

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 479**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011** **PCT/EP2011/073702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012** **WO12085162**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011** **E 11818943 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2655600**

54 Título: **Métodos para cultivar células de leucemia mieloide humana y células derivadas de esta**

30 Prioridad:

21.12.2010 US 201061425743 P

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

14.07.2017

73 Titular/es:

**GLYCOTOPE GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

STAHN, RAINER

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 624 479 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para cultivar células de leucemia mieloide humana y células derivadas de esta

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para cultivar células sanguíneas inmortalizadas humanas de origen de leucemia mieloide humana o células derivadas de ellas, a un método para la producción recombinante de un producto de interés.

10

Antecedentes de la invención

15

Las técnicas recombinantes se aplican ampliamente para producir un producto de interés, tal como particularmente una proteína. El producto de interés se expresa en una célula huésped adecuada y el producto expresado se obtiene por ejemplo a partir de las células y/o el medio de cultivo celular.

20

25

30

35

40

La idea básica de la fermentación es mantener las células en condiciones óptimas durante un período de tiempo en diferentes escalas para producir grandes cantidades del producto deseado. La fermentación es común para procariontes (por ejemplo, *Escherichia coli*), levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*) y células de mamífero (por ejemplo, líneas celulares de roedor tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma de ratón (NS0; SP2/0) o líneas de células humanas). Además de unos medios de cultivos optimizados, un proceso de fermentación bien controlado es la base para un proceso de producción en el cultivo de células de mamíferos. Dependiendo de la línea celular de producción, las células se cultivan en cultivo en suspensión o en una matriz portadora para el cultivo celular dependiente de anclaje. El cultivo celular a pequeña escala se realiza usando un nivel relativamente bajo de instrumentación. Por ejemplo, para la suspensión las botellas de cultivo rotatorias y frascos de centrifugación son adecuados. El cultivo de células a pequeña escala se opera generalmente en una incubadora de dióxido de carbono humidificada. Como la transferencia de gas en una incubadora de dióxido de carbono se basa en la difusión pasiva, pueden ocurrir limitaciones en la transferencia de gas. La técnica de fermentación para la producción de productos farmacéuticos está ampliamente cubierta en la literatura ya que se disponen de numerosos artículos de revisión, por ejemplo [Andersen y Reilly 2004], [Shukla y Thömmes 2010], [Marks 2003] y [Morrow 2007]. Con respecto al funcionamiento de la fermentación del cultivo celular, existen cuatro estrategias básicas diferentes para biorreactores, que se han descrito en la literatura: fermentación discontinua, semicontinua, continua sin retención celular y fermentación continua con retención celular (perfusión). Como la perfusión incluye una retención celular, la única forma de eliminar las células durante el cultivo es el uso de un sangrado (eliminación de la suspensión celular).

45

50

55

Los parámetros de fermentación son característicos de un proceso de producción. Cambiar estos parámetros puede aumentar o disminuir el rendimiento del producto. Dentro de la temperatura del biorreactor, el oxígeno disuelto y el valor del pH son parámetros básicos que deben controlarse. Las estrategias de optimización se basan en el ajuste de esos parámetros. Algunos parámetros, que son adecuados para la optimización incluyen, pero no se limitan a, la temperatura usada durante la fermentación, el nivel de oxígeno utilizado, la retención celular y la composición de los medios usados.

Además, la selección de la aireación/rociado también puede ser una característica importante para el proceso de cultivo. Las células que crecen en el cultivo celular requieren de oxígeno para un crecimiento eficiente. En pequeños volúmenes de cultivo la cantidad de oxígeno que llega a las células por difusión a través de la superficie del medio de cultivo es generalmente suficiente. Sin embargo, a medida que aumenta el volumen de cultivo, se hace necesaria la adición específica de oxígeno. Esto se logra normalmente mediante burbujeo, de manera que se introducen burbujas del gas o gases que se introducen al cultivo celular. Cuando se requieren tamaños de recipientes más grandes, el suministro de gas homogéneo se torna cada vez más preocupante. Sin embargo, el suministro de gas no puede aumentarse arbitrariamente porque la mayoría de las células de mamíferos tienden a ser sensibles a las fuerzas de cizallamiento creadas por las burbujas. Dichas burbujas portan células unidas a la superficie, donde la ruptura de las burbujas bajo la formación de alta tensión hidrodinámica, mata por lo tanto, las células unidas. Estos efectos letales pueden reducir la viabilidad celular y por tanto, la productividad de un cultivo celular. Los sistemas de suministro de gas sin burbujas (por ejemplo membranas) que pueden resultar útiles en cultivos más pequeños no son prácticos para su uso en cultivos más grandes durante el escalado. Las razones para esto son, por ejemplo, los elevados costes asociados al uso de membranas o limitaciones técnicas en los grandes recipientes.

60

Además, para conseguir un cultivo celular homogéneo, la suspensión se mezcla generalmente por agitación. Esto puede lograrse por ejemplo por agitación del impulsor y burbujeo de gas. Para la agitación generalmente se usa un agitador. Sin embargo, existen también limitaciones para la agitación. Las células generalmente, suelen ser sensibles a las fuerzas de cizallamiento inducidas por la agitación, por ejemplo mezclando. Por lo tanto, el potencial para asegurar la homogeneidad por agitación es limitado.

65

Con respecto a la mezcla, existen dos problemas específicos: (i) la adición de solución base y solución de alimentación y (ii) acumulación de dióxido de carbono. Se pueden producir variaciones en la concentración de los niveles de sustrato, pero también de los gradientes de oxígeno. Son más comunes en recipientes grandes que en recipientes pequeños. La

distribución desigual aumenta con el tamaño del recipiente y se torna cada vez más crítica. El principal problema de mezclar es el intercambio entre las fuerzas de cizallamiento y heterogeneidades. Para garantizar suficiente mezcla y sin daños, la tensión por el cizallamiento es un reto intrigante. Tanto la mezcla como la tensión de cizallamiento pueden conducir a la muerte celular por diferentes medios. La mezcla insuficiente puede conducir por ejemplo a la floculación o limitación de oxígeno, mientras que la tensión de cizallamiento puede lisar las células.

La tensión hidrodinámica basada en fuerzas de cizallamiento es un tópico importante en el cultivo celular. Generalmente, el daño por las fuerzas de cizallamiento depende en gran medida de la línea celular. Adicionalmente, a medida que aumentan las densidades celulares máximas de los procesos semicontinuos o de perfusión debido a la optimización del proceso y del medio hay una demanda adicional para el mezclado a medida que aumenta la viscosidad. La tensión hidrodinámica en un biorreactor de tanque agitado es un fenómeno no homogéneo. En las regiones del impulsor, que representan sólo alrededor del 10 % del volumen total, se disipa hasta el 70 % de la energía. Por consiguiente, las fuerzas de cizallamiento son también mucho más altas en aquellas regiones cercanas al impulsor que pueden causar efectos dañinos letales o no letales en las células. La tensión hidrodinámica no sólo puede lisar las células; también puede influir en las células a un nivel subletal, que actualmente no está bien esclarecido.

Estos factores contribuyen al hecho de que las condiciones de cultivo que pueden ser adecuadas para los cultivos en pequeña escala no pueden transferirse fácilmente a cultivos a gran escala. El resultado de la producción de proteínas en cultivos a gran escala es frecuentemente considerado diferente del de los cultivos a pequeña escala. Durante la producción a gran escala, muy frecuentemente disminuye la productividad y/o la calidad de la proteína producida (por ejemplo, las estructuras de glicosilación en caso de que la glicoproteína se produzca de forma recombinante). En conjunto, el escalado sigue siendo un problema importante en el cultivo de células de mamíferos. Aunque hay mucha literatura disponible para los procedimientos del escalado con respecto a los conceptos y consideraciones del escalado, el escalado sigue siendo un reto y las medidas adecuadas para una línea celular específica, frecuentemente no se pueden transferir a una línea celular diferente.

Cuando se produce un producto glicosilado de interés, tal como por ejemplo un anticuerpo que se usa en la terapia, es deseable obtener una estructura de glicosilación "humana" o "humanizada". Varias técnicas y células huésped están disponibles para ese propósito. Las células sanguíneas humanas inmortalizadas y las líneas celulares derivadas de las mismas se encontraron adecuadas para producir de forma recombinante productos glicosilados que tienen un patrón de glicosilación humana. Las líneas celulares respectivas se describen por ejemplo en el documento de patente núm. WO 2008/028686. La glicosilación del producto es una compleja modificación postraducciona que puede afectarse por muchos parámetros diferentes. Estos parámetros pueden ser de naturaleza física, química o termodinámica. Como estos parámetros pueden verse afectados durante la fermentación, es muy importante desarrollar un proceso de fermentación que permita producir un producto con un patrón de glicosilación constante, es decir, homogéneo. Existen varios informes que se encuentran en la literatura. Se informa, por ejemplo que la fuerza de cizallamiento, la disponibilidad de glucosa, la saturación de oxígeno, el pH, la temperatura y otras condiciones del proceso pueden afectar la glicosilación [Senger y Karim 2003] [Godoy-Silva y otros 2009] [Tachibana y otros 1994] [Kunkel y otros 1998] [Müthing y otros 2003] [Ahn y otros 2008] [Lipscomb y otros 2005].

Stiens y otros (2000) describe los métodos para cultivar la línea de células sanguíneas humanas inmortalizadas K562 y producir de forma recombinante el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSH-R) en dicha línea celular. El cultivo se realiza con agitación estándar bastante baja. Goletz y otros (2009) discuten la glico-optimización para los anticuerpos y las proteínas biofarmacéuticas completamente humanas y muy mejoradas. Las líneas celulares humanas de origen leucémico glico-manipuladas por ingeniería genética se mencionan generalmente como células en suspensión y resistentes a fuerzas de cizallamiento elevadas.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para cultivar células, particularmente células sanguíneas humanas inmortalizadas, que permite producir un producto de interés con rendimiento aceptable y buena calidad al usar también diferentes volúmenes de fermentación (escalas).

Resumen de la invención

La presente invención se basa, *entre otros*, en el descubrimiento sorprendente de que un aumento en la agitación del cultivo de células resulta pese a un aumento asociado en las fuerzas de cizallamiento en la mejoría considerable de las condiciones de cultivo que permiten la producción de un producto de interés con buen rendimiento y calidad también durante el escalado. Esta es una ventaja importante, particularmente cuando se produce un producto de interés tal como una glicoproteína para usos terapéuticos. Para tales aplicaciones, los cambios en la calidad del producto al usar diferentes volúmenes de fermentador son inaceptables en el proceso de BPM, respectivamente, aumentan los esfuerzos necesarios para obtener la aprobación de las autoridades reguladoras. Se encontró particularmente que la densidad celular y la viabilidad celular pueden mejorarse con el método de cultivo de conformidad con la presente invención. El transporte de nutrientes en el medio de cultivo celular se mejora y la velocidad de aireación puede reducirse, lo que reduce el daño de las células debido al desarrollo de burbujas. Además, se encontró que el proceso de cultivo se mejora si el tamaño y/o la cantidad de burbujas que se desarrollan debido a la aireación se mantiene al mínimo cuando se cultivan células sanguíneas humanas inmortalizadas, preferentemente células de origen de leucemia mieloide humana.

De conformidad con un primer aspecto, se proporciona un método para cultivar una suspensión de células sanguíneas humanas inmortalizadas de origen de leucemia mieloide humana o células derivadas de las mismas, en donde dicha suspensión se agita tal que la entrada de energía específica resultante es al menos 0,005 W/kg.

