (L)	6	10
20	Concentración de proteínas en suspensión (g/L)	24,3 después de 8 h	10,9 después de 0,5 h
25	Factor de dilución final	1:6	1:31
30	Tiempo de proceso de extracción y filtración (h)	9	4,5
35	Volumen de filtrado (L) incluido el postlavado para la técnica anterior	6,9	No aplicable.
40	Concentración de proteínas (g/l)	18,0	No aplicable.
45	Proteína total (g)	123,6	No aplicable.
50	Volumen tras UF (L)	5,9	7,1
55	Concentración de proteínas tras UF (g/l)	20,7	21,4
60	Rendimiento proteínico tras UF (g/L PEQ)	12,1	14,9
65	Rendimiento IgG tras UF (g/L PEQ)	6,1	7,2

### 45 Ejemplos: 5, 6 y 7

50 En estos ejemplos se investigó el impacto de la velocidad de rotación de los discos filtrantes giratorios en la primera unidad de proceso y el volumen total de recirculación (factor de dilución final) sobre el rendimiento de proteína en el segundo depósito. La Tabla 8 ofrece un resumen de las condiciones utilizadas.

55 Los resultados muestran que cuanto mayor es la velocidad de rotación de los discos y mayor es el volumen de recirculación, mayor es la cantidad de proteínas diana extraídas que se recuperan en el segundo depósito sin que aumente la coextracción de las impurezas no deseadas como IgA, IgM, lípidos y proteínas de alto peso molecular.

### 60 Ejemplo 5A

65 Para los experimentos, la pasta Cohn I+II+III (1 kg que contenía 120 gramos de Celpure C100) se suspendió en una primera proporción de dilución de 1:6 en 10 mM de acetato de sodio y 10 mM de tampón dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado, pH 4,3-4,4 a 4 °C en el primer depósito. La suspensión en el primer depósito se agitó a 4 °C con un agitador de paletas durante aproximadamente 15-20 horas. Antes de iniciar los experimentos, la primera unidad de filtración (un dispositivo de filtración dinámica Novoflow que contiene tres filtros cerámicos con membranas de 0,2 µm; superficie filtrante = 0,1 m<sup>2</sup>) se almacenó durante la noche en agua fría (1 °C). Al inicio de los experimentos se vació el agua de la unidad y se introdujo la suspensión en la unidad. A continuación, la suspensión se recirculó durante varios minutos entre el primer depósito y la primera unidad de proceso antes de iniciar el proceso de filtración. La suspensión restante se añadió gradualmente a la primera unidad de proceso durante el proceso de filtración. Los filtros cerámicos de la primera

unidad de proceso funcionaron a una velocidad de rotación de 1.200 rpm y una TMP de 1,2 bar. El permeado de la primera unidad de proceso se recogía en un segundo depósito y se introducía en una segunda unidad denominada unidad UF/DF. La unidad de UF/DF era un dispositivo de filtración dinámica Novoflow que contenía 6 discos cerámicos, con membranas de 7,0 nm; área de filtración 0,2 m<sup>2</sup>. El caudal de permeado del sistema UF/DF era de 50-70 mL/min. El sistema UF/DF se puso en marcha una vez recogido el primer filtrado en el segundo depósito. El retentado del sistema UF/DF fluyó de vuelta al segundo depósito mientras que el permeado fluyó de vuelta al primer depósito. El volumen de permeado devuelto al primer depósito contribuyó al volumen total de líquido mezclado con la pasta (es decir, el factor de dilución final). En este experimento, el volumen total de recirculación fue de 107 L por kg de pasta (es decir, 1:107 factor de dilución final).

Ejemplo 5B

En este Ejemplo se utilizó el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 5A, con la excepción de que el volumen total de recirculación fue de 16 L/kg de pasta.

Ejemplo 6A

En este Ejemplo se utilizó el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 5A con la excepción de que la velocidad de rotación de los filtros cerámicos en la primera unidad de proceso se operó a 1000 rpm y el volumen total de recirculación fue de 102 L/kg de pasta.

Ejemplo 6B

En este Ejemplo se utilizó el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 6A, con la excepción de que el volumen total de recirculación fue de 16 L/kg de pasta.

