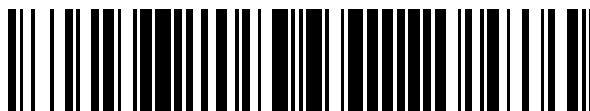


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 957**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/06** (2006.01)

**C12M 1/12** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

**C12N 5/079** (2010.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2007 E 10183677 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2343362**

54 Título: **Procedimiento mejorado para el cultivo de células**

30 Prioridad:

**14.07.2006 EP 06014671**

**06.02.2007 EP 07002571**

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

**17.08.2016**

73 Titular/es:

**DPX HOLDINGS B.V. (100.0%)**

**Herengracht 483**

**1017 BT Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**ZIJLSTRA, GERBEN MEILE;**

**HOF, ROBERT PATRICK y**

**SCHILDER, JACOB**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 579 957 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 mejorado para el cultivo de células

La invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de células en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular.

- 5 Un procedimiento de este tipo se conoce, por ejemplo, a partir del documento WO04/099396. En él se describe cómo la densidad celular del cultivo celular y el rendimiento del material biológico deseado se pueden mejorar mediante la optimización de las condiciones de crecimiento en un proceso discontinuo alimentado.

Además de ello, el documento WO05/095578 describe un procedimiento para el cultivo de células mediante el cultivo de perfusión continua de un cultivo celular que comprende medio de cultivo celular y células, en el que se  
10 añade medio de cultivo celular al cultivo celular, el cultivo celular se hace circular a lo largo de un módulo de filtro que comprende fibras huecas que resulta en un flujo de salida de líquido que tiene una densidad celular más baja que la del cultivo celular, y el flujo dentro del módulo de filtro es un flujo tangencial alterno, en el que las células producen una sustancia biológica. En los ejemplos del documento WO05/095578 se muestra que se producen 0,9 g/L/día de producto, correspondiente a una concentración de producto en el flujo de salida de aproximadamente 0,3  
15 g/L.

Cuanto mayor sea el volumen de líquido que contiene la sustancia biológica, más laboriosa se volverá la purificación de la sustancia biológica. La concentración de la sustancia biológica obtenida no es tan alta en los procedimientos tal como se describen en los documentos WO04/099396 y WO05/095578. Por lo tanto, el procesamiento aguas  
20 abajo de esta sustancia biológica es engorroso, ya que la sustancia biológica necesita ser concentrada antes de aplicar las etapas de purificación adicionales o grandes volúmenes de sustancia biológica menos concentrada necesitan ser purificados. Además de ello, el cultivo de células a menores densidades celulares resulta en una menor productividad volumétrica y, por lo tanto, requiere recipientes de cultivo de mayor tamaño y/o más recipientes de cultivo y, por lo tanto, mayores inversiones en equipos para un nivel de producción dado.

Por lo tanto, es el objeto de la invención proporcionar un procedimiento en el que la sustancia biológica sea una  
25 proteína recombinante y en el que el producto se obtenga a partir del cultivo celular en concentraciones más altas.

Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de células eucariotas en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular, en el que las células producen una proteína recombinante, en el que al menos un componente del medio de cultivo celular se introduce en el cultivo celular y en el que el cultivo celular que  
30 comprende las células, la proteína recombinante y el medio de cultivo celular se hace circular sobre un filtro en un flujo sustancialmente paralelo a la superficie de dicho filtro, lo que resulta en un flujo de salida de líquido y un flujo, cuyo contenido se mantiene en o se retro-alimenta al reactor,

en el que el filtro tiene un tamaño de poros adecuado para separar la proteína recombinante de sustancias que tienen un peso molecular más bajo que la proteína recombinante, en el que el flujo de salida de líquido consiste  
35 esencialmente en componentes que tienen un peso molecular menor que el de la proteína recombinante y en el que la proteína recombinante es retenida en o retro-alimentada al reactor.

Se ha encontrado que al utilizar un sistema de separación que separa la sustancia biológica de sustancias que tienen un peso molecular más bajo que la sustancia biológica, la sustancia biológica se puede acumular en el cultivo celular en mayores concentraciones.

Por lo tanto, la presente invención difiere del cultivo de células descrito en la técnica anterior, debido a que permite  
40 la acumulación del material biológico deseado junto con la masa celular.

En una realización preferida de la presente invención, parte de las sustancias de menor peso molecular se separan continuamente del cultivo celular.

Una ventaja adicional del procedimiento de la presente invención es que se puede alcanzar una mayor concentración de células viables en comparación, por ejemplo, con los procesos discontinuos o discontinuos  
45 alimentados. Además, el tiempo de producción - el período durante el cual las células producen la sustancia biológica - se puede ampliar en comparación con los procesos discontinuos o discontinuos alimentados. También, en comparación con un proceso discontinuo o discontinuo alimentado, es posible utilizar un reactor más pequeño. El uso de reactores más pequeños es ventajoso, ya que esto reduce las inversiones en equipos e instalaciones relacionados.

Además, concentraciones más altas de la sustancia biológica se pueden obtener en tiempos más cortos.

Se encontró que era posible obtener altas concentraciones de sustancia biológica dentro del reactor sin disminuir bruscamente la viabilidad celular y, por lo tanto, sin limitar el tiempo de producción. La persona experta en la técnica hubiera esperado que se produjera la inhibición del producto, es decir, la inhibición de la producción de la sustancia biológica por parte de la propia sustancia biológica o la inhibición por otras macromoléculas producidas por la célula (tales como, por ejemplo, proteínas de células huésped, enzimas o desechos celulares). Además, se encontró que la acumulación del material biológico deseado no afecta a la función del sistema de separación.

El procedimiento de la presente invención proporciona una ventaja considerable en términos de densidad celular, concentración de producto en el cultivo celular y periodo de cultivo prolongado en comparación con los procedimientos de acuerdo con los documentos WO05/095578 y WO04/099396. Como resultado, el presente procedimiento resulta en una producción mejorada del material biológica deseado.

Células que pueden utilizarse para producir la sustancia biológica son, en principio, todas las células conocidas por la persona experta en la técnica que tienen la capacidad de proporcionar un producto biológico. Las células pueden ser eucariotas, por ejemplo, hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum*, levaduras, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Phaffia rhodozyma*, levadura del género *Pichia*, por ejemplo *Pichia pastoris*, o procariotas, por ejemplo *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, por ejemplo *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. alkalophilus*, *Streptomyces sp.*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas sp.* Ejemplos de células eucariotas se describen también, por ejemplo, en Chu, L., Robinson, D.K., (2001) Curr. Opin. Biotechnol., vol. 12, págs. 180-187. Preferiblemente, las células que se utilizan en el procedimiento de la presente invención son células animales, en particular células de mamífero. Ejemplos de células de mamífero incluyen células CHO (ovario de hámster chino), híbridomas, células BHK (riñón de hámster bebé), células de mieloma, células humanas, por ejemplo células HEK-293, células linfoblastoides humanas, células HER inmortalizadas por E1, células de ratón, por ejemplo células NS0. Más preferiblemente, se utilizan células HER inmortalizadas por E1, lo más preferiblemente células PER.C6.

Células de retina embrionaria humana (HER) primarias pueden ser aisladas de fetos (Byrd P, Brown KW, Gallimore PH. 1982. Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. Nature 298: 69-71, Byrd PJ, Grand RJA, Gallimore PH. 1988. Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras. Oncogene 2: 477-484). Las células primarias morirán en cultivo durante varios pasajes. Células HER inmortalizadas por E1 para el fin de la presente invención se derivan de las células HER primarias mediante la expresión de ADN que codifica las proteínas adenovirales E1A y E1B en la misma, para obtener células inmortalizadas. Tales células inmortalizadas pueden ser cultivadas durante más de 100 pasajes. Métodos para obtener células HER inmortalizadas por E1 han sido descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.994.128, en Byrd P, KW Brown, Gallimore PH. 1982. Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. Nature 298: 69-71, en Byrd PJ, Grand RJA, Gallimore PH. 1988. Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras. Oncogene 2: 477-484, y en Gallimore, P.H., Grand, R.J.A. y Byrd, P.J. (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. AntiCancer Res. 6, págs. 499-508. Por ejemplo, células HER inmortalizadas, incluyendo células PER.C1, PER.C3, PER.C4, PER.C5, PER.C6, PER.C8 y PER.C9, fueron generadas por transfección de células HER primarias utilizando un plásmido que contenía las secuencias codificadoras de (Ad5) E1A y E1B de adenovirus serotipo 5 (nucleótidos Ad5 459-3510) bajo el control del promotor de fosfoglicerato quinasa ("PGK") humana (véase la patente de EE.UU. 5.994.128).

En una realización preferida, las células en el procedimiento de la presente invención son células HER inmortalizadas por E1, más preferiblemente células PER.C6 (véase la Patente de EE.UU. 5.994.128). Células PER.C6 se ejemplifican por células tal como están depositadas bajo ECACC N° 96022940 (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 5.994.128, documento EP 0833934 B1).