Dicho método puede tener una o más de las siguientes características adicionales:

a) dicha suspensión se agita tal que la entrada de energía específica resultante es al menos 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,04, 0,05, 0,075 ó 0,1 W/kg, preferentemente en un intervalo de 0,015 a 0,03, con mayor preferencia de 0,018 a 0,025 W/kg,

b) dicha suspensión se agita con una intensidad que es adecuada para permitir un suministro de flujo exclusivo de gas de dicha suspensión,

c) dicha suspensión se agita tal que la fuerza de cizallamiento resultante sea de al menos 0,1 N/m², preferentemente al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5 o 2,0 N/m²,

d) en el caso de que se use un agitador para la agitación, dicha suspensión se agita de tal manera que la velocidad de cizallamiento resultante en la punta del agitador es al menos 300 s⁻¹, preferentemente al menos 500, 700, 900, 1100 o 1300 s⁻¹,

e) dichas células se suministran con al menos un gas por flujo exclusivo,

f) dichas células se suministran con al menos un gas a una velocidad de flujo de como máximo 0,05 l/h, preferentemente como máximo 0,02, 0,01 ó 0,005 l/h por litro de volumen del reactor,

g) el suministro de gas tiene una velocidad de flujo máxima de 0,05 vvm o menos, preferentemente de 0,02, 0,01 u 0,005 vvm o menos.

De conformidad con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la producción recombinante de un producto de interés en células sanguíneas inmortalizadas humanas de origen de leucemia mieloide humana o células derivadas de las mismas, en donde dichas células comprenden un gen que codifica el producto de interés y en donde dichas células se cultivan de conformidad con el método de conformidad con el primer aspecto de la presente invención.

Además, se describen métodos y herramientas que permiten el escalado exitoso de la fermentación mientras que mantiene el rendimiento y la calidad del producto.

Descripción detallada de la invención

Los procedimientos de conformidad con el primer y segundo aspecto de la invención permiten alcanzar uno o más de los siguientes objetivos: daño minimizado a las células, especialmente daño inducido por el suministro de gas, aireación y/o formación de burbujas, una alta estabilidad y uniformidad de las estructuras de glicosilación en caso de que se exprese una glicoproteína, una buena velocidad de producción, facilidad de manejo, un número reducido de agregados celulares, facilidad de escalado y robustez para procesar la variación de parámetros.

A menos que se indique de cualquier otra manera, el término "métodos de conformidad con la invención" o "método de conformidad con la invención" se refiere tanto al método de conformidad con el primer aspecto como al método de conformidad con el segundo aspecto de la presente invención.

Los métodos de conformidad con la invención se basan en parte en el sorprendente hallazgo de que las células usadas de conformidad con la presente invención muestran propiedades de crecimiento particularmente buenas (por ejemplo viabilidad) y una producción particularmente buena de proteínas recombinantes cuando la intensidad (vigor) de agitación es bastante alta. Esto fue inesperado debido a que generalmente, las células suelen dañarse por las fuerzas de cizallamiento inducidas por agitación vigorosa. Un hallazgo sorprendente fue que las células que se usan de conformidad con la invención tienen una sensibilidad diferente a las fuerzas de cizallamiento inducidas por agitación y a las fuerzas de cizallamiento inducidas por las burbujas de aire. Las células que se usan de conformidad con la invención son muy robustas a las fuerzas de cizallamiento inducidas por el agitador (por ejemplo, toleran fuerzas de cizallamiento de, por ejemplo, 0,9 N/m² y velocidades de cizallamiento de, por ejemplo, 1000 s⁻¹), pero son muy sensibles a la aireación. El suministro de flujo exclusivo de gas o el suministro de gas a una velocidad de flujo baja puede usarse para conseguir también, las ventajas de la presente invención debido a que estas medidas reducen las fuerzas de cizallamiento inducidas por las burbujas. Fue inesperado que las células usadas de conformidad con la invención eran más bien insensibles a las fuerzas de cizallamiento inducidas por agitación hasta un grado que permita una agitación suficientemente vigorosa para permitir la aplicación de un suministro de flujo exclusivo de gas. La agitación vigorosa tiene el efecto ventajoso de que se garantiza una mezcla homogénea y condiciones de crecimiento homogéneas para todas las células.

La suspensión celular se agita tal que la entrada de energía específica resultante es de al menos 0,005 W/kg. La entrada de energía específica particularmente es la energía usada para la agitación (por ejemplo, para girar un agitador o para rotar, balancear, girar o de cualquier otra manera agitar el cultivo de células y/o el recipiente de cultivo celular) por masa (por ejemplo, kg) o volumen (por ejemplo m³) del cultivo celular. Preferentemente, la entrada de energía específica para la agitación es al menos 0,01, al menos 0,015, al menos 0,02, al menos 0,025, al menos 0,03, al menos

0,04, al menos 0,05, al menos 0,075 o al menos 0,1 W/kg, con mayor preferencia en un intervalo de 0,015 a 0,03 W/kg, con la máxima preferencia de 0,018 a 0,025 W/kg.

5 Las células que se van a usar de conformidad con la invención permiten la producción de glicoproteínas con glicosilación humana, que generalmente conducen a una biodisponibilidad y funcionalidad mejoradas. Esta es una ventaja importante sobre los sistemas de producción actualmente disponibles, que son principalmente de origen de roedor (por ejemplo, células CHO, células NSO, células Sp2/0). La principal ventaja de las líneas celulares es la glicosilación humana junto con otras modificaciones postraduccionales humanas.

10 Las células sanguíneas humanas inmortalizadas que se usan de conformidad con la invención son células de origen de leucemia mieloide humana o células derivadas de las mismas. Preferentemente, las células son de una línea celular, particularmente de la línea celular K562 (por ejemplo, la línea celular K562 disponible como ATCC CCL 243) o una línea celular derivada de la misma. Las células respectivas, las líneas celulares y las células huésped se describen en detalle en el documento de patente núm. WO 2008/028686. Métodos similares son adecuados también para otras células en suspensión o líneas celulares que toleran una alta tensión de cizallamiento, particularmente para las células o líneas celulares en suspensión eucariotas, preferentemente células en suspensión o líneas celulares humanas.

20 El método para la producción recombinante de un producto de interés, preferentemente una glicoproteína, en células sanguíneas humanas inmortalizadas de origen de leucemia mieloide o células derivadas de las mismas, permite producir el producto de interés con buen rendimiento y calidad homogénea aún al usar diferentes volúmenes de cultivo y aún al aplicar altas fuerzas de cizallamiento inducidas por la agitación. Las células huésped comprenden un gen que codifica el producto de interés y dichas células se cultivan de conformidad con el método de la reivindicación 1. Dicho gen que codifica el producto de interés se introduce preferentemente de forma recombinante. Dichas técnicas recombinantes se conocen bien y por lo tanto, no necesitan de descripción detallada en la presente. Por ejemplo el gen que codifica el producto de interés puede comprenderse en un vector de expresión que después se introduce de forma estable o transitoria en las células huésped. El producto de interés puede ser de cualquier naturaleza, preferentemente es una proteína o polipéptido. Preferentemente, dicho producto está glicosilado. Particularmente, son de interés la producción recombinante de los productos farmacéuticamente activos tales como anticuerpos u otras proteínas terapéuticamente activas. Para la producción a gran escala de los respectivos productos, se necesitan métodos de fermentación que permitan la producción del producto de interés con buen rendimiento y buena calidad homogénea, aunque se usen diferentes volúmenes de cultivo. Además, la calidad del producto y preferentemente, también el rendimiento deben preferentemente ser comparables entre diferentes cargas de producción. Estas ventajas pueden lograrse con el método de conformidad con la presente invención.

35 El producto expresado de interés se obtiene a partir del cultivo celular, por ejemplo mediante la ruptura de las células o recolectando el producto de interés secretado del medio de cultivo celular. Preferentemente, el producto de interés se purifica a partir del medio de cultivo celular. En esta modalidad, el producto preferentemente se secreta por las células.

40 Preferentemente, las células se cultivan mediante fermentación continua con retención celular (perfusión), lo que produce resultados particularmente buenos. Las células usadas en los métodos de conformidad con la invención no producen proteína recombinante en cantidades discernibles durante la fase estacionaria. Por consiguiente, la perfusión puede servir para prolongar la fase de crecimiento exponencial (logarítmica) en la que se produce la mayor parte de la proteína. Por lo tanto, el uso de la perfusión para el cultivo es ventajosa cuando se cultivan las células sanguíneas humanas inmortalizadas tales como las células K562 o células derivadas de las mismas.

45 En el modo de perfusión, se suministra preferentemente medios frescos de forma continua. En este mismo sentido, el sobrenadante libre de células se toma preferentemente del biorreactor mientras que las células se retienen preferentemente en el fermentador. Una característica importante de un fermentador de perfusión es el sistema de retención celular. Las células se pueden retener aplicando diferentes técnicas. Por ejemplo, pueden usarse filtración, centrifugación o sedimentación. En un método de perfusión de conformidad con la invención, la retención celular se consigue preferentemente mediante un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un filtro de rosca, una fibra hueca, una centrífuga continua y un sistema de retención de células acústicas.

50 Preferentemente, se usa una centrífuga continua, tal como una centrífuga continua Centritech Lab, para la perfusión. La perfusión usando la centrífuga continua Centritech Lab es adecuada para volúmenes de perfusión entre 0,5l/d y 120l/d; para cultivos de células más grandes puede usarse la centrífuga continua Centritech. Sobre este amplio intervalo de volumen, el Centritech se usa en diferentes tipos de operación. Hay varios modos continuos: modo de bomba, modo de válvula y modo de alimentación y un modo intermitente discontinuo, que es una variante del modo de bomba. En modo discontinuo, la centrífuga funciona durante el tiempo de corrida, que se interrumpe por un tiempo de espera. Durante el tiempo de espera, el sistema de tubería debe estar libre de células, lo que se garantiza al lavar el sistema después de cada corrida usando el sobrenadante libre de células.

60 La perfusión se controla ajustando la bomba de alimentación y controlando la bomba de recolección del Centritech. De conformidad con una modalidad, la velocidad de perfusión se establece entre 0,5 V/d (volúmenes de cultivo celular por día) y 2,5 V/d. Para ajustar adecuadamente la velocidad de perfusión a los requerimientos de células, se elige

preferentemente un parámetro clave (parámetro de control). Idealmente, el parámetro de control es limitante del crecimiento/producción y fácil de medir. Sin embargo, más frecuentemente el parámetro de control no es el factor limitante del crecimiento. por ejemplo, la glucosa se ajusta como parámetro de control.

5 Un proceso de perfusión para las células usadas de conformidad con la presente invención presenta alta viabilidad celular durante la fermentación de alta densidad. Durante la fermentación, no existen limitaciones con respecto a los sustratos principales, por ejemplo oxígeno, glucosa, glutamina, ni tampoco ninguna limitante para aminoácidos
10 oxígeno disuelto) del 40 % y a una temperatura de 37 °C. La fermentación con dichas células sanguíneas inmortalizadas se puede realizar con una entrada de energía alta (por ejemplo, 0,022 W/m³), ya que las células toleran altas fuerzas de cizallamiento, particularmente en un biorreactor de tanque agitado.