Ejemplo 7A

En este Ejemplo se utilizó el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 6A con la excepción de que la velocidad de rotación de los filtros cerámicos en la primera unidad de proceso se operó a 800 rpm y el volumen total de recirculación fue de 93 L/kg de pasta.

Ejemplo 7B

En este Ejemplo se utilizó el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 7A, con la excepción de que el volumen total de recirculación fue de 16 L/kg de pasta.

En la Tabla 8 se indican los parámetros experimentales y el rendimiento de proteína objetivo en el segundo depósito tras el proceso de filtración.

Ejemplo	5A	5B	6A	6B	7A	7B
Velocidad de rotación (rpm)	1200	1200	1000	1000	800	800
Cantidad de Pasta (kg)	1	1	1	1	1	1
Primer factor de dilución (Pasta tampón)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Factor de dilución final = Volumen total de recirculación (L/kg de pasta)	107	16	102	16	93	16
Superficie de la membrana (m <sup>2</sup> )	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Membrana de filtración	Cerámica	Cerámica	Cerámica	Cerámica	Cerámica	Cerámica

(Continuación)

5	Diámetro de los poros (µm)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
10	Presión transmembrana TMP (bar)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	UF/DF						
15	Superficie de la membrana (m <sup>2</sup> )	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Diámetro de los poros (µm)	7	7	7	7	7	7
20	Tipo de membrana	MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	Presión transmembrana TMP (bar)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
25	Rendimiento proteínico (%)*	96,2	92,2	95,5	91,3	92,0	87,8
	Rendimiento IgG (%)*	98,9	95,6	97,4	95,2	95,1	94,4

MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> = Óxido de magnesio y aluminio

30 \* El rendimiento en proteínas se calcula en relación con la suspensión de partida antes del inicio del proceso de filtración continua. El rendimiento de proteínas e IgG en suspensión se fijó en el 100%, (100% de proteínas totales en suspensión = 13,29 g de proteínas/ L de equivalente plasmático) y (100% de IgG totales en suspensión = 7,34 g de IgG/L de equivalente plasmático).

35 Las impurezas se determinaron por nefelometría, ELISA (IgA, IgM) o métodos de ensayo enzimático (lípidos). Los resultados mostraron que no se observaron aumentos significativos de impurezas, pero como se muestra claramente en la Tabla 8, el rendimiento de proteína así como el rendimiento de IgG aumentaron significativamente con velocidades de rotación más altas, y los rendimientos tanto de proteína como de IgG fueron significativamente más altos cuando se utilizó un factor de dilución final alto (Ejemplos 5A, 6A, 7A), en comparación con un factor de dilución final bajo (Ejemplos 5B, 6B, 7B).

#### 40 Ejemplo 8A y 8B

45 En este ejemplo se comparó el proceso de filtración dinámica de flujo cruzado en presencia (Ejemplo 8A) y ausencia (Ejemplo 8B) de coadyuvante de filtración. El auxiliar de filtración utilizado fue (Celpure C300; Advanced Minerals).

50 Para los experimentos se utilizó pasta Cohn I+II+III (1,2 kg para el Ejemplo 8A y 1,5 kg para el Ejemplo 8B). Cada kilogramo de pasta contiene 120 gramos de coadyuvante de filtración. La pasta se resuspendió en una proporción inicial de 1:6 en tampón de acetato sódico 10 mM y dihidrógeno fosfato sódico dihidratado 10 mM, pH 4,3-4,4 a 4 °C. Las suspensiones se agitaron a 4 °C con un agitador de paletas durante aproximadamente 15-20 horas. Antes de iniciar los experimentos, la primera unidad de filtración (un dispositivo de filtración dinámica Novoflow que contiene tres membranas filtrantes cerámicas de 0,2 µm; superficie filtrante = 0,1 m<sup>2</sup>) se almacenó durante la noche en agua fría (1 °C). Al inicio de los experimentos se vació el agua y se introdujo la suspensión en el dispositivo de filtrado dinámico. A continuación, la suspensión se recirculó durante varios minutos entre el primer depósito y el dispositivo antes de iniciar el proceso de filtración. El resto de la suspensión se añadió gradualmente durante los procesos de filtración (los filtros cerámicos funcionaron a 1.200 rpm con una TMP de 1,2 a 1,6 bar. En cada experimento, se intercambiaron entre 16 y 18 veces aproximadamente 600 ml de tampón. Esto corresponde a una cantidad de tampón de aproximadamente 9,6-10,8 L y sirve para simular la recuperación de tampón de la unidad de ultrafiltración/diafiltración durante el funcionamiento en línea. Los filtrados se recogieron en un recipiente enfriado con hielo bajo agitación (agitador de paletas) y, una vez completadas las filtraciones, se agitaron durante una hora más. Posteriormente, los filtrados se concentraron a 20 g/L (± 5 g/L) utilizando un dispositivo Akta Crossflow.