En el procedimiento de la invención, las células pueden cultivarse en suspensión en cualquier forma, por ejemplo como células inmovilizadas, células individuales o en racimos de células o como una combinación de los mismos. Preferiblemente, las células se cultivan como células individuales y/o racimos de células pequeños de no más de 100 células, más preferiblemente de no más de 20 células. Las células pueden, por ejemplo, ser inmovilizadas sobre microportales tal como están comercialmente disponibles de, por ejemplo, GE Healthcare (Cytodex).

Un reactor tal como se define en esta memoria es un sistema que comprende el cultivo celular, cultivo celular que a su vez comprende células y un medio de cultivo celular. Se proporcionan preferiblemente barreras estériles, tales como filtros de aire, para evitar que otras células contaminen las células deseadas y mantiene preferiblemente un entorno favorable para las células, proporcionando las condiciones de cultivo adecuadas tales como mezcladura, temperatura, pH, concentración de oxígeno, etc.

El reactor puede ser, por ejemplo, de una naturaleza más permanente, por ejemplo el reactor puede ser de acero inoxidable o vidrio o puede ser, por ejemplo, de naturaleza desechable, por ejemplo, el reactor puede ser un matraz o bolsa de plástico. Ejemplos de reactores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a los recipientes de tanque agitado, recipientes neumáticos y bolsas desechables que se pueden mezclar por balanceo, movimiento de sacudimiento o agitación. Se utilizan (bio)reactores preferiblemente desechables, ya que son favorables porque requieren costos de inversión relativamente bajos, tienen una gran flexibilidad operativa, cortos tiempos de respuesta y son fácilmente configurables para el procedimiento. (Bio)reactores desechables están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Hyclone, Sartorius, Applikon o Wave.

La expresión "sistema de separación" se define en el marco de la invención como un sistema capaz de separar en base al peso molecular. El sistema de separación utilizado en el procedimiento de la invención es capaz de separar la sustancia biológica de sustancias que tienen un peso molecular más bajo que la sustancia biológica. En otras palabras, el corte del peso molecular se elige de tal manera que el corte del peso molecular (MWCO) sea menor que, más preferiblemente al menos un factor de 2, más preferiblemente al menos un factor de 3 menor que el peso molecular de la sustancia biológica. Típicamente, pero por supuesto dependiendo del peso molecular de la sustancia biológica producida en el procedimiento de la presente invención, el MWCO del sistema de separación es preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, lo más preferiblemente al menos 30 kDa y preferiblemente a lo sumo 500 kDa, más preferiblemente a lo sumo 300 kDa, lo más preferiblemente a lo sumo 100 kDa. Por ejemplo, para una IgG con un peso molecular de 150 kDa, un sistema de separación que tenga un MWCO de a lo sumo 50 kDa es el más preferido.

Ejemplos de sistemas de separación incluyen, pero no se limitan a filtros, centrífugas y sistemas de extracción bifásicos acuosos.

El término "filtro", tal como se utiliza en esta memoria, pretende incluir todos los dispositivos con la capacidad de separar las partículas en función de su tamaño o peso molecular. En principio, en el procedimiento de la presente invención, se puede utilizar cualquier filtro siempre y cuando el tamaño de poros o el MWCO se elija de modo que la sustancia biológica se separe de sustancias que tengan un peso molecular más bajo que la sustancia biológica, típicamente esto será un tamaño de poros o un MWCO entre 5 y 500 kDa. Ejemplos de filtros adecuados para uso en la presente invención incluyen filtros de membrana, filtros de material cerámico y filtros metálicos. El filtro puede ser utilizado en cualquier forma; el filtro puede ser, por ejemplo, enrollado en espiral o tubular o puede utilizarse en la forma de una hoja. Preferiblemente, en el procedimiento de la invención, el filtro utilizado es un filtro de membrana, preferiblemente un filtro de fibra hueca. Con la expresión "fibra hueca" se quiere dar a entender una membrana tubular. El diámetro interno del tubo es de al menos 0,1 mm, más preferiblemente al menos 0,5 mm, lo más preferiblemente al menos 0,75 mm y preferiblemente el diámetro interno del tubo es a lo sumo de 10 mm, más preferiblemente a lo sumo de 6 mm, lo más preferiblemente a lo sumo de 1 mm. Módulos de filtro que comprende fibras huecas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de General Electric (GE, anteriormente Amersham).

Haciendo circular el cultivo celular que comprende la sustancia biológica, células y el medio de cultivo celular por un sistema de separación, la sustancia biológica y las células quedan retenidas en el reactor y, por lo tanto, el flujo de salida de líquido tiene una menor concentración de sustancia biológica y una densidad celular inferior que el cultivo celular. Habitualmente, en el procedimiento de la invención, el flujo de salida de líquido no contiene o apenas contiene cualquier sustancia biológica y células. Habitualmente, el flujo de salida de líquido esencialmente sólo contiene componentes que tienen un peso molecular menor que el de la sustancia biológica. Esencialmente todas las células y esencialmente toda sustancia biológica quedan, por lo tanto, habitualmente retenidos en el reactor.

Preferiblemente, el tamaño de los poros o el MWCO del filtro se elige de manera que el tamaño de los poros o el MWCO del filtro es menor que, más preferiblemente al menos un factor de 2, más preferiblemente al menos un factor de 3 menor que el diámetro o el peso molecular del producto, asegurando una alta retención de producto. Típicamente, pero, por supuesto, dependiendo del tamaño o del peso molecular del producto, es decir, sustancia biológica producida en el procedimiento de la presente invención, el tamaño de los poros o MWCO del filtro es preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, lo más preferiblemente al menos 30 kDa y/o el tamaño de los poros o el MWCO del filtro/membrana es preferiblemente a lo sumo 500 kDa, más preferiblemente a lo sumo 300 kDa, lo más preferiblemente a lo sumo 100 kDa.

Con el corte del peso molecular (MWCO) se quiere dar a entender el peso molecular por encima del cual al menos el 90% de las partículas queda retenido por el sistema de separación.

Haciendo circular el cultivo celular por un sistema de separación, por ejemplo un filtro, significa que el cultivo celular se hace pasar a través de un sistema de separación, por ejemplo un filtro que resulta en un flujo de salida de líquido y un flujo, cuyo contenido se mantiene en o se retro-alimenta al reactor. El flujo, cuyo contenido se mantiene en o se retro-alimenta al reactor contendrá normalmente en esencia sólo componentes que tiene un peso molecular al

menos igual al de la sustancia biológica o superior y, por lo tanto, dicho flujo comprenderá más sustancia biológica que el flujo de salida de líquido.

5 En principio, no es crítico cuando se inicie la circulación del cultivo celular por el sistema de separación durante el procedimiento de la invención. La circulación del cultivo celular puede iniciarse, por ejemplo, directamente desde el inicio del procedimiento o cuando la densidad de células viables de las células ha alcanzado un cierto nivel.

10 La circulación del cultivo celular por un filtro puede ser un flujo sustancialmente perpendicular con respecto a la superficie del filtro, también conocido como flujo de extremo muerto, o un flujo sustancialmente paralelo a la superficie del filtro, también conocido como flujo tangencial, por ejemplo flujo tangencial unidireccional (TFF) o flujo transversal. Un ejemplo preferido de flujo transversal es un flujo tangencial alterno (ATF), ya que con un ATF se encontró que no se produce (rápidamente) la obstrucción del filtro, incluso a densidades celulares muy altas. Es de conocimiento general común que en la filtración de profundidad, el filtro final de poros pequeños necesita ser protegido de la obstrucción por pre-filtros toscos. Esta práctica se basa en el conocimiento general común de que filtros con poros más pequeños o con un MWCO menor se obstruyen más fácilmente, limitando así el tiempo de producción. Si se utiliza un ATF, el uso de un pre-filtro se convierte en superfluo.

15 El flujo puede ser dirigido moviendo el cultivo celular, moviendo el filtro o ambos. El filtro puede, por ejemplo, ser movido por rotación (filtro rotatorio) o vibración (filtro vibratorio). Alternativamente, si el flujo se dirige moviendo el cultivo celular solamente, el filtro es estático y el cultivo celular puede, por ejemplo, ser movido por medio de bombas o presión.

20 Con "flujo tangencial alterno" se quiere dar a entender que existe un flujo en la misma dirección que (es decir, tangencial a) la o las superficies del filtro, flujo que va hacia atrás y adelante, y que existe otro flujo en una dirección sustancialmente perpendicular a dicha superficie de filtro. El flujo tangencial alterno se puede lograr de acuerdo con métodos conocidos por la persona experta en la técnica (por ejemplo tal como se describe en el documento US 6.544.424).