15 En condiciones de perfusión, la concentración celular aumenta generalmente hasta que se cumple una limitación. Esta limitación puede ser o bien un nutriente o la acumulación de un producto residual. Comparado con una fermentación discontinua o una semicontinua, se pueden alcanzar densidades de células mucho más altas debido al suministro constante de medios y al lavado de productos de desecho. Basándose en esas densidades celulares superiores, se logran rendimientos de espacio-tiempo superiores.

20 De conformidad con una modalidad, las células se eliminan durante el cultivo, preferentemente mediante el sangrado. Cuando se aplica el sangrado, se toma una cierta cantidad de células (por ejemplo, 10 % del volumen total) del fermentador. El sangrado tiene la ventaja de que las células se mantienen en una fase de crecimiento durante un tiempo más prolongado con una viabilidad aumentada, lo que da como resultado un cultivo más estable. Varias estrategias de sangrado se han discutido en la literatura por Dalm y colaboradores [Dalm y otros, 2004], [Dalm y otros, 2007].

25 Una ventaja particular del método de cultivo de la presente invención que es importante para la producción recombinante de un producto glicosilado de interés es que dicho método resulta en glicoestructuras homogéneas y altamente reproducibles cuando se expresan por ejemplo glicoproteína. En una modalidad preferida, la estructura de glicosilación de un producto de interés y/o la velocidad de producción de las células no se afecta sustancialmente por el
30 volumen de cultivo. Un ejemplo es un caso en donde se comparan los cultivos (preferentemente los cultivos de perfusión) de un reactor de 1 l y un reactor de 100 l. Preferentemente, la calidad global del producto no se afecta sustancialmente por el volumen de cultivo. Los ejemplos muestran que los métodos de conformidad con la presente invención son capaces de alcanzar estas ventajas.

35 De conformidad con una modalidad, la densidad celular en el cultivo celular alcanza al menos 1x10⁶ /ml. Preferentemente, la densidad celular es incluso mayor, por ejemplo al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 x10⁶ células/ml. De conformidad con una modalidad, la viabilidad celular en el cultivo celular es al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, con mayor preferencia al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 %. De conformidad con una modalidad, la densidad de células de conformidad con los métodos la invención, alcanza en un
40 punto en el tiempo al menos 5x10⁶/ml con una viabilidad celular de al menos 90 %. La viabilidad celular particularmente denota el porcentaje del número de células vivas comparado con el número de todas las células (vivas o muertas) en una muestra.

45 Una velocidad de producción máxima alcanzable preferida es de al menos 25 µg/(mld) (25 µg de producto por ml de cultivo celular por día), preferentemente al menos 50 µg/(mld), al menos 80 µg/(mld), al menos 90 µg/(mld) o al menos 100 µg/(mld).

En los métodos de conformidad con la invención preferentemente se usa un agitador para la agitación, particularmente un impulsor.

50 El cultivo de células está generalmente contenido en un recipiente, que puede ser por ejemplo una bolsa que contiene un cultivo de células, preferentemente una bolsa desechable, o alternativamente un recipiente distinto de una bolsa, por ejemplo un depósito, contenedor o similar. Si se usa una bolsa, puede combinarse preferentemente con un agitador que se usa para la agitación. Preferentemente, se usa un fermentador como recipiente que es adecuado y
55 preferentemente se usa comúnmente para un método de perfusión.

En los métodos preferidos de conformidad con la invención se usa un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un rociador en anillo, un micro-rociador y una membrana para la aireación. Los métodos de conformidad con la invención permiten el uso de un rociador para el suministro de gas, que puede de cualquier otra manera no ser factible
60 debido a la alta sensibilidad a las burbujas de aire de las células que se usan de conformidad con la invención.

De conformidad con una modalidad, se dan pulsos de al menos un gas durante el proceso de cultivo para la aireación.

65 De conformidad con una modalidad, el desarrollo de burbujas causado por la aireación está limitado por el método de aireación elegido y en donde las burbujas producidas tienen preferentemente un tamaño de más de 2 mm,

preferentemente más de 5 mm, con mayor preferencia más de 10 mm o más. Como se discutió anteriormente, las burbujas mayores que 2 mm y particularmente mayores que 10 mm resultan en una tensión de cizallamiento menor y, en consecuencia, son menos letales para las células usadas de conformidad con la presente invención.

5 Como se discutió anteriormente, el suministro de gas en general o la aireación se logra preferentemente mediante un flujo exclusivo de gas. El término "flujo exclusivo" se refiere particularmente al suministro de gas de una manera discontinua, en oposición a un flujo constante en donde el gas se suministra de manera continua. El término "aireación" particularmente se refiere al suministro de un gas que comprende o que consiste en oxígeno (por ejemplo aire, preferentemente oxígeno puro). Preferentemente, la aireación se realiza mediante flujo exclusivo. Un pulso de
10 suministro de gas (por ejemplo, un gas que comprende oxígeno, preferentemente todos los gases) puede, de conformidad con una modalidad, como máximo tener una duración de 30 s (o como máximo 10 s, 3 s o 1 s). La fracción de tiempo durante la cual se suministran los gases pueden ser como máximo 25 % (o como máximo 10 %, 5 %, 2,5 % o 1%) del tiempo de cultivo (que se cultiva) durante al menos 1 h (o al menos 2 h o 5 h). Preferentemente, se usa medio para detectar la saturación de oxígeno en la suspensión. El gas que comprende oxígeno se suministra preferentemente cuando la saturación de oxígeno detectada es inferior a un umbral predefinido, tales como por ejemplo una pO_2 o DOT de 10 %, preferentemente 20 %, 25 %, 30 % o con mayor preferencia 35 %. Preferentemente para aireación, se suministra oxígeno puro.

20 Por lo tanto, de conformidad con una modalidad, se determina el valor de oxígeno, respectivamente la saturación de oxígeno en el cultivo de células y en donde se introduce oxígeno y/o un gas o mezcla de gas que contiene oxígeno como un pulso en el medio de cultivo celular si el nivel de oxígeno cae por debajo de un nivel predeterminado, por ejemplo como se definió anteriormente. Esto minimiza ventajosamente la aireación y consecuentemente la formación de burbujas.

25 En las modalidades preferidas, las células se suministran con al menos un gas a una velocidad de flujo de como máximo 0,05 l/h, preferentemente como máximo 0,02, 0,01 o 0,005 l/h por litro de volumen del reactor. Particularmente, el suministro total de gas del cultivo de células es de 0,05 l/h por litro de volumen del reactor o menos, preferentemente 0,02, 0,01 o 0,005 l/h por litro de volumen del reactor o menos. Los términos "velocidad de flujo" y "suministro de gas" a este respecto se refieren preferentemente a la velocidad de flujo medio o al suministro de gas durante todo el proceso
30 de cultivo. Esto significa que cuando se usa un flujo exclusivo de gas, en donde se introduce gas en el cultivo celular con intervalos interrumpidos, las velocidades de flujo reales durante los intervalos de suministro pueden ser mayores que los valores anteriores. Sin embargo, en promedio, considerando los intervalos de suministro y los intervalos en los que no se introduce gas en el cultivo celular, la velocidad de flujo global o suministro de gas es preferentemente como máximo 0,05 l/h por litro de volumen del reactor, como se definió anteriormente.

35 En modalidades preferidas en donde el suministro de gas se alcanza por flujo exclusivo de gas, la velocidad de flujo en cualquier momento durante los intervalos de suministro (velocidad de flujo máximo) es 0,05 vvm (volumen por volumen de reactor por minuto) o menos, preferentemente 0,02, 0,01 ó 0,005 vvm o menos.

40 En ciertas modalidades especialmente preferidas, en los métodos de conformidad con la presente invención (i) la entrada de energía específica para la agitación de la suspensión es de al menos 0,01 W/kg; y (ii-1) el suministro de gas con al menos el suministro de un gas o gas total de la suspensión es de 0,05 l/h por litro de volumen del reactor o menos, o (ii-2) el suministro de gas se alcanza mediante un flujo exclusivo de gas y la velocidad de flujo máxima es de 0,05 vvm o
45 menos.

Preferentemente, la entrada de energía específica para la agitación de la suspensión es al menos de 0,015 W/kg; y el suministro de gas con al menos el suministro de un gas o gas total de la suspensión es de 0,02 l/h por litro de volumen del reactor o menos o, si el suministro de gas se logra por flujo exclusivo de gas, la velocidad de flujo máxima es 0,02
50 vvm o menos. En estas modalidades, la fuerza de cizallamiento resultante de la agitación de la suspensión es de al menos 0,1 N/m^2 , preferentemente 0,3 N/m^2 , y/o la velocidad de cizallamiento en la punta del agitador es de al menos 300 s^{-1} , preferentemente 500 s^{-1} .

De conformidad con una modalidad, se añade una base durante el cultivo para mantener el pH a un nivel o intervalo de
55 pH predeterminado. Los intervalos o valores de pH preferidos están entre 5 y 9, con mayor preferencia entre 6 y 8,5, entre 6,5 y 8, o lo con la máxima preferencia entre 7 y 7,5. Generalmente se requiere la adición de una base para neutralizar, por ejemplo la formación de lactato, o para neutralizar la formación de CO_2 . En los métodos conocidos en la técnica anterior, la adición de una base resulta en una floculación celular que probablemente se induce por la base que puede inducir la lisis celular. La floculación es una agregación de células muertas. La floculación es particularmente, un
60 problema en escalados más grandes. El método de conformidad con la presente invención reduce la formación de floculación, probablemente debido a la agitación más vigorosa. Los métodos de conformidad con la invención permiten reducir la formación de flóculos de células. Las bases que se añaden a la suspensión celular pueden distribuirse más rápida y uniformemente. En un método preferido de conformidad con la invención, la formación de flóculos celulares se reduce en oposición a un método correspondiente que comprende ninguna de las características a) a f).

65

Preferentemente, la base se añade muy próxima a la región del agitador. Además, la base se añade preferentemente directamente a la suspensión de células, es decir, el sitio de adición está por debajo de la superficie de la suspensión y la base no se gotea en la suspensión.

5 Las células se cultivan preferentemente en un medio libre de suero, por ejemplo medios GTM químicamente definidos.

En una modalidad preferida de los métodos de conformidad con la presente invención, el medio de cultivo celular comprende un agente protector de cizallamiento, por ejemplo suero, poli(etilenglicol) (PEG), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(vinilalcohol) (PVA) o Pluronic-F68. El agente protector de cizallamiento se usa preferentemente a una concentración de < 0,01 a 3 g/l. Preferentemente, el medio de cultivo celular es libre de suero.

De conformidad con una modalidad, el cultivo celular se realiza a un intervalo de pH entre 6,5 y 8, preferentemente 7 y 7,5; una pO₂ del 10 % al 90 %, preferentemente del 30 % al 50 %, con mayor preferencia del 35 % al 45 % y/o una temperatura de 30 a 40°C, preferentemente 37°C.

De conformidad con una modalidad preferida, la estructura de glicosilación del producto de interés y/o la velocidad de producción de las células no se afecta sustancialmente por el volumen de cultivo.

