

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 015**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2005 E 05715787 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1720972**

54 Título: **Procedimiento para cultivar células mediante perfusión continua y flujo tangencial alternante**

30 Prioridad:

05.03.2004 EP 04075703

05.03.2004 EP 04075702

27.09.2004 EP 04077656

27.09.2004 EP 04077657

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

21.04.2014

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

CROWLEY, JOHN;

WÜBBEN, MAIKE y

COCO MARTIN, JOSE MANUEL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 456 015 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

Procedimiento para cultivar células mediante perfusión continua y flujo tangencial alternante

La presente invención se refiere a la reducción de la agregación de células en un cultivo celular.

5 Kyung et al. (1994) (Cytotechnology 14, 183-190) se refiere al cultivo de densidad celular elevada de células de mamíferos, y en particular de una estirpe celular epitelial de riñón humano recombinante (indicada como la estirpe celular 293). Estas células tienen una tendencia a agregarse, con la muerte concomitante de las células en el centro de estos agregados. Kyung et al. muestran que esta tendencia a agregarse puede ser influenciada al reducir la concentración de Ca^{2+} en el medio de cultivo celular. Sin embargo, incluso a una concentración muy baja de Ca^{2+} (100 μM), se formaron grandes agregados durante el cultivo a lo largo de un período prolongado.

10 El documento WO93/05145 describe el cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO) y la prevención de la formación de agregados en tales cultivos de células CHO. Aparte de la posibilidad de reducir la concentración de Ca^{2+} (lo que es indeseable debido a que los iones calcio son necesarios para el crecimiento celular), el documento WO93/05145 describe que el control de la relación molar de iones inorgánicos totales y aminoácidos totales en el medio nutriente puede dar como resultado la reducción de la agregación de las células CHO.

15 La presente invención describe el uso de un procedimiento de cultivo celular por perfusión en el que un cultivo celular que comprende medio de cultivo celular y una suspensión de células se hace circular sobre un módulo de filtro que comprende fibras huecas en el que el flujo en el módulo de filtro es un flujo tangencial alternante, para la reducción del grado de agregación de las células en el cultivo celular en el que estas células tienen la tendencia a formar fácil o inherentemente agregados durante el cultivo según la reivindicación 1.

20 Sorprendentemente se ha encontrado que cultivando por perfusión células de animales, en particular de mamíferos, o células de levadura según la invención, se pueden obtener densidades de células viables extremadamente elevadas, mientras que el cultivo celular presenta además una viabilidad celular extremadamente elevada. Adicionalmente, se encontró que el procedimiento de perfusión de la invención conduce a menos agregación celular en el cultivo, incluso a un cultivo que es una suspensión de células individuales sin agregados visibles. Esto es un hallazgo sorprendente debido a que el uso de condiciones de bajo cizallamiento, tales como el cultivo de células por perfusión, no conduce típicamente a la disgregación de las células. La agregación celular durante el cultivo celular por perfusión es desventajosa, debido a que es más difícil el control del procedimiento, debido, por ejemplo, a la heterogeneidad en los perfiles metabólicos de células en los agregados celulares. Esto es especialmente problemático si las células forman agregados de 5 células o más, y cuando los agregados comprenden en total 5% o más de la cantidad total de células.

30 En el documento US 6.544.424 se describe un procedimiento de perfusión. Aunque este documento menciona que este procedimiento puede ser usado para el cultivo de células animales por perfusión, no describe ni sugiere las densidades celulares extremadamente elevadas encontradas en la presente invención. Además, el documento 6.544.424 B1 describe que el procedimiento de perfusión podría disminuir la unión y crecimiento de una obstrucción en la superficie de membrana de las fibras huecas, pero no describe ni sugiere que las células en el propio cultivo celular se agregasen menos.

35 En un artículo de Furey (J. Furey, Continuous Cell Culture Using the ATF System, Genetic Engineering News, Volumen 20, Número 10, 15 de mayo de 2000, páginas 52-53) se describe el mismo procedimiento de perfusión. Se citó que el sistema de fibras huecas que se usa durante el procedimiento de cultivo por perfusión descrito allí tiene tendencia a obturarse por acumulación de partículas y gelatina sobre la superficie de la membrana, así como también que, con la recirculación del cultivo celular a lo largo del módulo de fibras huecas, las entradas de las luces de las fibras huecas se obstruirán. Se da a conocer que la aplicación de un flujo tangencial alternante evita tal obturación y ensuciamiento, pero este artículo no describe ni sugiere que las células en el propio cultivo celular se agregasen menos.

40 Voisier et al. (Biotechnol. Bioeng. 82 (2003), 751-765) repasan diversas técnicas de retención celular en cultivo de perfusión de alta densidad de células de mamífero suspendidas. Ninguno de los sistemas de retención celular revisados es capaz de proporcionar las densidades de células viables extremadamente elevadas combinadas con la viabilidad celular extremadamente elevada, de la presente invención. Además, este artículo no describe ni sugiere que las células en el propio cultivo celular se agregarían menos al aplicarles un flujo tangencial alternante durante el cultivo celular.

45 El cultivo de células por perfusión tiene su significado convencional en la técnica, es decir, significa que, durante el cultivo, las células son retenidas por un dispositivo de separación en el que existe un flujo saliente de líquido que tiene una densidad celular menor que antes de la separación, y en el que hay un flujo entrante del medio de cultivo celular. En el procedimiento de la presente invención, el dispositivo de separación es un módulo de filtro que comprende fibras huecas.

55 El cultivo por perfusión incluye, pero no se limita a, flujo continuo y flujo semicontinuo, por ejemplo flujo por etapas o flujo escalonado.