60 En el Ejemplo 8B, la ayuda de filtración se eliminó utilizando una manga de filtración a presión Mecaplex y capas filtrantes de polipropileno situadas entre el primer depósito y la primera unidad de filtración. Todas las demás condiciones fueron las mismas que las descritas en el Ejemplo 8A.

5 Los experimentos demostraron que la eliminación de la ayuda filtrante daba lugar a una mayor tasa de filtración a través de la primera unidad de filtración (Figura 2). Además, las recuperaciones de proteína total y de IgG en los filtrados fueron similares, independientemente de la presencia o ausencia de la ayuda filtrante. Además, la eliminación del auxiliar de filtración antes de la primera unidad de filtración también ayudó a eliminar del filtrado los lípidos y otras moléculas hidrófobas presentes en las suspensiones (datos no mostrados). De este modo, el filtrado obtenido con la primera unidad de filtración en ausencia del coadyuvante de filtración permaneció más estable (es decir, la turbidez del filtrado fue relativamente menor y permaneció estable durante el almacenamiento en comparación con el filtrado obtenido con la primera unidad de filtración en presencia del coadyuvante de filtración). Estos resultados sugieren además que la eliminación de la ayuda filtrante antes de la primera unidad de filtración mejorará la capacidad de rendimiento del sistema.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer una proteína de interés de un precipitado, que comprende:
  - 5 a. mezclar el precipitado con un líquido en un primer depósito (1) para formar una suspensión que tenga un primer factor de dilución;
  - b. introducir la suspensión en una primera unidad de filtración (5) que comprende un elemento filtrante dinámico adaptado para producir un primer retentado y un primer permeado enriquecidos con la proteína de interés;
  - 10 c. diluir la suspensión en el primer depósito (1) añadiendo líquido hasta un segundo factor de dilución, opcionalmente vertiendo el primer retentado (13) en el primer depósito; y
  - d. recuperar el primer permeado enriquecido con la proteína de interés en un segundo depósito (7).
  
2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además:
  - 15 e. someter el primer permeado del segundo depósito (7) a un proceso continuo de concentración en una segunda unidad de filtración que comprende un elemento filtrante de flujo cruzado, produciendo así un segundo retentado enriquecido con la proteína de interés y un segundo permeado empobrecido en la proteína de interés;
  - f. opcionalmente, diluir la suspensión en el primer depósito (1) vertiendo el segundo permeado en el primer depósito (1), diluyendo así la suspensión hasta el segundo factor de dilución; y
  - 20 g. devolver el segundo retentado enriquecido con la proteína de interés al segundo depósito (7) y/o recoger el segundo retentado enriquecido con la proteína de interés,

opcionalmente en el que:

  - 25 i. el primer permeado se introduce continuamente en el proceso de concentración; o
  - ii. el proceso de concentración es una ultrafiltración realizada en la segunda unidad de filtración.
  