Preferentemente, las modalidades preferidas como se describen en la presente invención se combinan entre sí. Particularmente, se proporcionan las siguientes combinaciones preferidas:

- característica a) con la característica e)
- característica a) con la característica f)
- característica a) con la característica g)
- característica a) con la característica e) y la característica g)
- característica c) con la característica e)
- característica c) con la característica f)
- característica c) con la característica g)
- característica c) con la característica e) y la característica g)
- característica d) con la característica e)
- característica d) con la característica f)
- característica d) con la característica g)
- característica d) con la característica e) y la característica g)
- característica e) con la característica g)
- característica a) con la característica e) y la característica g) y la característica c) y/o la característica d)

En estas combinaciones pueden usarse particularmente, los valores preferidos y los intervalos definidos anteriormente. En ciertas modalidades, las combinaciones anteriores se combinan además con una o más de las modalidades definidas en la presente descripción, particularmente con la característica b).

De conformidad con una modalidad, se usa un fermentador para cultivo celular que tiene un volumen de al menos 1 l, preferentemente al menos 10 l, al menos 20 l, al menos 50 l, al menos 100 l, al menos 200 l, al menos 500 l o al menos 1000 l, particularmente un volumen en el intervalo de 1 l a 1000 l, 1 l a 500 l, 10 l a 250 l o 20 l a 100 l. Como se discutió anteriormente, sorprendentemente, en particular la calidad del producto, pero también la productividad, no se afecta por el tamaño del fermentador. Esta es una ventaja particular cuando se altera la escala del proceso de producción. De conformidad con una modalidad, la entrada de energía se usa como criterio de escalado y, por tanto, la entrada de energía específica se mantiene constante entre los diferentes tamaños de fermentador (lo que permite sin embargo, preferentemente una desviación de aproximadamente 25 %, 20 %, 15 %, 10 % 5 %). Preferentemente, la entrada de energía específica es al menos 0,005 W/kg, preferentemente al menos 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,04, 0,05, 0,075 o 0,1 W/kg, con mayor preferencia en un intervalo de 0,015 a 0,03, con la máxima preferencia de 0,018 a 0,025 W/kg.

Un método para escalar el proceso de cultivo o producción usado en los métodos de conformidad con la invención puede usar la entrada de energía como criterio de escalado. Particularmente, la entrada de energía se mantiene constante durante el escalado, es decir, la entrada de energía específica para el método de cultivo inicial a pequeña escala está en el intervalo de 75 % a 125 %, preferentemente de 80 % a 120 %, de 85 % a 115 %, 90 % a 110 % o 95 % a 105 % de entrada de energía específica para el método de cultivo final, escalado, a gran escala. Particularmente, la entrada de energía específica para el método de cultivo a pequeña escala y/o para el método de cultivo a gran escala es de al menos 0,005 W/kg, preferentemente de al menos 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,04, 0,05, 0,075 o 0,1 W/kg, con mayor preferencia en un intervalo de 0,015 a 0,03, con la máxima preferencia de 0,018 a 0,025 W/kg. El cultivo a gran escala preferentemente tiene un volumen de cultivo celular que es al menos un 25 % mayor que el volumen de cultivo celular del cultivo a pequeña escala. Con mayor preferencia, el volumen de cultivo celular del cultivo a gran escala es al menos 50 % mayor, al menos 100 % mayor, al menos 1,5 veces mayor, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que el volumen de cultivo celular del cultivo a pequeña escala.

Particularmente, un método para alterar la escala de la producción recombinante de una proteína de interés puede

comprender las siguientes etapas:

proporcionar un primer recipiente para cultivar las células,

proporcionar las células sanguíneas humanas inmortalizadas o células derivadas de las mismas,

proporcionar una primera suspensión de dichas células,

5 introducir la primera suspensión en el primer recipiente,

realizar el método de cultivo o producción de conformidad con la presente invención, particularmente el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25,

notificar opcionalmente la estructura de glicosilación de una glicoproteína de interés producida en la primera suspensión y/o la velocidad de producción de las células de la primera suspensión,

10 proporcionar un segundo recipiente para cultivar las células, que tiene un volumen interno diferente del primer recipiente,

proporcionar una segunda suspensión de dichas células,

introducir la segunda suspensión al segundo recipiente,

15 realizar el método de cultivo o producción de conformidad con la presente invención, particularmente el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25,

notificar opcionalmente la estructura de glicosilación de la glicoproteína de interés producida en la segunda suspensión y/o la velocidad de producción de las células de la segunda suspensión,

comparar opcionalmente la estructura de glicosilación de la glicoproteína de interés producida en ambas suspensiones y/o la velocidad de producción de las células de ambas suspensiones.

20

El término "alterar la escala" se refiere preferentemente al aumento de escala, es decir, al aumento del volumen de cultivo.

25

Los métodos de conformidad con la invención (por ejemplo, alta agitación y baja aireación) permiten un buen crecimiento de las células que se usan de conformidad con la invención. Se encontró que pueden cultivarse en biorreactores de tanque agitado y una serie de otros recipientes, denominados colectivamente en la presente descripción también fermentadores (por ejemplo, frascos en T, biorreactor de cultivo con agitación centrífuga y ondulatorio) que son no homogéneos en volumen y geometría. Para el tanque agitado, se puede lograr una densidad celular viable de aproximadamente 2×10^6 células/ml junto con una alta viabilidad > 95 %. En el modo de perfusión, las células crecen a densidades celulares altas de hasta 10^7 células/ml junto con una alta viabilidad de > 90 %. Una buena productividad específica puede ser, por ejemplo por perfusión.

30

Las condiciones estándar son pH 7,2; tensión de oxígeno disuelto (DOT) 40 % y temperatura 37 °C, aunque el método de conformidad con la invención es robusto con respecto a la variación de parámetros de proceso. El uso de un bajo flujo de gas y de un rociador en anillo proporciona resultados sorprendentemente buenos.

35

La calidad del producto obtenida por el método de conformidad con la invención es muy alta, por lo que la elección del método de producción puede hacerse basándose en las consideraciones económicas y de productividad. Al expresar un anticuerpo usando los métodos de conformidad con la presente invención se encontró que el patrón de glicosilación fue comparable y, por lo tanto, inalterado cuando se usa una escala de 1 l en comparación con biorreactores de 10 l y 100 l de diferentes proporciones geométricas. Basándose en la robustez de la tensión de cizallamiento alta de las células que se usan de conformidad con la invención (al menos un aumento de 10 veces en comparación con las células CHO), el aumento de escala puede realizarse a una entrada de energía específica constante. La evaluación cualitativa y cuantitativa del rendimiento de los biorreactores de 1 l, 10 l y 100 l y un panel de pruebas de caracterización bioquímica muestran que la comparación del proceso (método) y el producto se mantuvo bien durante el proceso de escalado.

40

45

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra los resultados de un conjunto de experimentos para GlycoExpress A hPM (PankoMab, un anticuerpo anti-MUC1) comparando diferentes entradas de energía para 100 rpm (0,0007 W/kg), 200 rpm (0,006 W/kg) y 300 rpm (0,02 W/kg). Se muestran datos para la concentración de células viables (A), la productividad (B) y la viabilidad (C).

50

La Fig. 2 muestra una comparación del crecimiento celular (A), productividad específica (B), viabilidad (C), velocidades de perfusión (D) y concentración de glucosa (E) para dos corridas de perfusión comparables usando Centritech Lab II para la retención celular de GlycoExpress A hPM en modo continuo.

55

La Fig. 3 muestra datos ilustrativos para el escalado de las fermentaciones en las escalas de 1 l; 10 l y 100 l. Se muestran el crecimiento celular (A), productividad específica (B), viabilidad (C), velocidades de perfusión (D) y concentración de glucosa (E) para tres fermentaciones bajo condiciones similares usando GlycoExpress A hPM.

60

La Fig. 4 muestra una comparación de corridas de perfusión de 100 l similares. Se muestran el crecimiento celular (A), productividad específica (B), viabilidad (C), velocidades de perfusión (D) y concentración de glucosa (E) para tres fermentaciones repetidas.

65

Bibliografía consultada

- [Ahn y otros 2008] Ahn, Woo Suk, J.-J. Jeon, Y.-R. Jeong, S. J. Lee y S. K. Yoon (2008). Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 101 (6):1234-1244.
- [Godoy-Silva y otros 2009] Godoy-Silva, Ruben, J. J. Chalmers, S. A. Casnocha, L. A. Bass, y N. Ma (2009). Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnol Bioeng*, 103(6):1103-1117.
- [Goletz y otros 2009] Goletz, Steffen, A. Danielczyk, R. Stahn, U. Karsten, L. Stoeckl, A. Loeffler, A. Hillemann y H. Baumeister (2009). GlycoOptimization for Fully Human and Largely Improved Biopharmaceutical Antibodies and Proteins. *Proceedings of the International Beilstein Symposium on Glyco-Bioinformatics - Bits 'n' Bytes of Sugars*, 4-8 de Octubre, 2009, Potsdam, Alemania; 87-100
- [Kunkel y otros 1998] Kunkel, J. P., D. C. Jan, J. C. Jamieson, y M. Butler (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol*, 62(1):55-71.
- [Lipscomb y otros 2005] Lipscomb, Matthew L, L. A. Palomares, V. Hernández, O. T. Ramírez, y D. S. Kompala (2005). Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnol Prog*, 21(1):40-49.
- [Motobu y otros 1998] Motobu, Maki, P.-C. Wang, y M. Matsumura (1998). Effect of shear stress on recombinant chinese hamster ovary cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 2:190-195.
- [Müthing y otros 2003] Müthing, Johannes, S. E. Kemminer, H. S. Conradt, D. Sagi, M. Nimtz, U. Kärst, y J. Peter-Katalinic (2003). Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody r24. *Biotechnol Bioeng*, 83(3):321-334.
- [Senger and Karim 2003] Senger, Ryan S y M. N. Karim (2003). Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol Prog*, 19(4):1199-1209.
- [Stiens y otros 2000] Stiens, Lars R., H. Büntemeyer, D. Lütkemeyer, J. Lehmann, A. Bergmann y W. Weglöhner (2000). Development of serum-free bioreactor production of recombinant human thyroid stimulating hormone receptor. *Biotechnol Prog*, 16:703-709
- [Tachibana y otros 1994] Tachibana, H., K. Taniguchi, Y. Ushio, K. Teruya, K. Osada, y H. Murakami (1994). Changes of monosaccharide availability of human hybridoma lead to alteration of biological properties of human monoclonal antibody. *Cytotechnology*, 16(3):151-157.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Precultivo

- Los precultivos se cultivan en frascos de cultivo celular (TPP/Biochrom, Alemania). Los frascos se usan hasta 5 ml (T25, 25 cm² de área), 30 ml (T75, 75 cm²) y 75 ml (T150, 150 cm²) de volumen de suspensión. Las células se mantienen en la fase de crecimiento logarítmico dividiendo cada 2-3 días y ajustando la concentración celular a $0.15 \cdot 10^6$ células/ml después de la división. La adición de metotrexato (Sigma-Aldrich, Alemania) y Puomicina (Takara Bio Europe, Francia) se realiza de manera dependiente de un clon semanal o permanentemente a diferentes concentraciones. Las células se cultivan en incubadoras (Integra Biosciences IBS, Biosafe plus, Suiza o Thermo/Heraeus BBD 6220, Alemania) a 37°C, 8 % de dióxido de carbono y 95 % de humedad relativa.