- Con la expresión "fibra hueca" se quiere decir una membrana tubular. El diámetro interno del tubo está preferiblemente entre 0,3 y 6,0 mm, más preferiblemente entre 0,5 y 3,0 mm, lo más preferible entre 0,5 y 2,0 mm. Preferiblemente, el tamaño de malla en la membrana se escoge de manera que el tamaño de los poros en la malla está próximo al diámetro de las células, asegurando una retención elevada de células mientras que el desecho celular puede pasar el filtro. Preferiblemente, el tamaño de malla está entre 3-30 μm .
- Los módulos de filtro que comprenden fibras huecas están comercialmente disponibles de, por ejemplo, General Electric (antiguamente Amersham).
- Con "flujo tangencial alternante en el módulo de filtro" se quiere decir que hay un flujo en la misma dirección que (es decir, tangencial a) las superficies de membrana de las fibras huecas, flujo el cual va y viene, y que hay otro flujo en una dirección sustancialmente perpendicular a dicha superficie del filtro. El flujo tangencial se puede lograr según métodos conocidos por la persona experta en la técnica. Por ejemplo, en el documento US 6.544.424 se describe que se puede lograr flujo tangencial alternante usando una bomba para hacer circular el cultivo celular sobre un módulo de filtro que comprende fibras huecas, y otra bomba para eliminar el líquido que tiene una densidad celular menor que antes de la separación con el filtro.
- En el procedimiento de la invención, en principio se puede usar cualquier tipo de medio de cultivo celular adecuado para el cultivo de células. Las directrices para escoger un medio de cultivo celular y las condiciones del cultivo celular son bien conocidas en la técnica, y se proporcionan por ejemplo en el Capítulo 8 y 9 de Freshney, R. I. Culture of animal cells (a manual of basic techniques), 4ª edición 2000, Wiley-Liss y en Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G. Cell & Tissue culture: Laboratory Procedures 1993, John Wiley & Sons.
- Generalmente, un medio de cultivo celular para células de mamíferos comprende sales, aminoácidos, vitaminas, lípidos, detergentes, tampones, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, oligoelementos e hidratos de carbono. Los ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sales de hierro, por ejemplo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sales de potasio, por ejemplo KH_2PO_4 , KCl ; sales de sodio, por ejemplo NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y sales de calcio, por ejemplo $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Los ejemplos de aminoácidos son todos los 20 aminoácidos proteínogénicos conocidos, por ejemplo histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Los ejemplos de vitaminas incluyen: ascorbato, biotina, colina, Cl, mio-inositol, D-pantotenato, riboflavina. Los ejemplos de lípidos incluyen: ácidos grasos, por ejemplo ácido linoleico y ácido oleico; peptona de soja y etanolamina. Los ejemplos de detergentes incluyen Tween 80 y Pluronic F68. Un ejemplo de un tampón es HEPES. Los ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citocinas incluyen IGF, hidrocortisona e insulina (recombinante). Los ejemplos de oligoelementos son conocidos por las personas expertas en la técnica, e incluyen Zn, Mg y Se. Los ejemplos de hidratos de carbono incluyen glucosa, fructosa, galactosa y piruvato.
- El pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo en principio no son críticos, y dependen del tipo de célula escogido. Preferiblemente, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad se escogen de manera que sean óptimos para el crecimiento y productividad de las células. La persona experta en la técnica sabe cómo encontrar el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad óptimos para el cultivo por perfusión. Habitualmente, el pH óptimo está entre 6,6 y 7,6, la temperatura óptima entre 30 y 39°C, la osmolaridad óptima entre 260 y 400 mOsm/kg.
- Las células que se someten ventajosamente al procedimiento de la invención pueden ser cualquier tipo celular que se beneficie de este procedimiento, es decir, cultivo a una densidad de células viables extremadamente elevada y una viabilidad celular extremadamente elevada.
- Según el procedimiento de la invención, una densidad de células viables extremadamente elevada es una densidad de al menos 80×10^6 células por ml, preferiblemente al menos 100×10^6 células por ml, más preferiblemente al menos 110×10^6 células por ml, más preferiblemente al menos 120×10^6 células por ml, más preferiblemente al menos 130×10^6 células por ml, lo más preferible al menos 140×10^6 células por ml. Típicamente, un límite superior adecuado en la densidad celular puede caer alrededor de 500×10^6 células por ml.
- Sorprendentemente, la densidad celular extremadamente elevada del procedimiento de la invención va acompañada de una viabilidad celular extremadamente elevada. Una viabilidad celular extremadamente elevada es una viabilidad de al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 97%, lo más preferible al menos 99%.
- Se ha de entender que la densidad de células viables muy elevada y la viabilidad celular muy elevada se alcanzan después de un cierto período de cultivo por perfusión, generalmente cuando las células han alcanzado un estado estacionario, para células de mamífero típicamente 12 a 25 días después del inicio del cultivo por perfusión.
- El procedimiento de la invención es adecuado para cultivar células de animales o células de levadura, especialmente para cultivar células de mamíferos.
- El procedimiento de la invención es adecuado para cultivar células que forman fácil o inherentemente agregados durante el cultivo, especialmente durante el cultivo por perfusión (las denominadas células agregantes). Sorprendentemente, el procedimiento de la invención no sólo disminuye la eliminación de agregado en la membrana

del filtro, sino también disminuye la agregación de células durante el procedimiento de cultivo por perfusión, incluso la agregación de células con una tendencia inherente para formar agregados. El cultivo de células agregantes según la invención da como resultado un cultivo en el que los agregados de al menos 5 células comprenden como máximo 5% de la cantidad total de células, preferiblemente como máximo 4%, más preferiblemente como máximo 3%, incluso más preferiblemente como máximo 2% de la cantidad total de células. De forma especialmente preferible, el cultivo de células agregantes según la invención da como resultado un cultivo que es una suspensión real de células individuales.

Las células agregantes son células que forman agregados de al menos 5 células, comprendiendo los agregados en total al menos 5% de la cantidad total de células. Preferiblemente, los agregados consisten en al menos 6, más preferiblemente al menos 7, incluso más preferiblemente al menos 8, incluso más preferiblemente al menos 9, incluso más preferiblemente al menos 10 células. Preferiblemente, los agregados comprenden en total al menos 7%, más preferiblemente al menos 10%, lo más preferible al menos 15% de la cantidad total de células.

Los ejemplos de células de mamíferos incluyen: células CHO (ovario de hámster chino), hibridomas, células BHK (riñón de hámster recién nacido), células de mieloma, células humanas, por ejemplo células HEK-293, células de linfoblastoide humano, células PER.C6®, células de ratón, por ejemplo células NS0. Los ejemplos de células de levadura incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Phaffia rhodozyma*, *Kluyveromyces lactis*, o células de levadura del género *Pichia*.

Preferiblemente, se usan células de mamíferos, más preferiblemente células CHO, NS0, PER.C6®. También preferiblemente, se usan células que se sabe que tienen comportamiento agregante durante el cultivo (células agregantes). Muy preferiblemente, se usan células PER.C6®.

La agregación celular se puede determinar, por ejemplo, con un microscopio.

La velocidad de adición del medio de cultivo celular al cultivo (la velocidad de flujo de entrada o velocidad de perfusión) influye en la viabilidad y la densidad de las células.