3. Un método a escala industrial para extraer una proteína de interés en alto rendimiento a partir de un precipitado, que comprende:
  - 30 a. mezclar el precipitado con un líquido en un primer depósito para formar una suspensión que tenga un primer factor de dilución;
  - b. alimentar continuamente la suspensión a una primera unidad de filtración que comprende un elemento filtrante de flujo cruzado rotativo que incluye un disco filtrante con una membrana cerámica con un tamaño medio de poro entre
  - 35 5 nm y 5000 nm, el elemento filtrante adaptado para producir un primer retentado, y un primer permeado enriquecido con la proteína de interés;
  - c. diluir la suspensión en el primer depósito añadiendo líquido hasta un segundo factor de dilución, en parte vertiendo el primer retentado en el primer depósito;
  - d. recuperar el primer permeado enriquecido con la proteína de interés en un segundo depósito; y
  - 40 e. someter el primer permeado del segundo depósito a un proceso continuo de concentración en una segunda unidad de filtración que incluya un elemento filtrante de flujo cruzado, produciendo así un segundo retentado enriquecido con la proteína de interés y un segundo permeado empobrecido en la proteína de interés;
  - f. opcionalmente, diluir la suspensión en el primer depósito mediante el flujo continuo del segundo permeado al primer depósito, diluyendo así la suspensión hasta el segundo factor de dilución; y
  - 45 g. devolver el segundo retentado enriquecido con la proteína de interés al segundo depósito y/o recoger el segundo retentado enriquecido con la proteína de interés,

opcionalmente en el que:

  - 50 i. el primer permeado se introduce continuamente en el proceso de concentración; o
  - ii. el proceso de concentración es una ultrafiltración realizada en la segunda unidad de filtración.
  
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
  - 55 a. el primer permeado se recoge en el segundo depósito, y una vez que la suspensión del primer depósito está completamente filtrada, el primer permeado del segundo depósito se somete al proceso de concentración continua; y/o
  - b. se repiten las etapas b) a c) o las etapas b) a f) hasta que se haya alcanzado el segundo factor de dilución o un valor predeterminado de concentración de proteínas de la suspensión en el primer depósito, opcionalmente en el que
  - 60 el valor predeterminado de concentración de proteínas es inferior a 0,1 g/L, preferentemente entre aproximadamente 0,001 y 0,1 g/L.
  
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

- a. el primer factor de dilución es al menos 3 (1:3; partes de la composición que contiene proteínas:total), preferiblemente entre 1 y 10, preferiblemente entre 3 y 9, preferiblemente entre 3 y 5, preferiblemente aproximadamente 3, 5, 6, 9 ó 10; y/o
- 5 b. el segundo factor de dilución predeterminado (peso del precipitado que contiene proteínas en relación con el peso de la dilución total) está comprendido entre 6 y 70, entre 10 y 70, entre 20 y 50, preferentemente entre 30 y 40, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60 o aproximadamente 70 (1:70; partes de precipitado:total).
- 10 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el precipitado es:
- a. un producto intermedio de un proceso de fraccionamiento alcohólico, preferentemente de plasma sanguíneo, más preferentemente de plasma sanguíneo humano, opcionalmente en el que el producto intermedio se selecciona del grupo que consiste en Fracción I de Cohn (Fr I), Fracción II+III de Cohn (Fr II+III), Fracción I+II+III de Cohn (Fr I+II+III),
- 15 o Precipitado A de Kistler/Nitschmann (KN A), o una combinación de KN A y uno o más de Fr I, Fr II+III y Fr I+II+III; o bien
- b. un sobrenadante de cultivo o un producto de fermentación.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de interés es una inmunoglobulina (Ig), preferentemente inmunoglobulina G como la procedente de plasma humano o una inmunoglobulina G producida recombinantemente.
- 20 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- a. la primera unidad de filtración comprende un recipiente a presión; y/o
- 25 b. el elemento filtrante dinámico es un elemento filtrante dinámico de flujo cruzado, preferiblemente un elemento filtrante de flujo cruzado rotativo, opcionalmente en el que la velocidad de rotación del elemento filtrante de flujo cruzado rotativo está comprendida entre 600 rpm aproximadamente y 1200 rpm aproximadamente, preferiblemente entre 800 rpm aproximadamente y 1200 rpm aproximadamente, preferiblemente 800 rpm aproximadamente, 1000 rpm aproximadamente o 1200 rpm aproximadamente,
- 30 opcionalmente en el que la primera unidad de filtración está equipada con discos filtrantes rotativos que comprenden membranas cerámicas y opcionalmente deflectores para la mezcla por turbulencia del contenido de la primera unidad de filtración, preferiblemente la velocidad tangencial de los discos está comprendida entre aproximadamente 1 y 7 m/seg.
- 35 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- a. se controla la temperatura en la primera unidad de filtración, preferiblemente entre 2 °C y 25 °C, más preferiblemente entre 2 °C y 10 °C; y/o
- 40 b. el elemento filtrante dinámico o el elemento filtrante de flujo cruzado comprende una membrana de filtración que tiene un tamaño medio de poro comprendido entre 5 nm y 5000 nm, preferentemente entre 5 nm y 2000 nm, entre 5 nm y 500 nm, entre 5 nm y 200 nm, más preferentemente entre 7 nm y 100 nm, aún más preferentemente entre 7 nm y 80 nm.
- 45 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- a. el precipitado comprende un coadyuvante de filtración, opcionalmente en el que el coadyuvante de filtración se elimina antes de la primera filtración; y/o
- 50 b. un segundo depósito (7) para recibir el primer permeado (14) y/o el segundo retentado (16), en el que la velocidad de flujo del primer permeado y del segundo permeado se controla de forma que se mantenga un volumen de producto sustancialmente constante en el segundo depósito (7).
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- 55 a. la presión transmembrana es de 0,1 bar a 2,5 bar, preferiblemente de 0,2 bar a 2,4 bar, preferiblemente de 0,4 bar a 2,0 bar, más preferiblemente de 0,4 bar a 1,5 bar; y/o
- b. el proceso de extracción se facilita aún más regulando el caudal y/o el tiempo de permanencia de la suspensión en la primera unidad de filtración y/o el caudal del primer retentado y/o el caudal del primer permeado.
- 60 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- a. la suspensión tiene un pH comprendido entre 3,0 y 9,0 aproximadamente, preferentemente entre 4,0 y 7,0 aproximadamente, entre 4,0 y 6,0 aproximadamente, entre 4,0 y 5,0 aproximadamente, entre 4,3 y 4,9 aproximadamente, entre 4,4 y 4,8 aproximadamente, más preferentemente entre 5,0 aproximadamente; y/o