Ejemplo 2: Cultivo con agitación centrífuga

- Comenzando con volúmenes de 125 ml de suspensión celular, se lleva a cabo un precultivo con agitación centrífuga usando frascos de centrifugación (Integra Biosciences IBS, Cellspin, Suiza). Se usan tres volúmenes diferentes (0,25 l, 0,5 l, 1 l) de frascos de centrifugación. La velocidad del rotor se ajusta a 60 rpm mientras que funciona el sistema dentro de una incubadora (Integra Biosciences IBS, Biosafe plus, Suiza) a 37 °C, 8 % de dióxido de carbono y 95 % de humedad relativa. Los frascos de centrifugación se inoculan con $0.15 \cdot 10^6$ - $0.3 \cdot 10^6$ células/ml. Para propósitos de precultivo, las células se mantienen en la fase de crecimiento logarítmico aumentando el volumen de suspensión cada 2-3 días y ajustando la concentración de células $0.15 \cdot 10^6$ células/ml después de la división.

- Antes de establecer un proceso de fermentación para las células GlycoExpress A y GlycoExpress B (que son células de una línea celular derivada de K562), el crecimiento se analiza en cultivos con agitación centrífuga. Además de los frascos en T, se usan frascos de centrifugación y de agitación para propósitos de precultivo. Comparado con los frascos en T, tanto los frascos de centrifugación como los de agitación tienen propiedades de transferencia de masa mejoradas

que resultan en valores de k_L aumentados.

Los perfiles de crecimiento se analizaron en paralelo para las células GlycoExpress A hPM en experimentos discontinuos. Las células crecen comparativamente en los tres sistemas diferentes. La concentración celular en los frascos en T es ligeramente inferior en comparación con los cultivos con agitación centrífuga y agitación.

A pesar de alcanzar densidades de células más bajas, el cultivo celular en frascos T muestra la concentración de lactato más alta. Concluyendo, las botellas de cultivo rotatorias y los frascos de agitación son igualmente adecuados para el cultivo de células. Ambos parecen proporcionar un crecimiento ligeramente mejor en comparación con los frascos en T y por lo tanto, son bien adecuados para los precultivos antes de la fermentación. Esto también sugiere una robustez de la línea celular concerniente al cultivo.

Ejemplo 3: Fermentación Biostat B-DCU 2 I

Las fermentaciones a escala de laboratorio se realizan usando un sistema Sartorius Biostat B-DCU 2 I (Sartorius, Alemania). Los recipientes de fermentación Univessel 2 I (Sartorius, Alemania) de pared doble tienen un volumen de trabajo mínimo de 0,8 y máximo de 2 litros. Generalmente, las fermentaciones se realizan a un volumen de trabajo de 1 litro. Todos los fermentadores se esterilizan en una autoclave Systec V-150 (Systec, Alemania). La mezcla de gases proporciona cuatro gases diferentes: nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y aire comprimido. El oxígeno, el dióxido de carbono y el aire comprimido se accionan por reguladores de flujo másico, mientras que el nitrógeno se controla usando un flujómetro de área variable Q-Flow (Vögtlin Instruments, Alemania). La aireación puede controlarse también estableciendo un flujo total para todos los gases. El suministro de gas y gas de escape se filtran con filtros de PTFE Sartorius Midisart 2000 0,2 μm (Sartorius, Alemania). La concentración de oxígeno disuelto se mide en línea con los electrodos Mettler Toledo InPro 6800 (Mettler-Toledo, Suiza). Se usan la adición de la base (NaOH 0,5 M) y adición de dióxido de carbono para controlar el valor del pH. El valor de pH se mide en línea usando un electrodo Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S (Mettler-Toledo, Suiza). La base se añade a través de una bomba Watson Marlow 100 OEM (Watson Marlow, Inglaterra). Dos bombas Watson Marlow 100 OEM adicionales (Watson Marlow, Inglaterra) y una bomba Watson Marlow 313 OEM (Watson Marlow, Inglaterra) se usan para la cosecha celular, inoculación u otros propósitos. Se añade medio de alimentación a través de una bomba Watson Marlow 101 U/R (Watson Marlow, Inglaterra) usando una balanza Sartorius LE10001 (Sartorius, Alemania) y un controlador de flujo gravimétrico. El peso del reactor se midió usando una balanza EA60EDE-1 Economy Series (Sartorius, Alemania). Las células se agitan con uno o dos impulsores de segmentos de 3 palas 1-2 I, ajuste, complemento, $\varnothing$ 54/10 H7 (Sartorius, Alemania). El eje agitador se potencia con un motor Kollmorgen Seidel 65M 27LL-4,500 (Kollmorgen Seidel, Alemania). Dependiendo del volumen del reactor se aplican uno o dos agitadores; por ejemplo para el Biostat B-DCU 2 I se usa un agitador cuando se trabaja con 1 l de volumen de trabajo, mientras que se usan dos agitadores para una fermentación de 2 l. El enfriamiento del proceso se realiza mediante un bucle autónomo y una máquina de refrigeración Frigomix 1000. (Sartorius, Alemania)

Fermentación discontinua

La mayoría de las fermentaciones en este trabajo se realizan usando el sistema Sartorius Biostat B-DCU con un volumen de trabajo entre 0,8-2 litros (volumen preferido es 1 l). Se inicia la fermentación con una densidad celular de $0,15 \cdot 10^6$ - $0,3 \cdot 10^6$ células/ml a 37 °C, pH 7,2 y una saturación de aire de 40 % de DOT a menos que se indique de cualquier otra manera. Se usa flujo de gas de dióxido de carbono /0,5 NaOH para regular el pH. La DOT se mantiene al 40 % usando aire comprimido o oxígeno puro. Tanto el pH como la DOT se controlan por PID. Antes de optimizar la entrada de energía, se ensayan diferentes sistemas de aireación. Estas fermentaciones se realizan a una velocidad de agitación de 50 rpm, 37 °C, 40 % DOT, pH 7,2 en 1,5 l volumen de trabajo. El rociador en anillo, el micro-rociador y la aireación por membrana (Sartorius, Alemania) se someten a ensayos paralelos.

Fermentación Continua

La fermentación continua se lleva a cabo usando cuatro técnicas diferentes para la retención celular. Todas las fermentaciones se realizan con el sistema Sartorius Biostat B-DCU con un volumen de trabajo entre 1-1,5 litros.

1. Centrífuga continua: Centritech Lab II o Centritech Lab III (Berry Wehrmiller, Carr Centritech, EE.UU.)
2. Filtro de rosca interna: Filtro de rosca Sartorius 2 I 20 μm (Sartorius, Alemania)
3. Fibra hueca externa: Amersham Biosciences CFP-4E5A, 0,45 μm , 1200 cm^2 (Amersham Biosciences, EE.UU.)
4. Retención celular acústica: Biosep APS 990 (Applisens/Applikon biosciences, Países Bajos)

En las etapas posteriores del desarrollo del proceso, todas las fermentaciones continuas se llevaron a cabo usando la centrífuga continua Centritech Lab II o Centritech Lab III (Berry Wehrmiller, Carr Centritech, EE.UU.). La Centritech proporciona diferentes modos de operación para diferentes tamaños del volumen del reactor. La centrifugación se realiza usando el "modo de bomba intermitente" para fermentaciones a escala de laboratorio a un volumen de trabajo de 1 l. La fermentación en escala de 10 l o 100 l usa el "modo de bombeo" o el "modo de alimentación" en funcionamiento continuo. La perfusión se controla mediante dos balanzas. El alimentador usa un controlador de flujo gravimétrico, mientras que la cosecha se establece a través del cambio de los parámetros de control de Centritech. Las centrífugas

Centritech Lab II y Lab III no están conectadas directamente a la DCU. La perfusión en escala 100 l se controla a través de un sensor de nivel que controla la alimentación mientras que Centritech recolecta continuamente.

Ejemplo 4: Sistema de Biorreactor DASGIP

Las fermentaciones adicionales a escala de laboratorio se realizan usando un sistema de biorreactor DASGIP (DASGIP, Jülich, Alemania). El sistema DASGIP Bioreactor que consiste de diferentes módulos, puede operar cuatro biorreactores controlando simultáneamente el pH (módulo PH4/PO4), DOT (módulo PH4/PO4), temperatura (módulo TC4/SC4), agitación (módulo TC4/SC4) y alimentación líquida (módulo MP8) independientemente para cada reactor. Los recipientes de fermentación (DASGIP, Alemania) tienen un volumen de trabajo de 0,6-1 l. El control de la temperatura se garantiza usando mangas de calefacción. Los sistemas DASGIP están equipados con bombas peristálticas que cuentan con controles de velocidad variables. La velocidad de flujo de cada bomba puede programarse por el usuario para que se controle por una función independiente basada en los datos en línea. Puede lograrse el control de retroalimentación concurrente de múltiples análisis tanto para nutrientes como metabolitos. El suministro de gas se controla mediante el módulo MX4/4. La mezcla de gases suministra cuatro gases diferentes: nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y aire comprimido, que funcionan con controladores de flujo masivo. El suministro de gas y los gases de escape se filtra con filtros de PTFE Sartorius Midisart 2000 0,2 µm (Sartorius, Alemania). Se usa la adición de base (NaOH 0,5 M) y adición de dióxido de carbono para controlar el valor del pH. El pH se mide en línea usando un electrodo Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S (Mettler-Toledo, Suiza). Todos los fermentadores se esterilizan en una autoclave Systec V-150 (Systec, Alemania). Las células se agitan con un impulsor de segmento de 3 palas (DASGIP, Jülich Alemania). El eje del agitador se acciona por un agitador magnético.

Ejemplo 5: Fermentación a escala de laboratorio de 10 l

Las fermentaciones a escala de laboratorio se llevan a cabo usando un sistema Sartorius Biostat B-DCU 10 l (Sartorius, Alemania). Un recipiente de fermentación de acero inoxidable se usa con un volumen de trabajo mínimo de 4 y máximo de 10 litros. Generalmente, las fermentaciones discontinuas se realizan a volumen de trabajo de 10 l, mientras que la perfusión se lleva a cabo en volumen de trabajo de 5 l. La CDCU de 10 l está configurada de manera similar que los biorreactores 2 l B-DCU. La mezcla de gases proporciona cuatro gases diferentes: nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y aire comprimido. El oxígeno, el dióxido de carbono y el aire comprimido se accionan por reguladores de flujo másico, mientras que el nitrógeno se controla usando un flujómetro de área variable Q-Flow (Vögtlin Instruments, Alemania). La aireación puede controlarse también estableciendo un flujo total para todos los gases. El suministro de gas y los gases de escape se filtran con filtros de PTFE Sartorius Mini o Sartorius Junior de 0,2 µm (Sartorius, Alemania). La concentración de oxígeno disuelto se mide en línea usando los electrodos Mettler Torleto InPro 6100/120/T/N (Mettler-Toledo, Suiza). Se usan la adición de la base (NaOH 0,5 M) y adición de dióxido de carbono para controlar el valor del pH. El valor de pH se mide en línea usando un electrodo Mettler-Toledo 405-DPAS-SC-K8S (Mettler-Toledo, Suiza). La base se añade a través de una bomba Watson Marlow 100 OEM (Watson Marlow, Inglaterra). Dos bombas adicionales de Watson Marlow 100 OEM (Watson Marlow, Inglaterra) se usan para la cosecha de células, la inoculación u otros fines. El medio de alimentación se añade a través de un Watson Marlow SCI323 (Watson Marlow, Inglaterra) usando una balanza Sartorius EA150CE (Sartorius, Alemania) y un controlador de flujo gravimétrico. Las células se agitan con uno o dos impulsores de segmentos de 3 palas 5-10 l, ajuste, complemento, Ø 54/10 H7 (Sartorius, Alemania). El eje agitador se potencia con un motor Kollmorgen Seidel 65M 57SL-3000 (Kollmorgen Seidel, Alemania). Dependiendo del volumen del reactor, se aplican uno o dos agitadores; por ejemplo para C-DCU 10 l: un agitador para 5 l, dos agitadores para 10 l. El enfriamiento del proceso se realiza usando un bucle autónomo ya sea con una máquina de refrigeración Frigomix 1000 (Sartorius, Alemania) o una anilla de enfriamiento de agua.