En una realización de la invención, el medio de cultivo celular se añade a una velocidad de perfusión según la siguiente fórmula 1:

$$\text{Velocidad de perfusión} = \text{SPR} * \text{volumen del cultivo celular total} * \text{densidad de células viables} \quad (1)$$

en la que la velocidad de perfusión se expresa en litros por día, en la que la SPR es la velocidad de perfusión específica, es decir, la velocidad a la que el medio de cultivo celular se alimenta al cultivo celular expresada como el volumen de medio añadido por célula viable por unidad de tiempo, y en la que la densidad de células viables es el número de células viables por unidad de volumen. El número de células viables se puede determinar por la persona experta en la técnica, por ejemplo vía el método de exclusión de azul de tripán.

La velocidad de perfusión específica se escoge preferiblemente entre 0,01 y 0,3 n/célula/día, más preferiblemente entre 0,01 y 0,2 n/célula/día.

Puede ser ventajoso tener en cuenta parámetros adicionales cuando se ajusta la velocidad de perfusión, por ejemplo la cantidad de glucosa a alimentar al cultivo, y/o la concentración de oxígeno. Por ejemplo, para PER.C6®, la velocidad de perfusión de glucosa se escoge preferiblemente entre 3 y 20 mmoles/l, más preferiblemente entre 5 y 15 mmoles/l, como parte de la velocidad de perfusión del medio.

Una persona experta en la técnica sabe cómo determinar la velocidad del flujo de salida. La velocidad de flujo de salida de líquido se determina mediante la velocidad de perfusión, y se escoge generalmente a un valor igual.

En una realización de la invención, el líquido de salida está desprovisto sustancialmente de células viables.

En otra realización de la invención, la biomasa (es decir, células en el cultivo celular) se elimina al menos una vez desde el cultivo celular, y se añade medio de cultivo celular adicional al cultivo celular para compensar la eliminación de la biomasa. La eliminación de la biomasa puede conducir a mayores densidades celulares. La biomasa se puede eliminar continuamente o por etapas.

En el enfoque por etapas, la biomasa se elimina continuamente durante un período de tiempo definido. Si se usa un enfoque por etapas, la eliminación de la biomasa se comienza preferiblemente justo antes o justo después de que las células han alcanzado un estado estacionario.

Si se usa un enfoque por etapas, se elimina por etapa de eliminación de biomasa un volumen de biomasa preferiblemente entre 2 y 40% del volumen de trabajo por día, más preferiblemente entre 5 y 30% del volumen de trabajo por día, incluso más preferiblemente entre 10 y 25% del volumen de trabajo por día.

Con "volumen de trabajo" se quiere decir el volumen total del cultivo celular.

Con "etapa de eliminación de la biomasa" se quiere decir el tiempo desde el comienzo hasta el final de la eliminación de la biomasa. Si se usa un enfoque continuo, la biomasa se elimina continuamente hasta el final del cultivo celular. Preferiblemente, la eliminación continua de la biomasa comienza justo antes o justo después de que las células han alcanzado un estado estacionario. Preferiblemente, se elimina un volumen de biomasa entre 2 y 40% del volumen de trabajo por día, más preferiblemente entre 3 y 30% del volumen de trabajo por día, incluso más preferiblemente entre 4 y 15% del volumen de trabajo por día.

La adición del medio de cultivo celular adicional se hace para compensar la eliminación de la biomasa. La alimentación en la que se añade medio de cultivo celular adicional al cultivo celular se puede fusionar en la alimentación de perfusión, pero también se puede añadir en una alimentación separada. La persona experta en la técnica está al tanto de cuánto medio de cultivo celular adicional se necesita para compensar la eliminación de la biomasa. Generalmente, la velocidad de adición del medio de cultivo celular adicional al cultivo celular será la misma que la velocidad de eliminación de la biomasa.

En todavía otra realización de la invención, se produce una sustancia biológica por las células. Las sustancias biológicas que se pueden producir adecuadamente en el cultivo por perfusión de la célula son en principio todas las sustancias biológicas que pueden ser producidas por células de animales, especialmente de mamíferos, y células de levaduras, por ejemplo proteínas terapéuticas y de diagnóstico, tales como anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento u hormonas peptídicas, enzimas, polinucleótidos, tales como vectores víricos usados en terapia génica, vacunas, etc.

En el procedimiento de cultivo por perfusión de la invención, el líquido de salida tendrá una densidad celular inferior pero la misma concentración de la sustancia biológica que el líquido antes de la separación.

Preferiblemente, el procedimiento según la invención se usa para la producción de un producto biofarmacéutico, el cual es una sustancia biológica con una aplicación médica. Los ejemplos de productos biofarmacéuticos son como siguen (con ejemplos de nombres comerciales del producto biofarmacéutico correspondiente entre paréntesis): Tenecteplase (TN Kase™), factor antihemofílico (recombinante) (ReFacto™), Interferón α -n1 linfoblastoide (Wellferon™), factor de coagulación (recombinante) (NovoSeven™), Etanercept, (Enbrel™), Trastuzumab (Herceptin™), Infliximab (Remicade™), Basiliximab (Simulect™), Daclizumab (Zenapaz™), Factor IX de coagulación (recombinante) (Benefix™), eritropoyetina alfa (Epogen®), G-CSF (Neupogen®/Filgrastim), Interferón alfa-2b (Infergen®), insulina recombinante (Humulin®), Interferón beta 1a (Avonex®), Factor VIII (KoGENate®), Glucocerebrosidasa (Cerezyme™), Interferón beta 1b (Betaseron®), receptor del TNF alfa (Enbrel®), hormona estimulante de folículos (Gonal-F®), Mab abciximab (Synagis®, ReoPro®), Mab ritiximab (Rituxan®), activador del plasminógeno tisular (Activase®, Actilyase®), hormona del crecimiento humano (Protropin®, Norditropin®, GenoTropin™). Los ejemplos de polinucleótidos con una posible aplicación médica son ADN plasmídicos terapéuticos génicos. Algunos ADN terapéuticos génicos están ensayándose actualmente en ensayos clínicos para su aplicación médica. Los ejemplos de vacunas son vivas, orales, vacuna rotavirus tetravalente (RotaShield™), vacuna de la rabia (RanAvert™), vacuna de la hepatitis B (RECOMBIVAX HB®, Engerix®) y vacuna de la hepatitis A inactivada (VAQTA™).

La sustancia biológica en el flujo de salida se puede purificar adicionalmente en el procesamiento denominado aguas abajo. El procesamiento aguas abajo comprende habitualmente varias etapas de purificación que varían en combinaciones y en orden. Los ejemplos de etapas de purificación en el procesamiento aguas abajo son etapas de separación (por ejemplo mediante cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico), etapas para la concentración de la sustancia biológica (por ejemplo mediante ultrafiltración o diafiltración), etapas para intercambiar tampones, y/o etapas para eliminar o inactivar virus (por ejemplo mediante filtración del virus, desplazamiento del pH o tratamiento con detergentes disolventes).