25 Durante el cultivo de las células, al menos un componente del medio de cultivo celular, por ejemplo uno o más nutrientes y/o medio de cultivo celular se puede alimentar a las células. En el procedimiento de acuerdo con la invención, es ventajoso complementar en parte o preferiblemente en su totalidad al menos uno de los nutrientes agotados por medio de una alimentación de este nutriente o estos nutrientes al reactor. Por ejemplo, se puede alimentar al reactor medio de cultivo celular completo, lo cual es ventajoso ya que entonces no se necesita preparar por separado una alimentación separada. El medio de cultivo celular también se puede, por ejemplo, alimentar a las células en una forma más concentrada; esto es ventajoso, ya que volúmenes más pequeños son más fáciles de manejar. También uno o más nutrientes pueden ser alimentados al reactor. Por ejemplo, hidratos de carbono, por ejemplo glucosa o fructosa; aminoácidos tales como glutamina y/o péptidos pueden ser ventajosamente alimentados al reactor.

35 En una realización preferida de la invención, las condiciones del cultivo celular se eligen de modo que no esté limitada la tasa de crecimiento celular y/o la productividad específica de las células, y más preferiblemente de manera que la concentración de al menos uno de los componentes del medio de cultivo celular siga siendo esencialmente constante. Ejemplos de condiciones de cultivo celular limitantes son limitaciones de nutrientes y formación de metabolitos inhibidores tales como amoníaco, dióxido de carbono y lactato. Por ejemplo, se pueden elegir condiciones de cultivo celular tales como la alimentación, de manera que la tasa de crecimiento celular no esté limitada, por ejemplo, mediante el suministro de nutrientes suficientes como para compensar el agotamiento y/o para evitar la producción de metabolitos inhibidores tales como lactato o amoníaco. Por ejemplo, las condiciones de aireación pueden elegirse de manera que la formación de dióxido de carbono no limite la tasa de crecimiento celular. El cultivo de la célula en condiciones no limitantes es muy ventajoso desde un punto de vista de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), ya que 1) esto puede dar un entorno de cultivo celular constante que en muchos casos también da una calidad del producto constante y buena y 2) esto puede conducir a una viabilidad celular alta, en algunos casos a una viabilidad celular de más de 98%. La viabilidad celular alta reduce la liberación de contaminantes celulares relacionados tales como proteínas de la célula huésped, lo que facilita la purificación del producto. Además de ello, el cultivo de las células a una tasa de crecimiento celular ilimitada y/o una productividad específica ilimitada tiene la ventaja comercial de que es posible producir más sustancia biológica en un tiempo incluso más corto dado que se alcanzará antes una mayor densidad celular en el procedimiento.

"Productividad específica" de las células es la cantidad de una sustancia biológica dada producida por célula por unidad de tiempo y, por lo general, se expresa en  $\text{pg.célula}^{-1}\text{día}^{-1}$ .

La tasa de adición de al menos un componente del medio de cultivo celular, por ejemplo nutrientes y/o medio de cultivo celular al cultivo celular (la tasa de flujo de entrada o tasa de perfusión) influye sobre la viabilidad y la

densidad de las células. En el procedimiento de la invención, el o los componentes del medio de cultivo celular tales como nutrientes y/o medio de cultivo celular, pueden ser alimentados por ejemplo, en un flujo continuo, un flujo semi-continuo, por ejemplo de flujo paso a paso o flujo escalonado. Preferiblemente, el o los componentes del medio de cultivo celular, por ejemplo nutrientes y/o medio de cultivo celular se añaden en un flujo continuo.

5      Componente o componentes del medio de cultivo celular tales como medio y/o nutrientes de cultivo celular completo pueden, en principio, alimentarse al reactor en cualquier momento durante el proceso. Preferiblemente, la alimentación se inicia antes de que sustratos tales como glutamina y glucosa hayan alcanzado niveles tan bajos como para provocar el crecimiento de las células a cesar o antes de que metabolitos inhibitorios, por ejemplo lactato  
10     o amoniaco alcancen niveles tan altos que cesara el crecimiento. Desde este punto en adelante, el o los componentes del medio de cultivo celular tales como nutrientes y/o medio de cultivo celular completo se alimentan preferiblemente al reactor a una velocidad tal que se satisface la demanda de sustrato.

En una realización de la invención, se añade medio de cultivo celular a una tasa de alimentación de acuerdo con la fórmula (1):

$$\text{Tasa de alimentación} = \text{SFR} \times (\text{volumen total de cultivo celular}) \times (\text{densidad de células viables}) \quad (1)$$

15     en donde la tasa de alimentación se expresa en litros por día, en donde la SFR es la tasa de alimentación específica, es decir, la tasa a la que el medio de cultivo celular se alimenta al cultivo celular, expresada como el volumen del medio añadido por célula viable por unidad de tiempo, y en donde la densidad de células viables es el número de células viables por unidad de volumen. El número de células viables puede ser determinado por la persona experta en la técnica, por ejemplo, a través del método de exclusión con azul de tripano. La tasa de  
20     alimentación específica se elige preferiblemente entre 0,01 y 0,3 nL/célula/día, más preferiblemente entre 0,01 y 0,2 nL/célula/día.

Puede ser ventajoso tener en cuenta parámetros adicionales cuando se ajusta la velocidad de alimentación, por ejemplo la cantidad de glucosa que se ha de alimentar al cultivo y/o la tasa de absorción de oxígeno. Por ejemplo, para PER.C6 la tasa de alimentación del medio de cultivo celular y/o los nutrientes se elige preferiblemente de tal  
25     manera que la concentración de glucosa se mantiene entre 3 y 20 mmol/L, más preferiblemente entre 5 y 15 mmol/L. Preferiblemente, la concentración de glucosa es de al menos 3 mmol/L, más preferiblemente al menos 5 mmol/L y preferiblemente a lo sumo 20 mmol/L, más preferiblemente a lo sumo 15 mmol/L.

En una realización especial de la invención, cultivo celular (que comprende células, sustancia biológica y medio de cultivo celular) se separa al menos una vez del reactor y el líquido, por ejemplo, el medio de cultivo celular o una  
30     alimentación de nutrientes se añade al reactor para compensar la separación del cultivo celular. La separación de cultivo celular puede conducir a tiempos de proceso más largos a altas densidades celulares en combinación con altas viabilidades celulares que resultan en una mayor productividad. El cultivo celular se puede retirar de forma continua o escalonadamente.

En una realización preferida de la invención, el cultivo celular (que comprende células, medio de cultivo celular y sustancia biológica) se retira del reactor tan pronto como se alcance la densidad celular deseada, por ejemplo una  
35     densidad celular de al menos  $10 \cdot 10^6$  células viables/ml, preferiblemente de al menos  $20 \cdot 10^6$  células viables/ml, más preferiblemente de al menos  $30 \cdot 10^6$  células viables/ml, por ejemplo una densidad celular de a lo sumo  $200 \cdot 10^6$  células viables/ml, y líquido, por ejemplo medio de cultivo celular o alimentación de nutrientes se añade al reactor para compensar la separación de cultivo celular. Preferiblemente, el cultivo celular se separa a tal velocidad que la  
40     densidad celular se mantiene en el intervalo de densidades celulares deseado. Esta realización de la invención es muy ventajosa en comparación con un proceso discontinuo o discontinuo alimentado convencional, ya que combina las ventajas del procedimiento de la invención con alta viabilidad que se puede mantener más tiempo, haciendo posible realizar una aún mayor productividad volumétrica global. Con 'productividad volumétrica' se quiere dar a  
45     entender la cantidad de sustancia biológica producida por unidad de volumen de reactor por unidad de tiempo y habitualmente se expresa en  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ . En comparación con un proceso de perfusión convencional, esta realización de la invención también es muy ventajosa, ya que combina las ventajas del procedimiento de la invención con una corriente de separación de cultivo celular que tiene una alta concentración de sustancia biológica. La alta concentración de sustancia biológica en la corriente de separación de cultivo celular hace que sea comercialmente interesante para recolectar la sustancia biológica de la misma. En un proceso de perfusión convencional, en el que se  
50     separa cultivo celular, la corriente de separación de cultivo celular no contiene suficiente sustancia biológica como para hacerla comercialmente interesante para recolectar la sustancia biológica y la corriente de separación de cultivo celular se considera, por lo tanto, habitualmente como un desecho. Por lo tanto, en esta realización de la invención, en teoría toda sustancia biológica producida se puede recolectar de una manera directa, económicamente viable y sencilla.

5 En una realización particularmente preferida de la invención, las condiciones de cultivo celular se eligen de manera que la tasa de crecimiento celular y/o la productividad específica de las células no está limitado y más preferiblemente de tal manera que también la concentración de al menos uno de los componentes del medio del cultivo celular tal como glucosa o glutamina permanezca constante y el cultivo celular se separa al menos una vez del reactor tan pronto como se alcanza la densidad celular deseada, y líquido, por ejemplo medio de cultivo celular se añade al reactor para compensar la separación de cultivo celular.

Preferiblemente, la tasa del flujo de salida se elige de manera que sea sustancialmente igual a la tasa de adición de al menos un componente de medio de cultivo, por ejemplo, nutrientes y/o medio de cultivo celular menos la tasa de la separación de cultivo celular opcional.