Ejemplo 6: Fermentación a escala de producción de 100 l

La fermentación a escala de producción se lleva a cabo bajo condiciones de sala limpia. La producción emplea un fermentador Applikon 100 l (Applikon, Bélgica) para cultivo celular. El programa BioXpertXP se usa para la supervisión de los procesos y el registro de datos. Similar a la fermentación a escala de laboratorio, la mezcla de gases proporciona cuatro gases diferentes: nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y aire comprimido que funcionan por controladores de flujo masivo. El pH y la DOT se controlan mediante electrodos Mettler-Toledo (Mettler-Toledo, Suiza) para la medición.

Ejemplo 7: Fermentación - Uso Único

Fermentaciones adicionales a escala de laboratorio funcionan con un biorreactor ondulatorio. La temperatura, la velocidad de balanceo y el ángulo de oscilación se miden y controlan usando una plataforma Wave Cellbase 20 SPS (Wave Biotech AG, Suiza). La DOT, el pH y la aireación se controlan por una versión Wavepod-R (GE Healthcare, EE.UU.). Los puntos de ajuste son temperatura 37°C, pH 7,2 velocidad de balanceo: 12 rpm y ángulo 9°. La concentración inicial de las células se establece en $1,5 \times 10^5$ células/ml. La perfusión se realizó usando Centritech Lab II y Lab III respectivamente (BerryWehrmiller, Carr Centritech, EE.UU.). La bolsa de cultivo de células ondulatoria se diseñó usando un tubo de inmersión. Los tubos se conectan usando ya sea adaptadores Luer-Lock o MPC. Todas las conexiones se realizan bajo un flujo laminar (Thermo Scientific, EE.UU.).

Ejemplo 8: ELISA

La concentración de anticuerpos se determina generalmente usando el ensayo inmunoenzimático ligado a fase sólida (ELISA). Se usa un volumen de 50 µl de anticuerpo anti-cadena kappa de Ig humana (BD Biosciences, EE.UU.) como anticuerpo de recubrimiento a 1 µg/ml en PBS durante al menos 12 horas a 4 °C. Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 30 min con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % (Roth, Alemania) en PBS. Las muestras se diluyen en BSA al 1 %/PBS y 50 µl se incuban durante 1 hora. La cuantificación de los datos se alcanza usando Erbitux como estándar. Erbitux se usa en 10 µg/ml, 8 µg/ml, 6 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,75 µg/ml, 0,5 µg/ml y 0,25 µg/ml. 50 µl de anti-IgG humano (H+L) en conejo conjugada con POD (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido) se usan como un anticuerpo secundario. La incubación es durante 1 hora. Por último, se aplican 100 µl de sustrato de micropocillo de un componente HRP de la tetrametilbencimidina (TMB) (Tebu-Bio Laboratories, Alemania) para su detección. Se detiene la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 2,5N (Sigma, Alemania) y se mide a 450/630 nm de longitud de onda.

ELISA de unión al antígeno

La unión al antígeno de PankoMab humano se mide mediante la unión a péptidos MUC1 glicosilados y no glicosilados en un ELISA de antígeno. Los péptidos MUC1 glicosilados se recubren a molaridades iguales en PBS durante al menos 12 h a 4 °C. Los sitios de unión no específicos se bloquean durante 30 min con albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % (Roth, Alemania) en PBS. Las muestras de PankoMab humano se diluyen en BSA al 1%/PBS a concentraciones de 0,4 µg/ml y 0,8 µg/ml y 50 µl se incuban durante 1 hora. La calibración se realiza usando un estándar de sobrenadante de cultivo celular (dilución 1:100, 1:200, 1:400). 50 µl de anti-IgG humano (H+L) en conejo conjugada con POD (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido) se usan como anticuerpo secundario. La incubación es durante 1 hora. Por último, se aplican 100 µl de sustrato de micropocillo de un componente HRP de la tetrametilbencimidina (TMB) (Tebu-Bio Laboratories, Alemania) para su detección. Se detiene la reacción con 50 µl de H₂SO₄ 2,5N (Sigma, Alemania) y se mide a 450/630 nm de longitud de onda. El ELISA de antígeno se analiza usando una regresión para el estándar de sobrenadante. La especificación para la alta calidad del producto se une al péptido glicosilado con una densidad óptica (DO) mayor que 0,3. Adicionalmente, la relación de unión del péptido MUC1 no glicosilado con el MUC1 glicosilado tiene que ser < 5 % para cumplir con la especificación.

Ejemplo 9: Cromatografía de exclusión por tamaño

El porcentaje de anticuerpo monomérico se determina usando la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La cromatografía se lleva a cabo usando una columna Superdex 200 10/300 GC (GE Healthcare, EE.UU.) en un sistema Äkta prime (GE Healthcare, EE.UU.). Las muestras se diluyen con PBS hasta un tamaño de muestra de 250 µl que contiene aproximadamente 50 - 200 µg de proteína. Las muestras se inyectan de forma libre de burbujas usando un bucle de muestra de 200 µl. El tampón de funcionamiento para el análisis es PBS, el velocidad de flujo se ajusta a 0,5 ml/min. Después de la elución se analiza el área máxima del cromatograma con respecto al contenido de monómero, dímero y multímero.

Ejemplo 10: Análisis del glicano

Análisis de monosacáridos

Para el análisis del monosacárido de glicano, el anticuerpo glicosilado se hidroliza con ácido trifluoroacético lo que resulta en una liberación de porciones de monosacáridos de la cadena de glicanos. Adicionalmente, la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina se desacetilan a glucosamina y galactosamina mediante la acción del ácido trifluoroacético. La mezcla de monosacáridos se separa y cuantifica mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD).

Perfil del glicano

Para el perfil del glicano, los N-glicanos intactos se liberan del núcleo proteico en la digestión del gel con PNGasa. Los N-glicanos se eliminan del gel y posteriormente se marcan con el marcador de fluorescencia 2-aminobenzamida. La muestra purificada de N-glicanos marcados se separa mediante cromatografía de fase normal (NP-HPLC) o cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) con detección fluorométrica. NP-HPLC permite la separación de la mayoría de los N-glicanos. HILIC-HPLC permite la separación de estructuras de N-glicanos que contienen N-acetilglucosamina biseccional a diferencia de NP-HPLC. Los picos se asignan a estructuras de glicanos mediante la comparación de los tiempos de retención con una base de datos. Adicionalmente, las estructuras se confirman por espectrometría de masas MALDI-TOF y matrices de digestión enzimática empleando exoglicosidasas.

Análisis separado de la glicosilación de Fc/Fab

Mientras que la glicosilación de Fc tiene un impacto sobre la función efectora de anticuerpos, la glicosilación de Fab influye en las interacciones del anticuerpo con un antígeno. Por lo tanto, un interés básico del análisis de glicanos es

determinar si ambas partes, Fc y Fab están glicosiladas, y en segundo lugar qué diferencias se observan entre los patrones de glicosilación de ambos sitios. La completa escisión de un anticuerpo con papaína resulta en la generación de un fragmento Fc y dos fragmentos Fab. La separación de los fragmentos se realiza empleando cromatografía de afinidad sobre la fase sólida de la proteína A. La proteína A une específicamente al fragmento Fc así como al anticuerpo no digerido. Fc y el anticuerpo no digerido se unen a la Proteína A, mientras que Fab se puede encontrar en el flujo pasante. Una etapa de elución con citrato 0,1 M, cloruro sódico 0,15 M a pH 2,2 permite la liberación del fragmento Fc del anticuerpo no digerido. Después de separar Fc de la parte Fab, se aplican los N-glicanos de cada fragmento para el perfil de glicanos. Basado en el hallazgo de los espectros se clasifican las estructuras correspondientes para las siguientes características: presencia o ausencia de fucosa, presencia o ausencia de GlcNAc biseccional, distribución de los estados de galactosilación, distribución del nivel de sialilación (N0, A1, A2) y antenariedad.

Ejemplo 11: Caracterización del producto del cultivo con agitación centrífuga

El sobrenadante de cultivo con agitación centrífuga de GlycoExpress A hPM (PankoMab humano) se purifica usando una columna de Proteína A. Después de la elución, se caracteriza el anticuerpo purificado. El anticuerpo purificado muestra una unión específica al antígeno bioactivo del ELISA que cumple con la especificación, las bandas claras en SDS-PAGE indican alta pureza y también se corresponden con estructuras monoméricas del anticuerpo (97%). En cuanto al perfil de glicano, el producto muestra estructuras diantenarias junto con altos valores de sialilación y galactosilación. El perfil de glicano se analiza a partir del anticuerpo en fase estacionaria.

Para analizar la calidad del producto durante las diferentes fases de crecimiento, se realizan tres diferentes recolecciones que representan las tres fases de crecimiento. Se recoge la primera cosecha (fase exponencial) después de aproximadamente 48 h de cultivo. Las células están en crecimiento exponencial ($\mu > 0$). Se recoge la segunda cosecha después de aproximadamente 140 h de cultivo en fase estacionaria. En este punto, las células no crecen significativamente ($\mu = 0$), pero la viabilidad es alta (aproximadamente 95 %). Se recoge la tercera cosecha durante la muerte después de aproximadamente 210 horas. La viabilidad cae significativamente (aproximadamente 80 %) y la concentración de células vivas disminuye ($\mu < 0$). El anticuerpo se almacena, se purifica usando la Proteína A y se analiza para diferentes etapas de crecimiento. Los resultados indican bandas claras para la cadena de pesada y ligera del anticuerpo. No hay degradación visible del producto durante las diferentes etapas de crecimiento. Concluyendo, los cultivos con agitación centrífuga proporcionan un producto altamente monomérico (determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)) que se une específicamente al antígeno del ELISA y no muestra impurezas en SDS-PAGE. El perfil de glicano también se analiza para la fase de crecimiento estacionaria. Durante el proceso de desarrollo, un objetivo principal es mantener la alta calidad del producto.

Ejemplo 12: Fermentación discontinua

Se encontró que el crecimiento de las líneas celulares GlycoExpress es muy robusto en cuanto a las condiciones del proceso y no es muy afectado por las fuerzas de cizallamiento que se inducen por la agitación. Por el contrario, las células son muy sensibles a la aireación con respecto al tamaño de la burbuja y la velocidad de flujo de gas:

12.1 Aireación

La aireación es crítica para un proceso biotecnológico, ya que el suministro de oxígeno es esencial para las células animales. Sin embargo, las burbujas pueden crear fuerzas de cizallamiento intensivas. Durante el cultivo en frascos en T o botellas de cultivo rotatorias, no se aplica aireación. En los fermentadores, que generalmente tienen volúmenes mucho mayores, tiene que suministrarse oxígeno o aire para evitar la limitación de oxígeno. Adicionalmente, el control del pH funciona generalmente con la adición de dióxido de carbono, que debe suministrarse. Por lo tanto, tres tipos diferentes de suministro de gas se prueban en el biorreactor. Se realizan fermentaciones discontinuas paralelas usando GlycoExpress A hPM para minimizar las variaciones basadas, por ejemplo en diferentes precultivos. Las fermentaciones se realizan usando un rociador en anillo, un micro-rociador y una aireación de membrana. Un rociador en anillo suministra al biorreactor burbujas bastante grandes. A diferencia de esto, un micro-rociador crea burbujas mucho más pequeñas usando una estructura permeable a gases porosos. Los rociadores en anillo y los micro-rociadores suministran las células usando convección, que está influenciada por la entrada de energía en el biorreactor. A una entrada de energía más alta le corresponde una transferencia de masa mucho mejor, que puede reducir la velocidad de flujo de gas requerido para mantener un punto de ajuste de la tensión de oxígeno disuelto (DOT). Finalmente, la aireación de la membrana no crea burbujas en absoluto, suministrando células basadas solamente en la difusión. Por lo tanto, la aireación de la membrana es el método más cauteloso de suministrar las células con gas. Cuando se aplica la aireación de la membrana no hay tensión de cizallamiento basada en burbujas.