La invención se elucidará ahora por medio de los siguientes ejemplos, sin embargo sin estar limitada a ellos.

Ejemplo 1: Optimización del procedimiento de la estirpe celular humana PER.C6® para la producción de biofármacos

Introducción

Ahora existe un gran número de plataformas de expresión para la producción de biofármacos. La mayoría de los nuevos productos deben escoger un sistema de mamífero debido en gran parte a la maquinaria de glucosilación que contienen estas células y otras faltas. Sin embargo, hasta la fecha, la masa celular y la productividad resultante de estas células es un factor de 10-100 veces menor que un sistema microbiano correspondiente si estas células tuviesen la maquinaria para obtener tales productos.

Se desarrolló un montaje de cultivo por perfusión para la estirpe celular PER.C6®, una estirpe celular humana que posee un número de características que la hacen favorable para la producción de biofármacos. Un montaje de perfusión implica la separación de diversos componentes del caldo de cultivo de manera que se retengan las células, se captura la cosecha y se produce la renovación del medio. Se evaluó el comportamiento de un filtro de giro, un dispositivo acústico y una unidad de flujo tangencial alternante (ATF) en un cultivo por perfusión continua de la estirpe celular PER.C6®.

Materiales y métodos

5 Estirpe celular y mantenimiento: Se usó en este estudio una estirpe celular PER.C6® que produce IgG humana. Las células se mantuvieron en un medio comercial libre de suero (medio EX-CELL™ VPRO, JRH Biosciences), suplementado con 6 mM de L-glutamina (Gibco). La estirpe celular PER.C6® es una estirpe celular embrionaria humana inmortalizada con el gen de adenovirus tipo 5 (ad5) E1 usando un promotor de fosfogliceratocinasa.

10 Montaje del biorreactor: Durante este estudio se usaron reactores con velocidades de trabajo de 1 l y 4 l (Applikon, Países Bajos, y B. Braun, Alemania). Para operar el procedimiento en puntos de ajuste definidos, se usó un controlador A Braun DCU3 (B. Braun, Alemania). La temperatura se mantuvo a 36,5°C (intervalo 35,5-37,5°C). La concentración de oxígeno disuelto se controló a 50% (intervalo 40-60%) de saturación de aire mediante ajuste automático de la composición del gas de entrada a través del espacio de cabeza y rociando intermitentemente a través de un rociador microporoso. El punto de ajuste del pH fue 7,1 (intervalo 6,7-7,5), y se controló mediante el caudal de CO₂ vía el espacio de cabeza. Las células se inocularon en el fermentador con un intervalo de densidad de células viables del inóculo de 0,2-0,5 * 10⁶ células/ml. La perfusión comenzó a una densidad de células viables en el intervalo de 1-3 * 10⁶ células/ml.

15 Retención de las células: Las células se retuvieron en el reactor usando tres dispositivos diferentes. En primer lugar, se usó un filtro de giro con un tamaño de poros de 10 µm (GKD, Düren, Alemania). En segundo lugar, se usó un sistema y controlador de la retención celular Biosep ADI1015 (AppliSens, Países Bajos). Finalmente, se evaluó una unidad de control ATF-4 y el alojamiento con un módulo de membrana de fibra hueca asociada (Refine Technology, USA). El filtro de fibra hueca usado fue el modelo CFP-2-E-8SIP (0,2 micrómetros, área: 4600 cm², Amersham Bioscience, obtenido de Magellan instruments, USA). Para mantener un volumen constante de cultivo, se puso en funcionamiento un bucle de control de sensor de nivel.

25 Métodos analíticos: Se llevó a cabo un recuento celular del biorreactor usando el método de exclusión con azul de tripán. El número de células viables se determinó como sigue: se transfirió una cantidad de células teñidas con azul de tripán a un hemocitómetro Fuchs Rosenthal. La cámara del hemocitómetro se colocó en un microscopio, y se contó un número apropiado de cajas. La densidad de células viables se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad de células viables (x } 10^5 \text{ células/ml)} = (A + B) \times E/320 \quad (2)$$

en la que

A = número de células no teñidas en el cuadrado A

B = número de células no teñidas en el cuadrado B

30 E = factor de dilución

Se determinó una concentración de anticuerpos mediante una columna analítica de proteína A usando una HPLC con detección de absorción a UV 280 nm; la concentración real se determinó en base a una curva de calibración de un patrón de referencia de IgG1.

Resultados

35 Cultivos por perfusión

En las Figuras 1-6 se muestran los resultados obtenidos con los materiales y métodos anteriores.

Leyendas a las figuras:

40 Figura 1: Densidad de células viables (x 10⁶ células/ml) frente al tiempo de cultivo (días) para dos fermentaciones por perfusión continuas diferentes de un clon de PER.C6® que produce IgG1 usando un dispositivo de separación de filtro de giro. El ajuste de la velocidad del agitador del fermentador Applikon de 1 l fue 100-150 rpm. Los experimentos de perfusión se realizaron en un volumen de trabajo de 1 l. La velocidad de perfusión específica (SPR) para ambos experimentos de perfusión fue 0,1-0,3 nl/célula/día. En ambos casos, los experimentos de perfusión tuvieron que finalizarse debido a la obturación del filtro de giro.

45 Figura 2: Crecimiento de células PER.C6® productoras de IgG1 en un sistema de perfusión continua con un dispositivo acústico como sistema de retención celular. El ajuste de la velocidad del agitador del fermentador Applikon de 1 l fue 100-150 rpm. Los ajustes usados para el ciclo de puesta en marcha/parada fueron 300 s hacia delante y 4,5 s hacia atrás. Durante el experimento, éste se adaptó a un ciclo de 300 s/3 s (día 15). La velocidad de perfusión específica (SPR) para el experimento de perfusión estuvo entre 0,1-0,3 nl/célula/día.

50 Figura 3: Crecimiento de células PER.C6® productoras de IgG1 en un sistema de perfusión continua con una unidad ATF-4 como sistema de retención celular. El experimento se llevó a cabo en un fermentador Applikon de 4 l. El ajuste para la velocidad del agitador fue 125 rpm. El ATF-4 funcionó entre 0,5 y 3 volúmenes de

trabajo por día. La SPR se ajustó a 0,03-0,08 n/célula/día. El recuadro insertado muestra la densidad celular elevada del cultivo, que está completamente desprovisto de células agregantes.