10 Células que producen una sustancia biológica son, por ejemplo, células capaces de expresar un gen que codifica la sustancia biológica. Células capaces de expresar un gen que codifica la sustancia biológica se pueden preparar, por ejemplo, mediante transfección de las células con un plásmido que contiene el gen que codifica la sustancia biológica y un gen que codifica un marcador de selección adecuado, por ejemplo un gen que codifica una resistencia a neomicina (gen marcador Neo). Células transfectadas de manera estable pueden entonces ser seleccionadas por  
 15 la presión de selección, por ejemplo - en el caso de un gen marcador Neo - mediante el cultivo de las células transfectadas en presencia de G418 (genericina) y el rastreo inmediato de las células en cuanto a células que exhiban una expresión de alto nivel de la sustancia biológica. Métodos para preparar clones de células HER immortalizadas por E1 que expresan una proteína, y métodos para cultivar este tipo de células para producir la proteína, son bien conocidos para el experto, y pueden encontrarse, por ejemplo, en el documento US 6.855.544.

20 Sustancias biológicas que pueden ser producidas por las células, por ejemplo mediante la expresión de un gen (recombinante) que codifican las mismas, son, por ejemplo, proteínas (recombinantes), en particular receptores, enzimas, proteínas de fusión, proteínas de la sangre tales como proteínas de la cascada de coagulación de la sangre, proteínas multifuncionales tales como, por ejemplo, eritropoyetina, virus o proteínas bacterianas, por ejemplo para su uso en vacunas; inmunoglobulinas tales como anticuerpos, por ejemplo IgG o IgM, y similares;  
 25 preferiblemente una proteína, más preferiblemente un anticuerpo se produce por parte de las células. Preferiblemente, las sustancias biológicas tales como proteínas o vacunas producidas por las células se pueden utilizar como un ingrediente activo en una preparación farmacéutica. En el contexto de la presente invención, el término 'producto' y la expresión 'sustancia biológica' son intercambiables.

30 En el marco de la presente invención, con preparación farmacéutica se quiere dar a entender cualquier preparación, que puede ser utilizada como un medicamento, en particular como un medicamento en seres humanos. Un medicamento de este tipo, por ejemplo, puede ser utilizado para el diagnóstico, o para el propósito profiláctico tal como, por ejemplo, una vacuna, y/o para fines terapéuticos tal como, por ejemplo, una enzima o proteína para la cual un paciente es deficiente, o un anticuerpo para matar células indeseadas. Una preparación farmacéutica puede  
 35 contener, además, un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, ejemplos de los cuales son bien conocidos por la persona experta en la técnica.

La línea celular PER.C6 se puede utilizar para la producción de sustancias biológicas tales como adenovirus con delección de E1 (véase, p. ej., la patente de EE.UU. 6.994.128; Nichols et al, 2002, Propagation of adenoviral vectors: use of PER.C6 cells. En: Curiel D, Douglas JT, compiladores. Adenoviral vectors for gene therapy. San Diego: Elsevier. págs. 129-167), otros virus (véase, p. ej., el documento WO 01/38362), o proteínas recombinantes (véase,  
 40 p. ej., la patente de EE.UU. 6.855.544; Yallop et al, 2005, PER.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins, Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization, 4 Volúmenes, 779-807, Jörg Knäblein (Compilador)).

Ejemplos de proteínas que se pueden utilizar como un ingrediente activo en preparaciones farmacéuticas (con el nombre de marca entre paréntesis) incluyen tenecteplasa (TN Kase™), factor antihemofílico (recombinante) (ReFacto™), interferón linfoblastoide  $\alpha$ -n1 (Wellferon™), factor de coagulación (recombinante) (NovoSeven™), etanercept, (Enbrel™), trastuzumab (Herceptin™), infliximab (Remicade™), palivizumab (Synagis™), basiliximab (Simulect™), daclizumab (Zenapaz™), rituximab (Rituxan™), factor de coagulación (recombinante) IX (Benefix™) e interferón  $\beta$ -1a (Avonex™).

50 Ejemplos de vacunas que se pueden utilizar como un ingrediente activo en la preparación farmacéutica incluyen antígenos de proteínas aislados, ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a vacuna contra el rotavirus viva, oral y tetravalente (RotaShield™), vacuna contra la rabia (RanAvert™), vacunas contra la gripe y vacuna contra la hepatitis A inactivada (VAQTA™).

El pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y osmolaridad del medio de cultivo celular son, en principio, no críticos y dependen del tipo de célula elegida. Preferiblemente, el pH, la concentración de oxígeno disuelto y la

osmolaridad se eligen de manera que sean óptimos para el crecimiento y la productividad de las células. La persona experta en la técnica sabe cómo encontrar el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad óptimos para el cultivo (véase. p. ej., el documento WO 2004/099396). Preferiblemente, para el procedimiento de la invención cuando se utilizan células HER inmortalizadas por E1, el pH se elige entre 6,6 y 7,6 y/o la temperatura se elige entre 30 y 39°C y/o la osmolaridad se elige entre 260 y 400 mOsm/kg. Para mantener condiciones del procedimiento óptimas se desea la automatización para controlar las condiciones del procedimiento. Con el fin de optimizar las condiciones del procedimiento, por ejemplo, para obtener la detención del crecimiento para una productividad celular incrementada, durante el cultivo se puede aplicar un cambio en las condiciones de cultivo. Esto se puede establecer, por ejemplo, mediante un cambio de temperatura (tal como de 37 a 32°C), un cambio del pH o un cambio de la osmolaridad.

El procedimiento de la presente invención puede realizarse, en principio, en cualquier tipo de medio de cultivo celular adecuado para el cultivo de células. Directrices para la elección de un medio de cultivo celular y condiciones del cultivo celular son bien conocidas y se proporcionan, por ejemplo dispuesto en los Capítulos 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.

Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender, por ejemplo, como un componente del medio de cultivo celular una fuente de hidratos de carbono, sales y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o lípidos y/o detergentes y/o tampones y/o factores de crecimiento y/u hormonas y/o citoquinas y/u oligoelementos. Ejemplos de fuentes de hidratos de carbono incluyen glucosa, fructosa, galactosa y piruvato. Ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MgSO_4$  y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , sales de hierro, por ejemplo  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 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  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Ejemplos de aminoácidos incluyen todos los aminoácidos proteinogénicos conocidos, por ejemplo histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Ejemplos de vitaminas incluyen: ascorbato, biotina, colina, Cl, mio-inositol, D-pantotenato, riboflavina. Ejemplos de lípidos incluyen: ácidos grasos, por ejemplo ácido linoleico y ácido oleico. Ejemplos de detergentes incluyen Tween® 80 y Pluronic® F68. Ejemplos de tampones incluyen HEPES y  $Na_2CO_3$ . Ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citoquinas incluyen IGF (factor de crecimiento de tipo insulina), hidrocortisona e insulina (recombinante). Ejemplos de oligoelementos son conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen Zn, Mg y Se. El medio de cultivo celular puede comprender, por ejemplo, también otros componentes del medio de cultivo celular, por ejemplo, peptona de soja o etanol amina.

Para la producción de sustancias biológicas de acuerdo con la invención, en particular si las sustancias biológicas se han de utilizar como un ingrediente activo en preparaciones farmacéuticas, se prefiere medio libre de suero para medios que contienen una fuente de suero. La razón de esto es que los medios de fuente de suero pueden estar contaminados con virus, presentan el riesgo de infecciones priónicas y pueden constituir un obstáculo importante en el procesamiento aguas abajo del producto biofarmacéutico (es decir, la purificación adicional de la sustancia biológica del cultivo celular). Por lo tanto, el procedimiento de la invención se realiza preferiblemente en un medio de cultivo celular que no comprende suero de una fuente animal, incluyendo el ser humano. Puesto que los compuestos de una fuente de mamífero también presentan un riesgo de infección, preferiblemente el medio de cultivo celular está libre de una fuente de mamífero (es decir, el medio de cultivo celular no comprende suero ni componentes de una fuente de mamífero). Más preferiblemente, el medio de cultivo celular está libre de una fuente animal (es decir, el medio de cultivo celular no comprende suero ni componentes de un animal, incluyendo una fuente de ser humano). Ejemplos de medio libre de suero que se pueden utilizar para el cultivo de células PER.C6 incluyen medios comercialmente disponibles tales como, por ejemplo, medio EX Cell™ VPRO (SAFC), HyQ® CDM4Retino™ (Hyclone), IS Provec CD (Irvine Scientific), 293-SFM II (Invitrogen).