Los tres tipos diferentes de aireación se prueban para un clon de GlycoExpress A hPM. Las fermentaciones paralelas se analizan con respecto a la concentración celular viable, la productividad y la viabilidad. Los resultados muestran un crecimiento similar a una densidad celular máxima de 2×10^6 células/ml y una concentración de anticuerpo de aproximadamente 20-25 $\mu\text{g/ml}$ tanto para el micro-rociador como para la aireación de la membrana. La aireación de la membrana resulta en una vitalidad muy alta de $\approx 95\%$, mientras que la aireación por el micro rociador conduce a aprox. 90 % de la vitalidad. Por lo tanto, usando el rociador en anillo las células crecen hasta una densidad celular máxima de

0,7*10⁶ células/ml y una concentración de producto de 10 µg/ml. Mientras que la viabilidad del rociador en anillo y del micro-rociador caen en las etapas medias y tardías de la fermentación, la aireación de la membrana asegura una viabilidad muy alta durante el proceso. Esto indica que la burbuja induce daños en las células cuando se trabaja con un anillo o microrociador. El daño más alto es causado por las burbujas del rociador en anillo cuya viabilidad cae de 92 % a 74 %. La viabilidad del micro rociador se reduce al 84% mientras que la aireación de la membrana mantiene una muy alta viabilidad del 95 % durante todo el proceso.

Se elige el rociador de anillo para su desarrollo ulterior. Esto se basa en las limitaciones técnicas y relacionadas con las BPM en fermentaciones de grandes recipientes. En primer lugar, la aireación de la membrana es altamente costosa debido al gran área de la membrana en la escala de producción, por ejemplo los tubos de membrana tienen que ser reemplazados después de cada fermentación debido a los principios de BPM. En segundo lugar, el área de membrana requerida aumenta aún más en la escala de producción, lo que puede conducir a problemas de mezcla debido a la obstrucción del flujo. En lo que respecta a los micro-rociadores, se supone que conducen a problemas de formación de espuma densa en la escala de producción, lo que puede dar lugar a la necesidad de reactivos antiespumantes que sean difíciles de degradar en el procesamiento corriente abajo. En consecuencia, el trabajo con un rociador en anillo, una entrada de energía aumentada, dará lugar a un velocidad de flujo de gas reducido a medida que aumenta la transferencia de masa (por ejemplo, el número de Sherwood aumenta con el aumento del número de Reynolds).

12.2 Flujo constante vs. flujo exclusivo

Hay dos modos diferentes de aireación en un fermentador. El primero es aplicar un velocidad de flujo constante y mezclar cuatro gases (aire, oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono) basados en los requerimientos de las células. El segundo es no mezclar un flujo de gas constante, sino dar exclusivamente un pulso de gas requerido. El sistema de flujo exclusivo da mucho mejor crecimiento y viabilidad. A velocidades de flujo constantes, las células se dañan más con el aumento del flujo. Un conjunto de fermentaciones discontinuas, realizadas a velocidades de flujo de 0,01 l/h, 0,05 l/h y 0,1 l/h, mostró pérdida de viabilidad a velocidades de flujo superiores a 0,01 l/h por litro de volumen del reactor. En consecuencia, se elige el sistema de flujo exclusivo para controlar la fermentación de células GlycoExpress en un biorreactor. Adicionalmente, la fermentación en el sistema biorreactor de cultivo ondulatorio mostró resultados prometedores. Usando este tipo de aireación, las células GlycoExpress crecen muy bien.

Resumiendo, la aireación es un parámetro muy crítico. El daño celular debido a la aireación se ha observado en varias ocasiones. Para reducir el daño la velocidad de aireación debe ser tan baja como sea posible. En el siguiente, todas las fermentaciones se ejecutan con un flujo exclusivo de mezcla de gases en lugar de un flujo constante de mezcla de gas. La aireación basada en la limitación de burbujas es crucial durante todas las etapas del desarrollo. Por lo tanto, las fermentaciones se realizan preferentemente usando suministro de oxígeno puro en lugar de aire comprimido.

12.3 Entrada de energía

Después de configurar el tipo de aireación, la siguiente etapa en la optimización fue probar diferentes entradas de energía. Debido al posible daño por cizallamiento en el fermentador, las primeras fermentaciones se realizan a una velocidad de agitador muy baja de 50 rpm (esto equivale a una velocidad de punta de 0,14 m/s y una entrada de energía de 9×10^{-5} W/kg, ver la tabla 2 más abajo. Los experimentos relacionados con la aireación se llevan a cabo usando una velocidad del agitador de 100 rpm que conduce a una entrada de baja energía. Para mantener la homogeneidad, especialmente a altas densidades celulares, pero también a escalas de fermentador más altas, se prefiere una entrada de energía más alta. Se supone además, que la entrada de energía más alta reduce el velocidad de flujo de gas necesario para la aireación, lo que debe resultar en menos daño basado en burbujas.

La entrada de energía se comprueba en el modo discontinuo usando diferentes velocidades del agitador. En un conjunto primario de experimentos se prueban 100 rpm, 200 rpm y 300 rpm. La Tabla 1 muestra las características de agitación (entrada de energía, velocidad de punta, relación punta cizallamiento y número de Reynolds) para diferentes velocidades de agitador entre 50-400 rpm.

Agitación	Entrada de energía	Velocidad de punta	Relación de cizallamiento en la punta	Reynolds
[rpm]	[W/kg]	[m/s]	[l/s]	
50	0,0001	0,14	200	3700
100	0,0007	0,28	284	7400
200	0,006	0,58	400	14800
300	0,020	0,85	492	22100
400	0,048	1,13	568	29500

Tabla 1: Características de agitación en el biorreactor de 2l B-DCU Sartorius para diferentes velocidades de agitación. Los datos se basan en el volumen de cultivo de 1l y en la utilización de un impulsor de segmento de 3 palas para

agitación.

Los resultados se representan en la Fig. 1. Mientras que 200 rpm y 300 rpm muestran una densidad celular similar a $2,5 \times 10^6$ células/ml, las células no crecen más de 1×10^6 células/ml cuando la velocidad del agitador se ajusta a 100 rpm. La concentración del título alcanza niveles similares en las tres fermentaciones de aproximadamente 25 µg/ml. A pesar de las crecientes fuerzas de cizallamiento, la vitalidad es máxima a 200 rpm y 300 rpm. Al usar 100 rpm, la vitalidad cae por debajo del 80 %. Más tarde, al trabajar en el escalado para la escala 100l, la mezcla se volvió de nuevo una preocupación urgente. Las fermentaciones con 200 rpm y 400 rpm de velocidad del agitador muestran resultados comparables. En el trabajo con 400 rpm, las células parecen crecer ligeramente más rápido, pero no alcanzan las concentraciones y productividad de células vitales. No obstante, 400 rpm parece ser adecuado para la fermentación, ya que 400 rpm da como resultado una viabilidad muy alta (> 90 %) durante el crecimiento logarítmico, lo que indica que no hay daño inducido por el cizallamiento. Resumiendo, las velocidades del agitador entre 200 rpm y 400 rpm muestran un crecimiento comparable. Las burbujas influyen en la viabilidad de una manera mucho más negativa que las fuerzas de cizallamiento inducidas por el agitador. Se ajusta una velocidad de agitación de 300 rpm (entrada de energía: 0,02 W/kg) como agitación estándar para la fermentación en una escala de laboratorio de 2 l.

12.4 Robustez de los parámetros del proceso

Las fermentaciones discontinuas se realizan aplicando un rociador en anillo y una entrada de energía de 0,022 W/kg. Se analiza un total de 16 corridas usando GlycoExpress A hPM. Los valores del proceso se establecieron de la siguiente manera: pH (7,0; 7,2; 7,4), DOT (20 %; 40 %; 60 %) y temperatura (36 °C, 37 °C, 38°C). No hubo influencia con respecto al crecimiento y la productividad al cambiar los parámetros del proceso pH, DOT y temperatura en el intervalo probado durante una fermentación discontinua. Esto significa que no hay correlación con respecto a las respuestas durante el cambio de los parámetros del proceso. No hubo correlación entre el número de células inicial (que varía entre aproximadamente $1,2\text{--}1,8 \times 10^5$ células/ml) y la productividad final del lote o la densidad celular máxima. Como consecuencia, el proceso de inoculación puede considerarse también como robusto.

A menos que se indique de cualquier otra manera, todas las fermentaciones se llevan a cabo en condiciones estándar de pH 7,2, DOT 40 % de saturación de aire y una temperatura de 37 °C. Estas condiciones se aplican también a los procesos de perfusión.

12.5 Producción dependiente del crecimiento

Se encontró que a medida que las células crecen en la fermentación discontinua, la productividad y el crecimiento están estrechamente unidos entre sí ya que las células no se producen durante la fase de crecimiento estacionaria. Los cultivos discontinuos de GlycoExpress A hPM se analizaron con respecto a su crecimiento y productividad. La producción de anticuerpos dependió fuertemente del crecimiento celular. Durante la fase estacionaria en la fermentación, la concentración de anticuerpos no aumentó.

La prueba estadística se aplicó usando la concentración celular como variable de influencia y la productividad como variable de respuesta. Usando una regresión lineal entre la concentración celular y la productividad, se encuentra una fuerte correlación ($R^2 = 0,994$). En consecuencia, la producción está ligada al crecimiento y las células no producen ningún anticuerpo durante la fase estacionaria. Esto da una gran diferencia a otros sistemas de producción, como las células CHO, donde la mayor parte del producto se produce durante la fase de crecimiento estacionaria. Este resultado es muy importante para el desarrollo de procesos. Da lugar a un uso preferido de un proceso de perfusión en lugar de un proceso semidiscontinuo como la mayoría de los trabajos semidiscontinuos con una fase estacionaria extendida para la acumulación del producto. Como otra consecuencia, el crecimiento celular debe ser un objetivo principal tanto para la perfusión como para el desarrollo de procesos semidiscontinuos.

Para análisis adicional de la productividad dependiente del crecimiento, se analizaron los niveles cuantitativos de ARNm mediante la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en la fase de crecimiento logarítmica y estacionaria. Los resultados mostraron un nivel constante de expresión del gen de mantenimiento (actina y GAPDH) tanto en fase logarítmica como estacionaria junto con niveles constantes de ARNm para la proteína expresada de forma recombinante (VH y VL). Estos resultados dan evidencia que se expresan igualmente tanto en fase de crecimiento logarítmica como estacionaria. Se puede concluir que la razón para disminuir la productividad en fase estacionaria es probable que sea post-transcripcional.