5 Figura 4: Productividad de IgG1 frente al tiempo de cultivo (días) para dos fermentaciones por perfusión continuas diferentes de un clon de PER.C6® productor de IgG1 usando un dispositivo de separación de filtro de giro.

Figura 5: Productividad de células PER.C6® productoras de IgG1 en un sistema de perfusión continua con un dispositivo acústico como sistema de retención celular.

Figura 6: Productividad de células PER.C6® productoras de IgG1 en un sistema de perfusión continua con una unidad ATF como sistema de retención celular.

10 Sumario

Véase la Tabla 1 para un resumen de los datos obtenidos para los diferentes tipos de perfusión.

Tabla 1. Resumen de la densidad de células viables, velocidad de producción volumétrica (basada en el volumen del reactor) y la mejora del rendimiento de los experimentos de perfusión usando los tres dispositivos de retención diferentes. Para comparación, se añaden resultados por lotes y alimentado-discontinuo (datos no mostrados).

Procedimiento	Densidad máx. de células viables (10 ⁶ células/ml)	Productividad	Rendimiento (cantidad total de producto producido) Factor de mejora
Discontinuo	8-10	0,5 g/l	1
Alimentado-Discontinuo	8-10	1,2 g/l	2,4
Perfusión Continua			
Dispositivo de retención de filtro de giro	20-30	0,1-0,2 g/l/día	2,8-5,6
Dispositivo de retención acústica	20	0,6 g/l/día	16,8
Dispositivo de retención ATF	100	0,9 g/l/día	25,2

15 Se puede concluir que los experimentos de perfusión continua que usan la unidad ATF muestran un potencial significativo para lograr densidades celulares y concentraciones de productos muy elevadas (100 x 10⁶ células/ml y 0,9 g/l/día), mientras que no se observa agregación de las células PER.C6®.

Ejemplo 2: Cultivo de células PER.C6® por perfusión.

20 Equipo: Unidad de control de fermentador B. Braun (Braun, Alemania), vasija Braun de 7 l y placa de cabeza con sondas sensoras del pH, de oxígeno disuelto (DO) y de nivel asociadas (Braun, Alemania), unidad de control ATF-4 y alojamiento con módulo de membrana de fibra hueca asociado (Refine Technology, USA).

Filtro

Modelo de filtro: CFP-2-E-8SIP

25 Tipo: 0,2 micrómetros

Área: 4600 cm²

Amersham Bioscience

Volumen de trabajo

Punto de ajuste: 4,1 l

30 Intervalo: 3,8-4,7 l

Ajustes de ATF

Parámetro	Ajuste	Intervalo
Ajuste de elevación de presión (psi)	Variable	2 - 4
Caudal de elevación de presión (l/min)	3,2	2,5 - 4,0
Caudal exhausto (l/min)	3,2	2,5 - 4,0

ES 2 456 015 T3

Tiempo exhausto (s)	Variable	3 - 8
Pre-presión (psi)	Variable	5 - 9

Velocidad de sangría

No se aplicó a este procedimiento eliminación de biomasa

- 5 Materiales: L-glutamina 6 mM (volumen final) (Gibco) en medio Ex-CELL™ VPRO (JRH Bioscience, USA), se usó Na₂CO₃ al 12% para controlar el pH.

Estirpes celulares y condiciones de cultivo

En este estudio se investigó una estirpe celular PER.C6® que expresa IgG modelo. La estirpe celular PER.C6® se genera a partir de células humanas primarias derivadas de retina. La estirpe celular PER.C6® es capaz de generar anticuerpos monoclonales humanos completos (incluyendo los glucanos) (ref 1, ref 2).

- 10 Las células se cultivaron en matraces Erlenmeyer a 110 rpm y 36,5°C. El espacio de cabeza de estos matraces se controló usando una mezcla de 5% de CO₂/aire.

Ref 1: Jones, D. H., van Berkel, P. H. C., Logtenberg, T. y Bout, A., 2002, "PER.C6 cell line for human antibody production", Gen. Eng. News 22, 50-54.

- 15 Ref 2: Jones, D. et al., 2003, "High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6", Biotechnol. Prog. 19, 163-168.

Operación del fermentador

Las células se cultivaron en un fermentador en el que se controló la tensión del oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y la velocidad de agitación como se detalla a continuación.

Parámetro	Ajuste	Intervalo	
Temperatura	36,5°C	35,5 - 37,5	
pH	> 6,7	7,5 - 6,7 Control de pH activo usando 12% de Na ₂ CO ₃ si pH<6,7	
DO	50%	40 - 60%	
Agitación	100 - 300	Incremento escalonado a medida que aumenta la densidad de células viables (VCD);	
		VCD (x10 ⁶ células/ml)	Agitación(rpm)
		0,3 - 10	120
		10 - 30	150
		30 - 50	170
		50 - 80	200
		80 - 100	230
		100 - 120	260
>120	300		

- 20 Descripción del procedimiento:

Se inocularon células en un fermentador con un intervalo de densidad de células viables de inoculación de 0,2-0,5 x 10⁶ células/ml y un punto de ajuste de 0,3 x 10⁶ células/ml. La perfusión comienza cuando la densidad de células viables es > 2 x 10⁶ células/ml o en el día 5 del cultivo, lo que se logre primero.

- 25 La velocidad de perfusión depende de la densidad celular del cultivo, y las velocidades usadas se describen en la tabla a continuación. Tanto el caudal como la velocidad de dilución se ajustan a medida que aumenta la densidad celular en el fermentador.

Velocidades de perfusión usadas para el cultivo de células PER.C6®

ES 2 456 015 T3

Densidad de células viables ($\times 10^6$ células/ml)	Velocidad de perfusión específica (nl/célula/día)	Ajuste de la velocidad de perfusión específica (nl/célula/día)
Día 1 de perfusión	0,15 - 0,25	0,2
3 - 50	0,03 - 0,06	0,04
50 - 80	0,025 - 0,035	0,03
>80	0,01 - 0,03	0,02

Los datos reales y los resultados de este ejemplo (entre otros caudales y velocidades de perfusión específicas usados en este ejemplo) se muestran en la Tabla 2 a continuación, y en las Figuras 7 y 8.

5 Figura 7: Tiempo de cultivo (días) frente al caudal (l/día) y velocidad de perfusión específica (SPR en nl/célula/día) para células PER.C6® cultivadas usando un procedimiento de perfusión.