En realizaciones preferidas, la sustancia biológica producida en el procedimiento de la presente invención se recolecta a partir del flujo cuyo contenido se mantiene en o preferiblemente se retro-alimenta al reactor o a partir del cultivo de células que se separa del reactor o de ambos. La o las sustancias biológicas producidas en el procedimiento de la presente invención se pueden cosechar adicionalmente del cultivo celular en el denominado procesamiento aguas abajo, utilizando métodos que dependen de la sustancia biológica, métodos que como tales son bien conocidos por la persona experta. El procesamiento aguas abajo comprende habitualmente varias etapas de purificación en diferentes combinaciones y orden. Ejemplos de etapas de purificación en el procesamiento de aguas abajo son etapas de separación (p. ej., mediante cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio de iones y/o extracción mediante sistemas acuosos bifásicos y/o precipitación mediante, por ejemplo, sulfato de amonio), etapas para la concentración de la sustancia biológica (p. ej., mediante ultrafiltración o diafiltración), etapas para intercambiar tampones y/o etapas para separar o inactivar virus (p. ej., mediante la filtración de virus, cambio del pH o tratamiento con detergente disolvente).

En un aspecto, la invención se refiere a un cultivo celular que comprende células de mamífero, preferiblemente células HER inmortalizadas por E1, más preferiblemente células PER.C6, que tiene una densidad de células viables de al menos  $50 \cdot 10^6$  células/mL, preferiblemente al menos  $60 \cdot 10^6$  células/mL, en particular al menos  $90 \cdot 10^6$



células/mL y una concentración de sustancia biológica de al menos 5 g/L, más preferiblemente al menos 10 g/L, en particular al menos 11 g/L. En principio, la concentración de la sustancia biológica puede ser tan alta como lo permita la solubilidad de la sustancia biológica. La concentración de células viables es típicamente no mayor que  $200 \cdot 10^6$  células/mL y preferiblemente dentro del intervalo de  $80\text{-}150 \cdot 10^6$  células/mL.

- 5 La densidad de células viables se puede determinar, por ejemplo, utilizando el método de exclusión con azul de tripano, por ejemplo mediante el uso de un contador de células tal como está comercialmente disponible de, por ejemplo, Innovatis (contador de células Cedex).

10 Con cultivo celular se quiere dar a entender el líquido que comprende medio de cultivo celular, células y sustancia biológica, líquido que es el resultado de un proceso para el cultivo de células en un reactor en un medio de cultivo celular, en el que las células producen la sustancia biológica.

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

#### Descripción de las figuras

- 15 Fig. 1/9. muestra la densidad de células viables  $Y$  ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representada gráficamente frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C1 (procedimiento de la invención).
- Fig. 2/9. muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A) frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C1 (procedimiento de la invención).
- 20 Fig. 3/9. muestra la densidad de células viables  $Y$  ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representada gráficamente frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C2 (procedimiento de la invención).
- Fig. 4/9. muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A) frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C2 (procedimiento de la invención).
- 25 Fig. 5/9. muestra la densidad de células viables  $Y$  ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representada gráficamente frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C3 (procedimiento de la invención).
- Fig. 6/9. muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A3) frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para los procesos A y C3.
- 30 Fig. 7/9. muestra el rendimiento acumulativo  $Q$  (% en comparación con el rendimiento en el proceso A, por  $L$  de volumen de reactor) representado gráficamente frente el tiempo  $X$  del procedimiento (días) para los procesos A, B y C3.
- Fig. 8/9. muestra el número de células  $Y$  ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representado gráficamente frente el tiempo  $X$  del procedimiento (días) para C4 (procedimiento de la invención).
- 35 Fig. 9/9. muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración máxima de IgG alcanzada frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso C4 (una realización del procedimiento de la invención)

#### **Ejemplos**

40 Ejemplo 1: Comparación entre un proceso discontinuo, un proceso discontinuo alimentado y el procedimiento de acuerdo con la invención

En este ejemplo, el rendimiento del procedimiento de acuerdo con la presente invención se comparó con los procesos discontinuo y discontinuo-alimentado.

45 La Fig. 1/9 muestra la densidad de células viables  $Y$  ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representada gráficamente frente al tiempo  $X$  del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C1 (procedimiento de la invención).

La Fig. 2/9 muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A) frente al tiempo X del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C1 (procedimiento de la invención).

5 Todas las fermentaciones se realizaron utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5°C, el pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación del aire de 50% y a 200 rpm. Se utilizó en todos los experimentos la misma línea células PER.C6 productora de IgG (véase el documento WO 2004/099396).

#### Proceso discontinuo A

10 El proceso discontinuo se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 L en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \times 10^5$  células/mL en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM y subsiguientemente se cultivaron durante 17 días.

#### Proceso discontinuo-alimentado B

15 El proceso discontinuo-alimentado se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 L en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \times 10^5$  células/mL en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM. Durante el cultivo se añadieron glucosa y glutamina para mantener la concentración por encima de, respectivamente, 15 mM y 1 mM. Los aminoácidos y péptidos se añadieron a partir del día 5 para reponer los aminoácidos consumidos.

#### Procedimiento de la invención C1

20 El procedimiento de la invención se llevó a cabo en un recipiente Applikon de 2 L. Se utilizó una membrana de fibra hueca con un corte de peso molecular (MWCO) de 100 kDa obtenida de General Electric (GE) hecha funcionar en modo de flujo ATF con un sistema ATF-2 (Refine Technology) para retener las células y el producto de IgG. El cultivo se inició con  $3 \times 10^5$  células/mL en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM. Medio de cultivo VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM se perfundió a través del cultivo celular en suspensión utilizando una tasa de flujo específica (SFR) entre 0,05 y 0,2 nL/célula/día. La concentración de producto más elevada obtenida fue de 1,4 g/L.

25 El procedimiento de la invención dio como resultado densidades de células viables incrementadas y concentraciones de productos incrementadas en comparación con los modos de cultivo mencionados en menos tiempo, como puede verse de la Fig. 1 y la Fig. 2 que figuran a continuación.

#### Ejemplo 2: Comparación entre un proceso discontinuo, un proceso discontinuo alimentado y el procedimiento de acuerdo con la invención

30 En este ejemplo, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se compara de nuevo con los procesos discontinuo y discontinuo-alimentado; en el proceso C2 se controla la presión de CO<sub>2</sub> y se utilizó un sistema de separación de 50 kDa.

35 La Fig. 3/9 muestra la densidad de células viables Y ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representada gráficamente frente al tiempo X del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C2 (procedimiento de la invención).

La Fig. 4/9 muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A) frente al tiempo X del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C2 (procedimiento de la invención).

40 Todas las fermentaciones se realizaron utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación del aire de 50% y a 200 rpm. Se utilizó en todos los experimentos la misma línea células PER.C6 productora de IgG (de aproximadamente 150 kDa) (véase el documento WO 2004/099396).

#### Proceso discontinuo A

45 El proceso discontinuo se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 L en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM y subsiguientemente se cultivaron durante 17 días.

Proceso discontinuo-alimentado B

El proceso discontinuo-alimentado se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 L en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM. Durante el cultivo se añadieron glucosa y glutamina para mantener la concentración por encima de, respectivamente, 15 mM y 1 mM. Los aminoácidos y péptidos se añadieron a partir del día 5 para reponer los aminoácidos consumidos.

Procedimiento de la invención C2

El procedimiento de la invención se llevó a cabo en un recipiente Applikon de 2 L. Se utilizó una membrana de fibra hueca (GE) con un corte de peso molecular (MWCO) de 50 kDa hecha funcionar en modo de flujo ATF con un sistema ATF-2 (Refine Technology) para retener las células y el producto de IgG. El cultivo se inició con  $3 \times 10^5$  células/mL en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM. Medio de cultivo VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM se perfunde a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,05 y 0,2 nL.célula<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. La presión de CO<sub>2</sub> se controló por debajo de 15%.

Resultado

Como puede verse en la Fig. 3/9 y en la Fig. 4/9, el procedimiento de acuerdo con la invención resulta en densidades de células viables significativamente incrementadas y concentraciones de producto incrementadas (2415% x rendimiento discontinuo; 690% x rendimiento discontinuo-alimentado) en tiempo igual o inferior (tiempo discontinuo 100%; tiempo discontinuo-alimentado 81%).

El aumento de la productividad global en g.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> del procedimiento de la invención es 23,9 veces la productividad discontinua en g.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup> y 8,5 veces la productividad discontinua-alimentada en g.L<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. En el procedimiento de la invención C2, se produjeron 11,1 g de producto/L. La obstrucción del dispositivo de retención no se produjo durante 17 días, incluso con muy alta densidad celular.

Ejemplo 3: Comparación entre un proceso discontinuo, un proceso discontinuo-alimentado y el procedimiento de acuerdo con la invención.

En este ejemplo, el comportamiento del procedimiento de acuerdo con la presente invención con separación del cultivo celular se compara de nuevo con los procesos discontinuo y discontinuo-alimentado; en el proceso C3 se ha separado el cultivo celular.

La Fig. 5/9 muestra la densidad de células viables Y ( $10^6$ .ml<sup>-1</sup>) representada gráficamente frente al tiempo X del procedimiento (días) para el proceso A (discontinuo), B (discontinuo-alimentado) y C3 (procedimiento de la invención).