b. el precipitado tiene una concentración total de proteínas de aproximadamente 0,5 a 6,5% p/v, más preferentemente de aproximadamente 1,0 a 4,0% p/v, aún más preferentemente de aproximadamente 1,5 a 3,0% p/v, más preferentemente de aproximadamente 1,8 a 2,5% p/v, p. ej., de aproximadamente 2,0% p/v.

- 5 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- a. el líquido comprende un tampón compuesto por uno o más de acetato sódico, fosfato sódico y ácido cítrico; y/o
  - b. el precipitado se añade al primer depósito en forma de suspensión, gránulo o, preferentemente, pasta.
- 10 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto del método se somete a un procesamiento adicional que incluye una o más de las etapas de cromatografía, etapas de inactivación de virus, concentración y formulación de tal manera que el producto final sea adecuado para su administración a un sujeto.
- 15 15. Uso de un sistema cerrado (100) para extraer una proteína de interés de un precipitado mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, comprendiendo el sistema
- a. un primer depósito adaptado para contener el precipitado en forma de suspensión con un primer factor de dilución;
  - b. una primera unidad de filtración que comprende un elemento filtrante dinámico, en conexión con el primer depósito para recibir la suspensión y el elemento filtrante adaptado para producir un primer permeado enriquecido con la proteína de interés y un primer retentado empobrecido de la proteína de interés, en el que la primera unidad de filtración está adaptada para devolver el primer retentado al primer depósito;
  - c. un segundo depósito en conexión con la primera unidad de filtración para recuperar el primer permeado enriquecido con la proteína de interés;
  - d. una segunda unidad de filtración para concentrar el primer permeado en el segundo depósito, adaptada para producir un segundo retentado enriquecido con la proteína de interés y un segundo permeado empobrecido en la proteína de interés, en el que la segunda unidad está adaptada para devolver el segundo retentado al segundo depósito y/o el segundo permeado al primer depósito,
- 20
- 25
- 30 opcionalmente, en el que el elemento filtrante dinámico es un elemento filtrante giratorio que comprende uno o más discos filtrantes.



Figura 2