Figura 8: densidad de células viables y viabilidad celular usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Tabla 2. Datos brutos obtenidos para el ejemplo 2

Tiempo	Caudal (FR)	Velocidad de dilución (D)	Velocidad de perfusión específica (SPR)	Recuento viable (VC)	Viabilidad	Concentración de producto	Velocidad de producción específica de IgG1	Velocidad de producción volumétrica
día	l/día	volumen de trabajo/día	nl/célula.día	10^6 /ml	%	g/l	pg/(célula.día)	g/l.día
0	0,00	0,00	0,00	0,6	90	0,012	NA	NA
1	0,00	0,00	0,00	0,3	77	0,008	NA	0,000
2	0,00	0,00	0,00	0,3	73	0,008	0,0	0,000
3	0,00	0,00	0,00	0,5	80	0,013	12,1	0,000
4	0,00	0,00	0,00	0,9	87	0,019	9,3	0,000
5	0,00	0,00	0,00	1,4	92	0,033	12,0	0,000
6	2,39	0,52	0,20	2,6	95	0,035	5,5	0,009
7	1,06	0,24	0,05	4,9	95	0,054	9,5	0,017
8	2,70	0,57	0,08	7,3	97	0,073	7,2	0,026
9	2,60	0,57	0,05	12,3	97	0,067	3,5	0,040
10	4,29	0,95	0,05	18,6	97	0,115	7,8	0,069
11	5,40	1,20	0,04	26,9	97	0,140	7,0	0,137
12	6,80	1,48	0,05	31,8	96	0,127	5,6	0,179
13	7,39	1,68	0,04	41,4	99	0,129	5,6	0,202
14	8,28	1,88	0,04	44,3	98	0,139	5,8	0,238
15	10,26	2,33	0,03	68,3	98	0,116	4,4	0,269
16	10,70	2,43	0,03	86,1	99	0,151	4,6	0,318
17	12,10	2,63	0,03	80,3	98	0,163	4,9	0,397
18	11,83	2,57	0,02	112,3	98	0,292	7,6	0,592
19	12,50	2,78	0,02	123,0	99	0,291	6,6	0,780
20	12,09	2,57	0,02	126,0	99	0,293	6,3	0,781
21	11,91	2,59	0,02	135,0	98	0,332	6,5	0,806
22	13,70	2,98	0,02	127,5	97	0,395	8,2	1,012
23	10,00	2,17	0,02	128,5	95	0,470	9,3	1,114

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un procedimiento de cultivo celular por perfusión en el que se hace circular un cultivo celular que comprende un medio de cultivo celular y una suspensión de células sobre un módulo de filtro que comprende fibras huecas, en el que el flujo sobre el módulo del filtro es un flujo tangencial alternante, para la reducción de la agregación de las células en el cultivo celular, en el que estas células tienen la tendencia a formar fácil o inherentemente agregados durante el cultivo, en el que no más del 5% de las células en el cultivo forman agregados en suspensión de al menos 5 células.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que las células agregantes son células de mamífero.
- 10 3. Uso según la reivindicación 2, en el que las células de mamífero son células CHO, hibridomas, células BHK, células de mieloma, células humanas o células de ratón.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se elimina biomasa al menos una vez del cultivo celular, y se añade medio de cultivo celular adicional al cultivo celular.