La Fig. 6/9 muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A3) frente al tiempo X del procedimiento (días) para los procesos A y C3.

La Fig. 7/9 muestra el rendimiento acumulativo Q (% en comparación con el rendimiento en el proceso A, por L de volumen de reactor) representado gráficamente frente el tiempo X del procedimiento (días) para los procesos A, B y C3.

Todas las fermentaciones se realizaron utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación del aire de 50% y a 200 rpm. Se utilizó en todos los experimentos la misma línea células PER.C6 productora de IgG (de aproximadamente 150 kDa) (véase el documento WO 2004/099396).

Proceso discontinuo A

El proceso discontinuo se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 L en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \cdot 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM y subsiguientemente se cultivaron durante 17 días.

Proceso discontinuo-alimentado B

El proceso discontinuo-alimentado se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 L en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \cdot 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM. Durante el cultivo se añadieron glucosa y glutamina para mantener la concentración por encima de, respectivamente, 15 mM y 1 mM. Los aminoácidos y péptidos se añadieron a partir del día 5 para reponer los aminoácidos consumidos.

#### Procedimiento de la invención C3

El procedimiento de la invención se llevó a cabo en un recipiente Applikon de 2 L. Se utilizó una membrana de fibra hueca (GE) con un corte de peso molecular (MWCO) de 100 kDa hecha funcionar en modo de flujo ATF con un sistema ATF-2 (Refine Technology) para retener las células y el producto de IgG. El cultivo se inició con  $3 \times 10^5$  células/mL en medio VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM. Medio de cultivo VPRO (SAFC) suplementado con L-glutamina 6 mM se perfunde a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,05 y 0,2 nL.célula<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. El cultivo celular se retira al 10% del volumen de trabajo por día por encima de  $10 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> y al 30% del volumen de trabajo por día cuando la densidad de células viables excede de  $30 \cdot 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> y en adelante.

#### Resultado

Como puede verse en la Fig. 5/9 con el procedimiento de la invención se alcanzan rápidamente densidades de células viables superiores. Además de ello, la Fig. 5/9 también muestra que la viabilidad de las células se puede mantener durante más tiempo con el procedimiento de la invención, dado que el proceso C3 se mantuvo en funcionamiento a lo largo de un período de casi 40 días, porque no se produjo obstrucción del dispositivo de retención, incluso con altas densidades de células.

La Fig. 6/9 muestra que las concentraciones de producto para el procedimiento de la presente invención son mucho más altas que la concentración del producto en el proceso discontinuo. El flujo de producto que contenía el producto se recogió del proceso C3 en aproximadamente 200% a 250% veces la concentración final en el proceso discontinuo A.

La Fig. 7/9 muestra que la mayoría del producto se forma por el procedimiento de la presente invención y que el procedimiento de la invención se puede mantener más tiempo que el procedimiento discontinuo A o discontinuo-alimentado B. El día 17, el rendimiento acumulativo del proceso C3 es 8,1 veces el rendimiento acumulativo del proceso discontinuo (A3) y 2,1 veces el rendimiento acumulativo del proceso discontinuo-alimentado (B). También, el día 17, finalizó el proceso discontinuo. El día 21, el rendimiento acumulativo del proceso C3 es 3,0 veces el rendimiento acumulativo del proceso discontinuo-alimentado B. El día 21, finalizó el proceso discontinuo-alimentado. Después de 39 días, el rendimiento acumulativo global del proceso C3 es 25 veces el rendimiento acumulativo del proceso discontinuo A y 6 veces el rendimiento del proceso discontinuo-alimentado B.

Se puede concluir a partir de este experimento que el rendimiento global de un material biológico deseado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención puede mejorarse adicionalmente mediante la aplicación de una sangría del cultivo celular cuando la densidad celular excede un cierto nivel alto.

#### Ejemplo 4: Cultivo y producción con células CHO.

En este ejemplo el procedimiento de acuerdo con la presente invención se ha realizado con una línea celular CHO productora de IgG e incluye una caída de temperatura para disminuir el crecimiento celular.

La Fig. 8/9 muestra el número de células Y ( $10^6$  .ml<sup>-1</sup>) representado gráficamente frente el tiempo X del procedimiento (días) para C4 (procedimiento de la invención).

La Fig. 9/9 muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración máxima de IgG alcanzada frente al tiempo X del procedimiento (días) para el proceso C4 (una realización del procedimiento de la invención)

La fermentación se realizó utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5°C, pH entre 7,1 y 6,9 y la DO a una saturación del aire de 40% y a 100 rpm. La temperatura se hizo descender a 32°C el día 5.

#### Procedimiento de la invención C4

5 El procedimiento de la invención se llevó a cabo en un recipiente Applikon de 2 L. El dispositivo de retención de células y producto es una membrana de fibra hueca (General Electric) con un corte de peso molecular (MWCO) de 50 kD hecha funcionar en modo de flujo ATF con un sistema ATF-2 (Refine Technology). El cultivo se inició con  $5 \cdot 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  en medio de cultivo MTCM-49 (Hyclone). El medio se perfundió a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,1 y 0,4 nL.célula<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. La presión de CO<sub>2</sub> se controló por debajo de 15%.

#### Resultado

10 Los datos muestran que el procedimiento de la invención también funciona cuando se utiliza una línea celular CHO productora de proteínas. La densidad celular lograda y las concentraciones de los productos están incrementadas en comparación con el cultivo discontinuo. Los datos también demuestran que en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede detener el crecimiento celular (p. ej., mediante una caída de la temperatura), mientras que continúa la acumulación de producto en el sistema de cultivo.

#### Ejemplo 5: Procedimiento de la invención realizado con una línea celular de mieloma.

15 El procedimiento de acuerdo con la presente invención también puede aplicarse a líneas celulares de mieloma. Para ello, la fermentación se realiza utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación de aire de 40% y a 100 rpm. El cultivo de las células comienza con la inoculación de las células de mieloma a razón de  $3 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo SFM4Mab (Hyclone) en un recipiente Sartorius de 5 L. El dispositivo de retención de células y producto es una membrana de fibra hueca (General Electric) con un corte de peso molecular (MWCO) de 30 kD hecha funcionar en modo de flujo ATF con un sistema ATF-4 (Refine Technology). El medio de cultivo SFM4Mab (Hyclone) se perfunde a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,1 y 0,4 nL.célula<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. La presión de CO<sub>2</sub> se controla por debajo de 15%.

#### Ejemplo 6: Procedimiento de la invención realizado con una línea celular MDCK

25 El procedimiento de acuerdo con la presente invención también puede aplicarse a líneas celulares MDCK. Para ello, la fermentación se realiza utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación de aire de 40% y a 100 rpm. El cultivo de las células comienza con la inoculación de las células MCDK transformadas a razón de  $3 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo VP-SFM (Invitrogen) en un recipiente Sartorius de 5 L. El dispositivo de retención de células y producto es una membrana de fibra hueca (General Electric) con un corte de peso molecular (MWCO) de 30 kD hecha funcionar en modo de flujo ATF con un sistema ATF-4 (Refine Technology). El medio de cultivo VP-SFM (Invitrogen) se perfunde a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,1 y 0,4 nL.célula<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. La presión de CO<sub>2</sub> se controla por debajo de 15%.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para el cultivo de células eucariotas en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular, en el que las células producen una proteína recombinante
- 5 en el que al menos un componente del medio de cultivo celular se introduce en el cultivo celular y en el que el cultivo celular que comprende las células, la proteína recombinante y el medio de cultivo celular se hace circular sobre un filtro en un flujo sustancialmente paralelo a la superficie de dicho filtro, lo que resulta en un flujo de salida de líquido y un flujo, cuyo contenido se mantiene en o se retro-alimenta al reactor, en el que el filtro tiene un tamaño de poros adecuado para separar la proteína recombinante de sustancias que tienen un peso molecular más bajo que la proteína recombinante y
- 10 en el que el flujo de salida consiste esencialmente en componentes que tienen un peso molecular menor que el de la proteína recombinante, y en el que la proteína recombinante es retenida en o retro-alimentada al reactor.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que parte de las sustancias de menor peso molecular se separan continuamente del cultivo celular
- 15 3. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las células eucariotas son células de mamífero.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las células de mamífero son células (de ovario de hámster chino) CHO, hibridomas, células (de riñón de crías de hámster) BHK, células de mieloma, células humanas o células de ratón.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las células humanas son células HER inmortalizadas por E1.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las células humanas son células PER.C6.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante es un anticuerpo.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que el filtro es uno filtro de membrana.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el filtro de membrana es un filtro de fibra hueca.
10. mayúscula inicial procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9, en el que el cultivo celular se hace circular sobre el filtro en un flujo tangencial alterno.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10, en el que el cultivo celular se separa al menos una vez del reactor y se añade líquido al reactor para compensar la separación del cultivo celular.
12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el líquido es medio de cultivo celular.
13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 12, en el que la sustancia biológica se recolecta del cultivo celular.