Figura 1

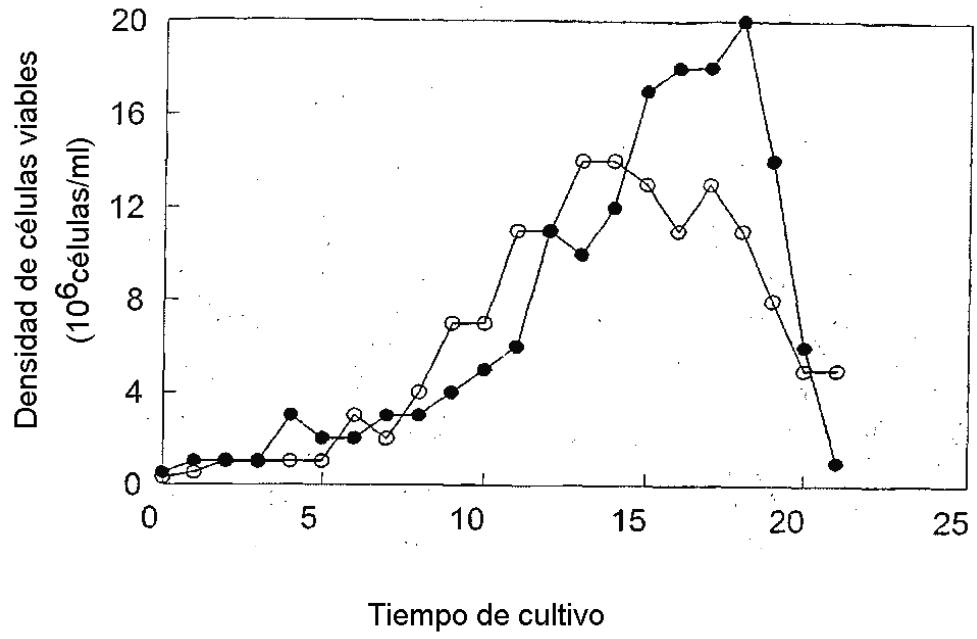


Figura 2

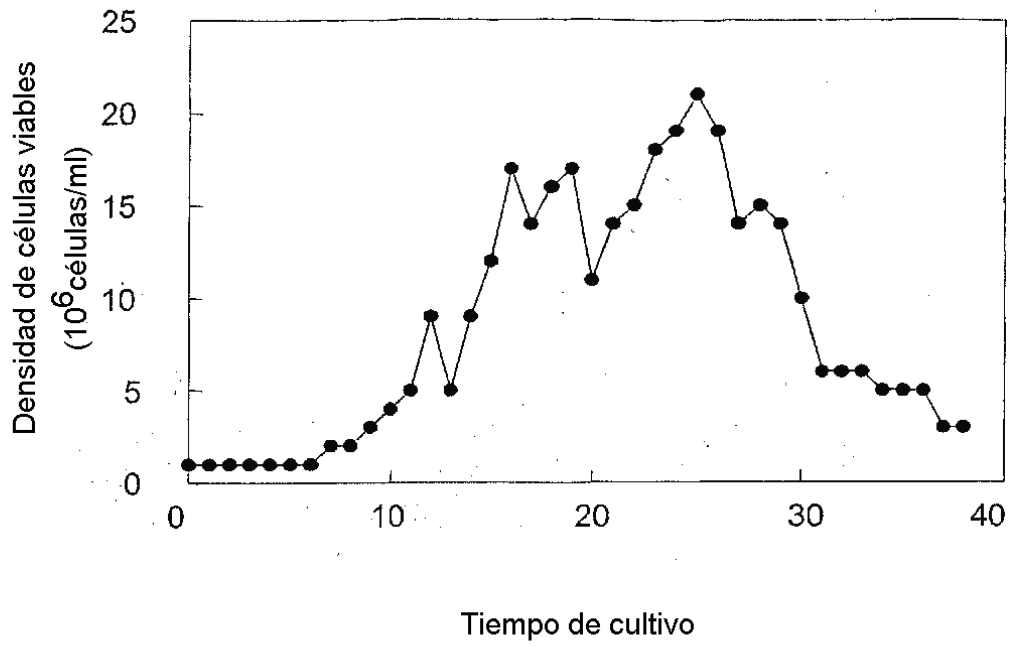


Figura 3

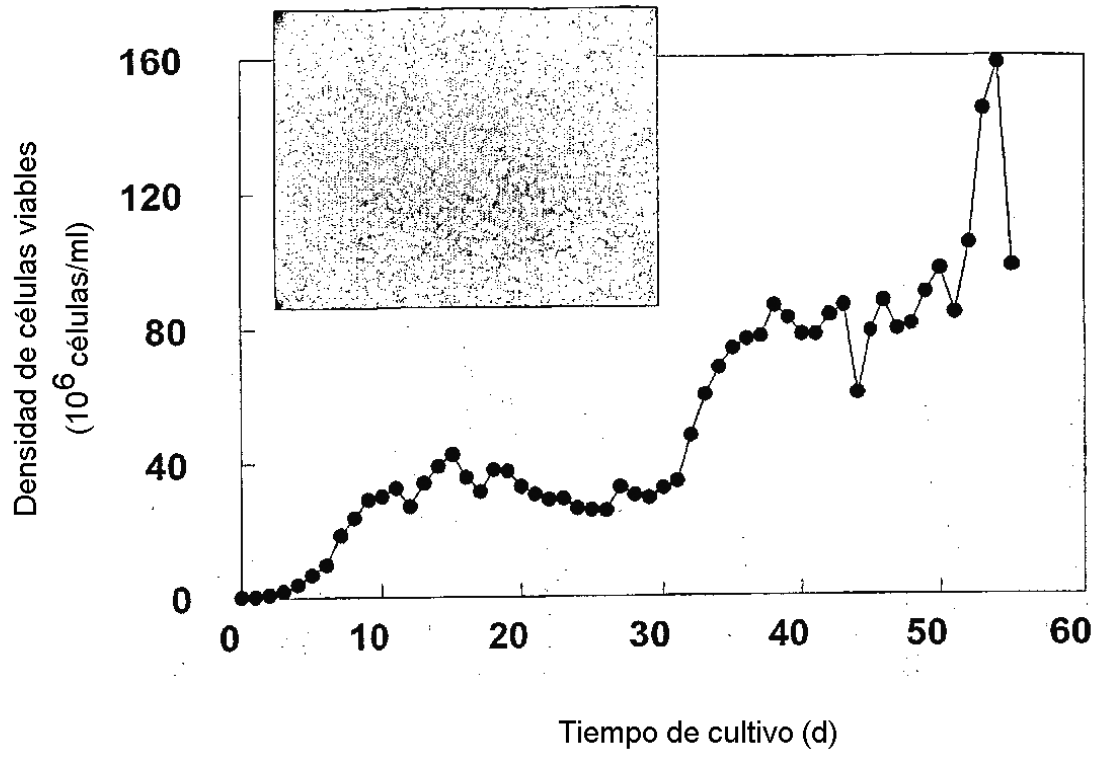


Figura 4

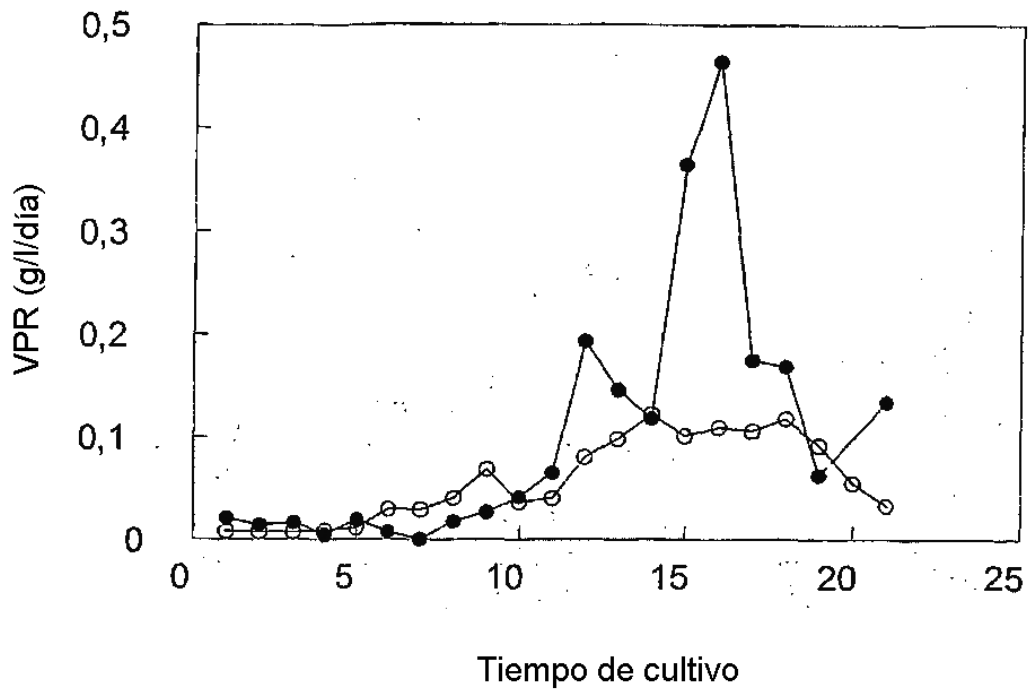


Figura 5

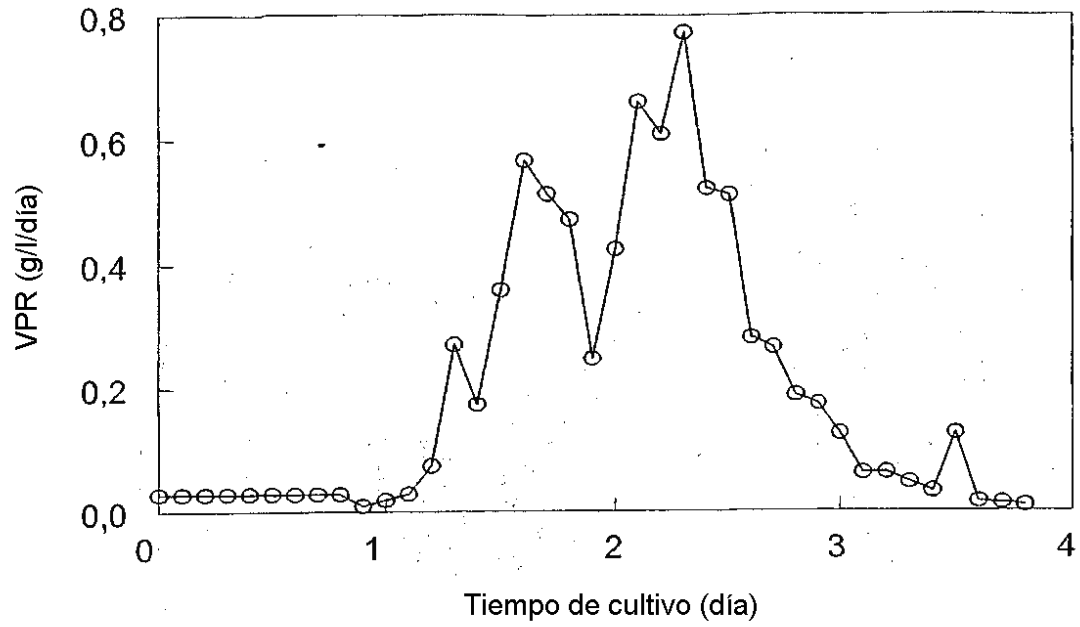


Figura 6

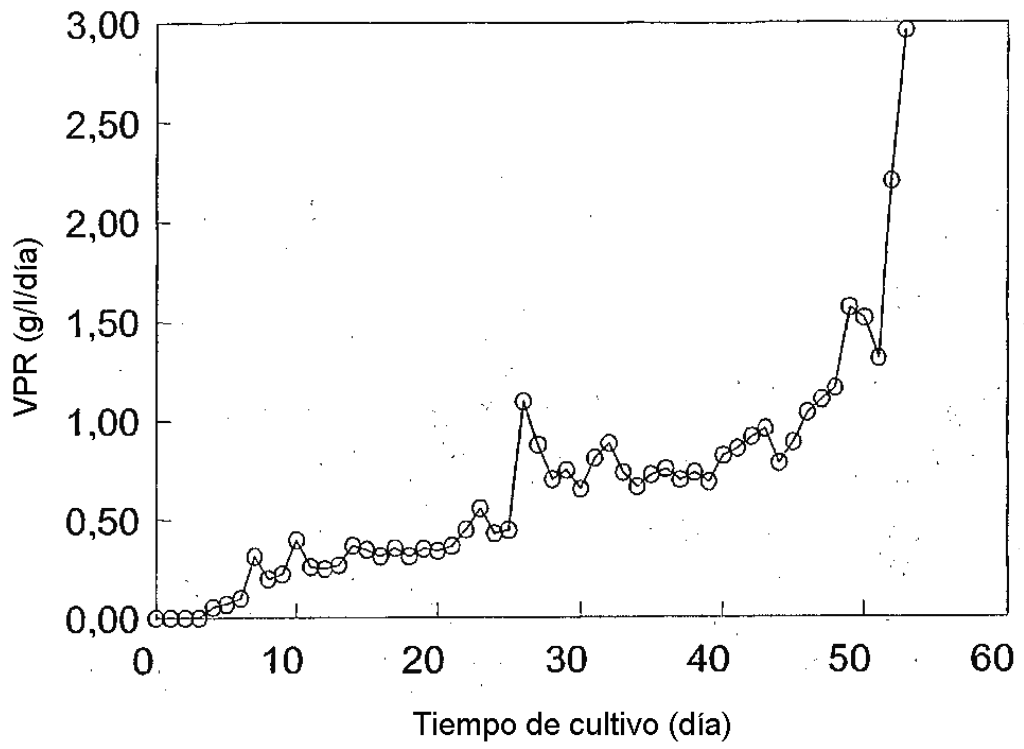


Figura 7

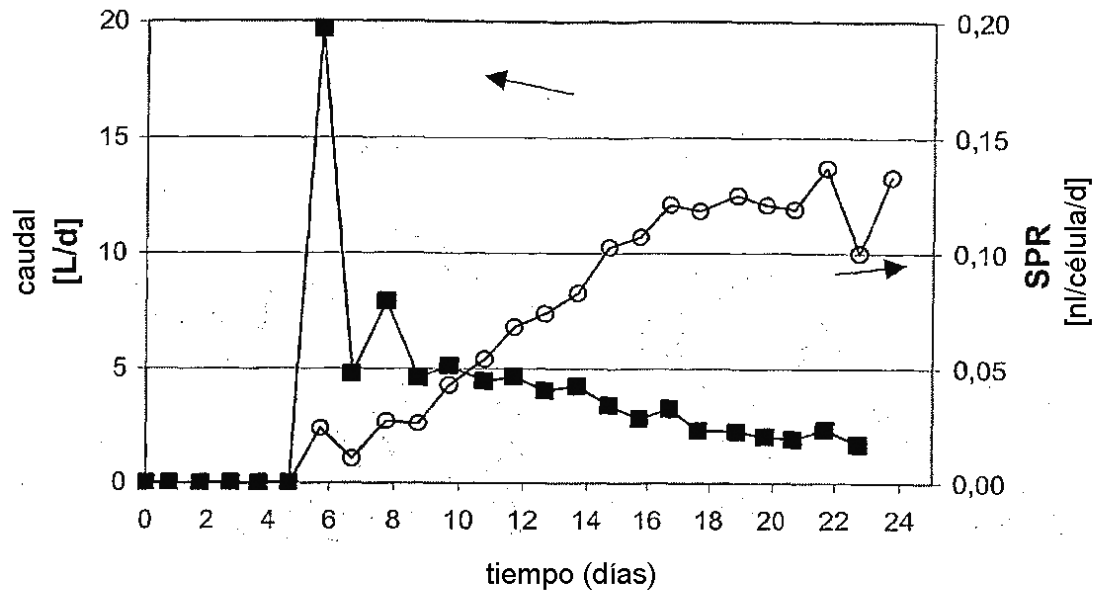


Figura 8