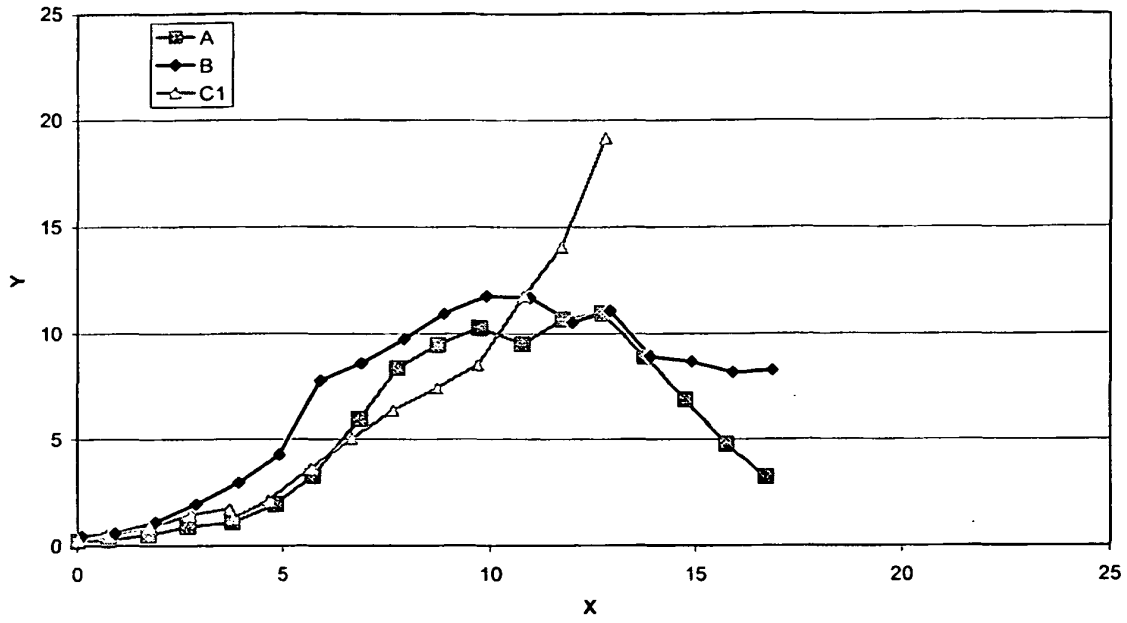


Fig.1/9

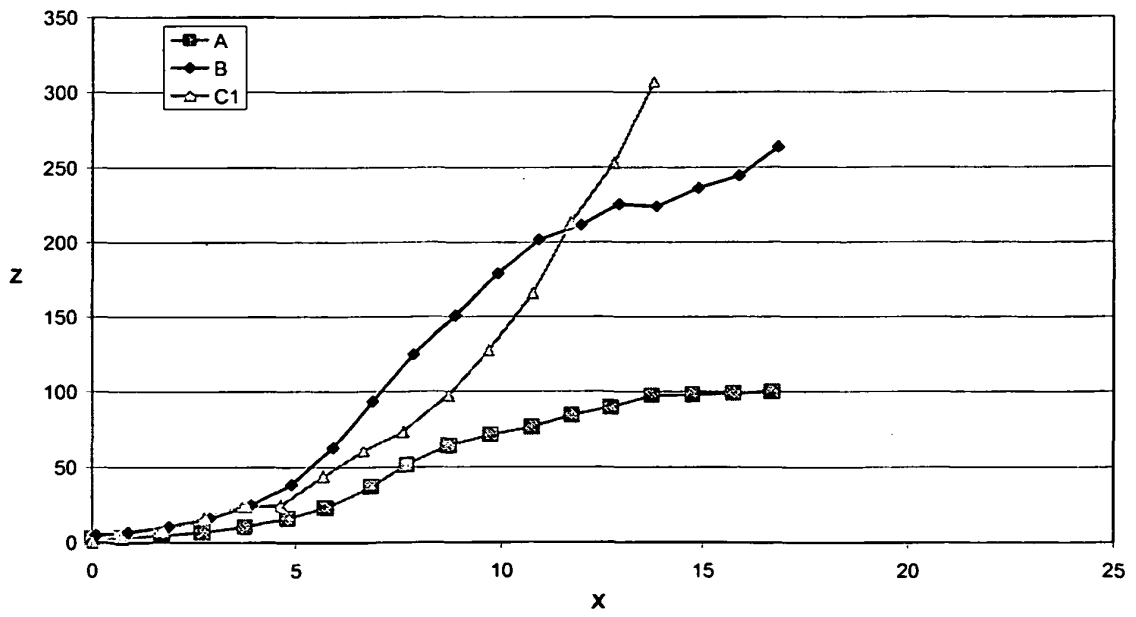


Fig.2/9

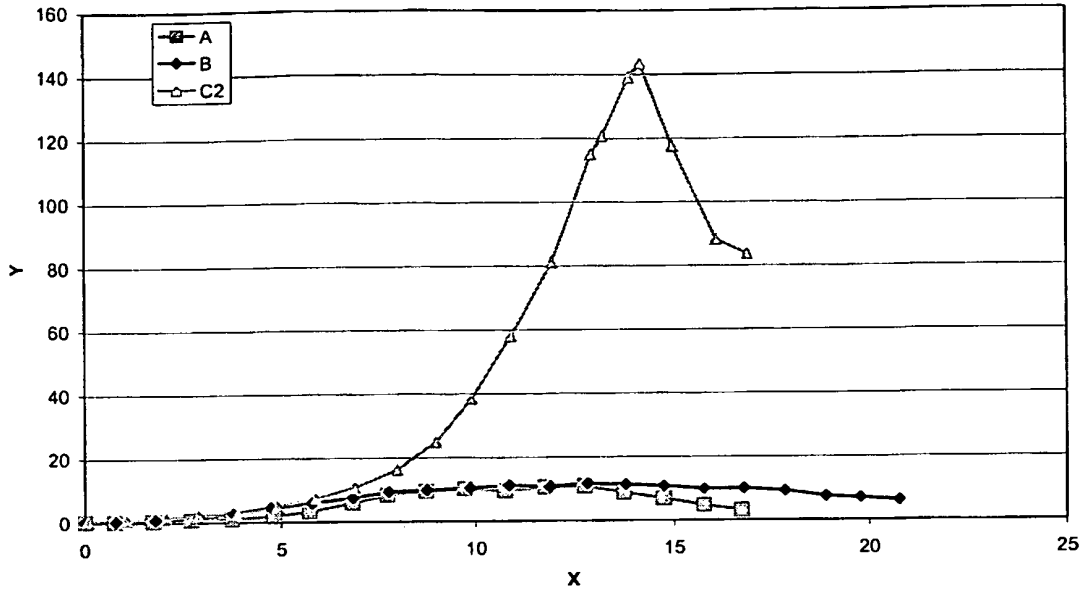


Fig.3/9

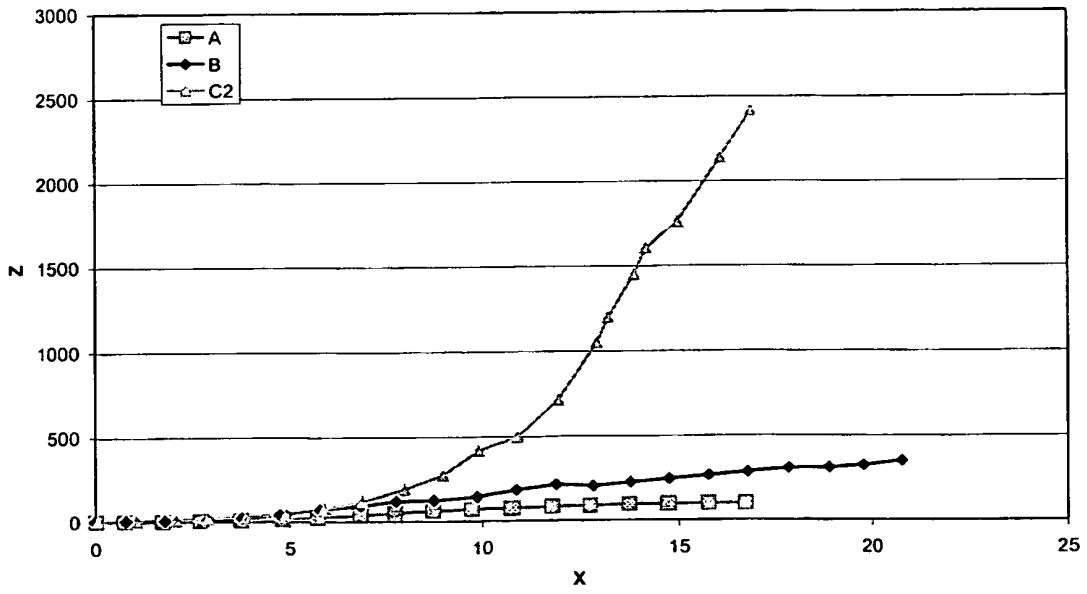


Fig. 4/9





Fig. 5/9

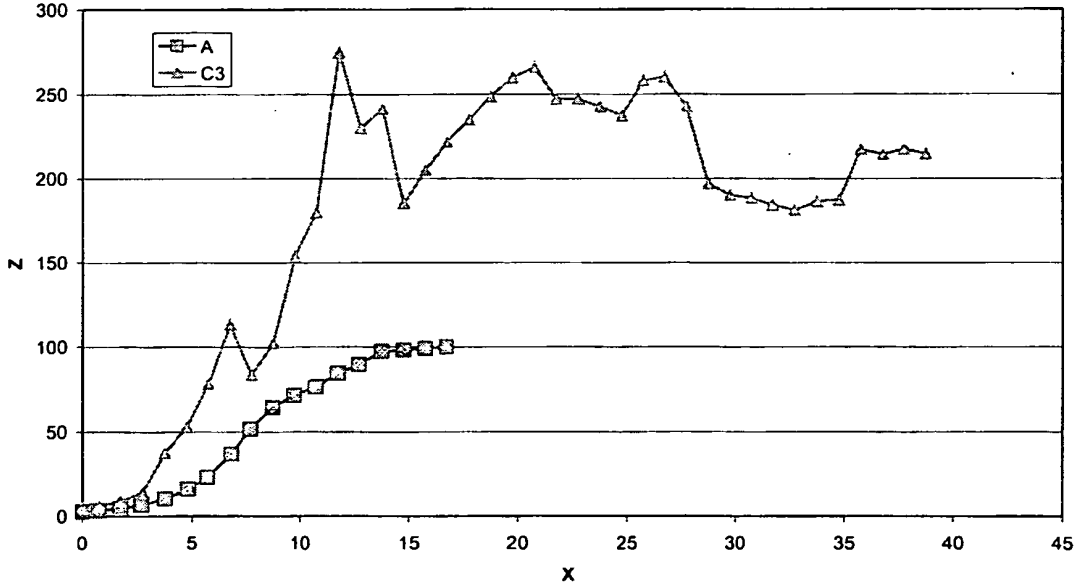


Fig. 6/9

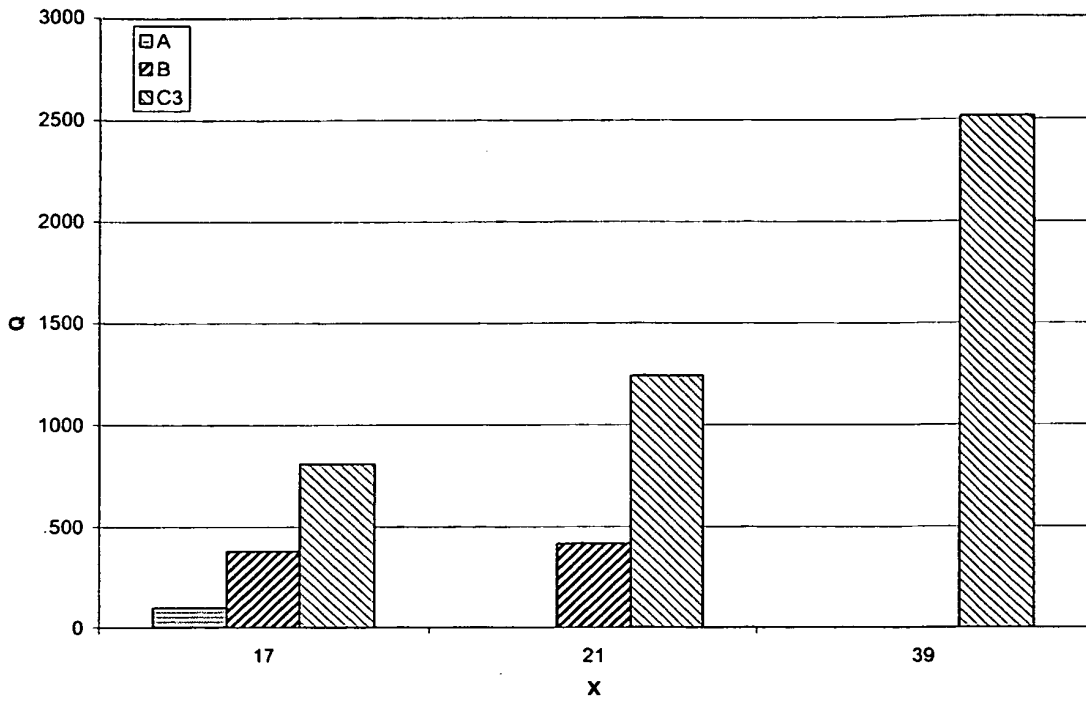


Fig. 7/9

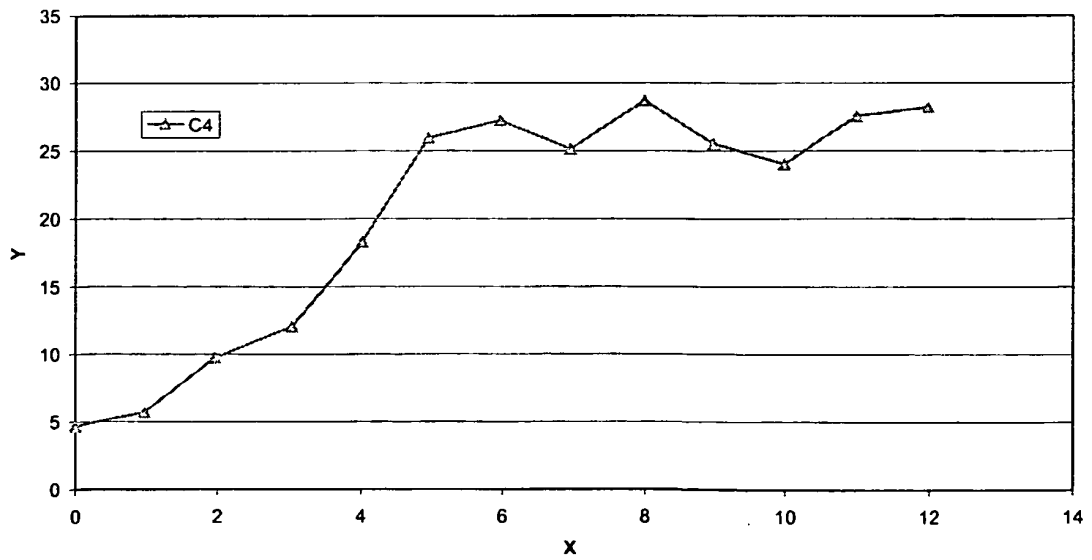


Fig. 8/9

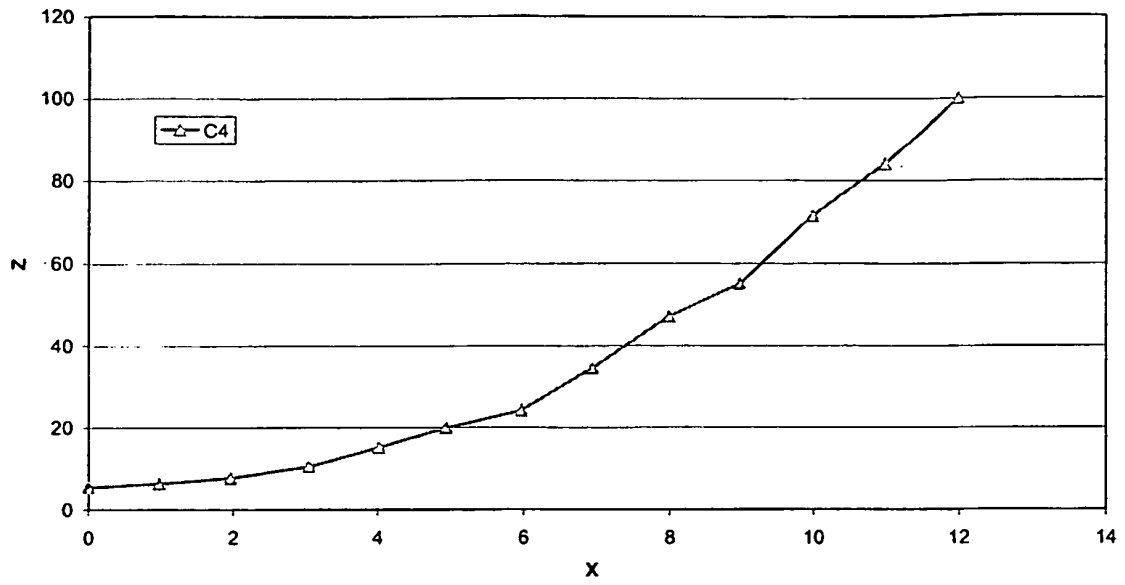


Fig. 9/9