12.6 Confirmación de la calidad del producto durante la fermentación discontinua

Las fermentaciones discontinuas se realizaron en condiciones estándar (pH 7,2, DOT 40 %, 37°C) para analizar la calidad del producto y comparar los resultados con la calidad del producto de agitación centrífuga. Generalmente, la calidad del producto de GlycoExpress A hPM es poco diferente del producto producido por agitación centrífuga (el producto de agitación centrífuga se muestra en la Tabla 1). Existe un número de multímeros casi no afectados con una cantidad disminuida de aproximadamente 2 % de multímeros de anticuerpo en el cultivo discontinuo (en comparación con el 3 % en el producto de cultivo de agitación centrífuga). Adicionalmente, el ELISA de bioactividad muestra elevada

unión específica tanto en la fermentación por agitación centrífuga como discontinua y el SDS-PAGE tampoco se afecta. El perfil de glicosilación es comparable al perfil de glicano de un cultivo con agitación centrífuga.

12.7 Conclusión de la Fermentación discontinua

Las células humanas de origen de leucemia mieloide pueden cultivarse en fermentación discontinua. En comparación con el cultivo con agitación centrífuga, la fermentación discontinua da lugar a densidades de células ligeramente mejoradas junto con una productividad ligeramente superior (aproximadamente un 10 % de aumento, datos no mostrados). El proceso de fermentación puede realizarse con alta agitación ya que las células no son sensibles a las fuerzas de cizallamiento inducidas por el agitador. Adicionalmente, el proceso muestra una alta robustez hacia las condiciones del proceso de fermentación dando buen crecimiento y productividad para un amplio intervalo de valores de ajuste de pH, DOT y temperatura. Sin embargo, las células son sensibles a la aireación, por lo tanto las burbujas deben evitarse mediante el uso de aireación de flujo exclusivo. Por lo tanto, la aplicación de una entrada de alta energía es útil a medida que aumenta la transferencia de masa. Para aumentar la productividad, las fermentaciones de perfusión se realizan como se describe más abajo. Para los procesos de perfusión, las condiciones del proceso se toman del cultivo discontinuo.

Ejemplo 13: Perfusión

Se encontró que la fermentación continua con retención celular (perfusión) permite la fermentación de las células humanas de origen de leucemia mieloide a alta densidad celular junto con buena productividad específica y glicosilación altamente estable.

13.1 Resultados

Con el uso de la centrífuga Centritech Lab, las células crecieron a muy alta viabilidad, y se alcanzaron densidades celulares superiores a 10×10^6 células/ml. Los resultados (ver Fig. 2) demostraron ser altamente reproducibles y no se encontraron heterogeneidades con respecto a la glicosilación del producto (GlycoExpress A hPM). Los procesos se llevaron a cabo durante al menos 300 h de tiempo de cultivo. La productividad específica alcanza un máximo de aproximadamente $100 \mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{d})$ a una velocidad de perfusión de dos volúmenes de biorreactor por día. La productividad específica promedio fue de aproximadamente $70 \mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{d})$ para la escala de fermentación a escala de laboratorio.

Un proceso de perfusión preferido se muestra en la Tabla 2.

Parámetro	Puntos de ajuste y observaciones
pH	7,2 ; CO_2/NaOH ; banda muerta unidades $\pm 0,1$
DOT	40 % saturación de aire, cuatro gases (N_2 , CO_2 , aire comprimido, O_2); mezcla de gases
Temperatura	37°C
tasa de perfusión	0,5-2,5 V/d
Retención celular	centrífuga continua, modo bomba
Agitación	Impulsor de 3 palas
específica Entrada	$0,022 \text{ W}/\text{m}^3$ sin deflectores

Tabla 2: Proceso de perfusión preferido

13.2 Confirmación de la Calidad del Producto en la Fermentación Continua

Como ya se ha visto en las fermentaciones discontinuas, la calidad del producto es notablemente robusta. El producto se analizó bioquímicamente. Con respecto a los multímeros, hay una porción de anticuerpo no monomérico al 3 %, que es comparable a la fermentación discontinua. El antígeno ELISA cumple con la especificación ya que muestra alta unión específica. Adicionalmente, el patrón de glicosilación de GlycoExpress A hPM es similar en las dos corridas de perfusión realizadas independientemente, pero también en comparación con el producto producido por la fermentación con agitación centrífuga/discontinua.

En el SDS-PAGE (condiciones reductoras), hubo bandas claras para la cadena ligera y pesada del anticuerpo separadas. Cadena pesada (= 50kDa) y cadena ligera (= 25kDa) muestran los tamaños como esperado.

13.3 Glicosilación durante la perfusión

Como la glicosilación del producto puede afectarse, por ejemplo cambios en los medios, estrés mecánico o tensión de oxígeno disuelto, durante la fermentación resulta muy importante analizar el desarrollo del patrón de glicosilación. Con

respecto a la robustez del proceso, la glicosilación del producto es uno de los parámetros más importantes a analizar.

Se analizó la glicosilación del producto de las líneas celulares GlycoExpress durante una corrida de perfusión que se realizó a 37 °C, 40 % DOT, pH 7,2 con medio GTM usando GlycoExpress B. El producto se analizó para las muestras tomadas entre el día 3 y día 20 del proceso de perfusión. A pesar de algunas variaciones, el patrón de glicosilación puede considerarse estable.

Concluyendo, no existe variación en la glicosilación durante el proceso. En cuanto a la robustez del proceso y la robustez de la línea celular, la fermentación proporciona una glicosilación estable del producto. La fermentación por perfusión de GlycoExpress A hPM resulta en un producto bioquímico activo altamente puro.

13.4. Conclusión

Un proceso de perfusión para líneas celulares GlycoExpress presenta alta viabilidad celular durante la fermentación de alta densidad. El proceso de perfusión presenta una calidad constante del producto y especialmente un patrón de glicosilación constante. El proceso de fermentación se controla a pH 7,2; DOT 40 % y a una temperatura de 37 °C. La fermentación con células GlycoExpress se puede realizar con una entrada de alta energía (0,022W/m³), ya que las células toleran altas fuerzas de cizallamiento.

Ejemplo 14: Comparación de diferentes métodos de producción

En cuanto a la calidad del producto bioquímico, todos los procesos (con agitación centrífuga, discontinuo, semidiscontinuo (datos no mostrados) y perfusión) proporcionaron un anticuerpo bioactivo similar altamente monomérico. El análisis usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) resultó en una porción de 2-3 % de anticuerpo multimérico. Mientras que el producto de la fermentación discontinua y semidiscontinua mostró aproximadamente un 2 % de multímeros, la perfusión mostró aproximadamente un 3 % de multímero, que es todavía comparable al producto de la agitación centrífuga. Una porción multimérica de 2-3 % puede eliminarse fácilmente durante el procesamiento corriente abajo (DSP), para GlycoExpress A hPM se aplica una columna multimodal de intercambio aniónico. Durante esta etapa de DSP se agotan también la proteína de la célula huésped (hcp) y la albúmina de suero humano (HSA). Los análisis adicionales en SDS-PAGE mostraron una pureza de proteína comparable para todos los procesos. Se analizó el producto en condiciones no reductoras (estructura completa del anticuerpo) y en condiciones reductoras (separación de la cadena pesada y ligera). La identidad de las cadenas de anticuerpos se confirmó mediante transferencia de membrana de tipo Western. En cuanto a la bioactividad, todas las muestras se analizan en un ELISA de unión al antígeno. Las muestras muestran alta unión al péptido MUC1 glicosilado y muy poca al péptido MUC1 no glicosilado, lo cual estuvo de conformidad con la especificación para todos los procesos.

Como una de las características más importantes, la glicosilación de anticuerpos se analizó para el cultivo de agitación centrífuga, discontinuo, semidiscontinuo y de perfusión. El patrón de glicosilación fue muy homogéneo. Debido a la complejidad del perfil de glicanos (ver también la sección 4.5.4) se mide una desviación estándar de +/- 4 %. Por lo tanto, sólo los cambios en la glicosilación > 5 % se consideran significativos.

Resumiendo, el patrón de glicosilación es muy robusto. No cambia en comparación con los cultivos con centrifugación poco agitados y no aireados. Adicionalmente, no parece ser significativamente sensible a las concentraciones celulares o a la viabilidad celular, ya que los procesos con agitación centrífuga, discontinuo, semidiscontinuo y perfusión difieren en esas propiedades (la perfusión muestra mayores concentraciones celulares, el semidiscontinuo muestra viabilidades más bajas en la cosecha). Dado que la calidad del producto es alta para todos discontinuo, semidiscontinuo y perfusión, la elección del proceso de producción puede basarse en la productividad y la consideración económica, puesto que se centra en el desarrollo de un proceso adecuado para BPM.

Ejemplo 15: Escalado

Se encontró que el escalado de procesamiento corriente arriba (> 1000 veces) del cultivo con agitación centrífuga hasta un proceso de producción de BPM proporciona hasta 90 g de anticuerpo purificado sin alterar la calidad del producto y especialmente el perfil de glicosilación.

La fermentación se realizó en diferentes escalas. Para la escala más pequeña (volumen de trabajo 0,6 l) se utilizó un sistema de biorreactor paralelo DASGIP. Los cultivos en escala de volumen de trabajo de 1 l y 10 l se realizan en biorreactores de vidrio Sartorius (B-DCU 2 l, B-DCU 5 l) y un reactor de acero inoxidable Sartorius (C-DCU 10 l). Además, se utilizó un biorreactor de cristal Applikon de 10 l. La escala más grande (100 l) se llevó a cabo en un fermentador de acero inoxidable Applikon de 100 l. En consecuencia, las fermentaciones no sólo se realizaron en cuatro escalas diferentes, sino también en fermentadores de tres compañías diferentes. Se realizó un escalado total de factor 166, usando las siguientes etapas: 1 : 1.5 : 16 : 166. Como fermentadores de diferentes compañías se usan para la fermentación, que muestran características diferentes en cuanto a propiedades geométricas, aireación y agitación, el escalado se vuelve aún más crítico.

15.1 Condiciones de escalado

Al realizar el escalado, las células tienen que ser especialmente robustas con respecto a las fuerzas de cizallamiento. Dado que las células no sufren daños por las fuerzas de cizallamiento cuando se usan 400 rpm en un recipiente Sartorius de 2 l, se eligió la entrada de energía para que fuera un criterio del escalado porque las células parecen ser altamente resistentes a la fuerza de cizallamiento. En consecuencia, se selecciona que la entrada de energía específica (entrada de energía por volumen) sea constante en todos los diferentes tamaños de fermentadores. Una vez seleccionada la entrada de energía como criterio de escalado, se selecciona una entrada de energía específica de aproximadamente $P_{sp} = 0,02 \text{ W/kg}$. Esto equivale a una velocidad del agitador de 300 rpm en un fermentador Sartorius 2 l. Esta velocidad del agitador muestra excelentes propiedades de mezclado y homogeneización.

Aunque la similitud geométrica es normalmente una precondition importante para el escalado, el escalado exitoso puede realizarse en recipientes muy diversos. En la Tabla 6 se muestran los resultados del escalado exitoso usando la entrada de energía como criterio. Además del fermentador Applikon 10 l, todos los fermentadores pueden soportar una entrada de energía específica similar. Debe tenerse en cuenta que ambos fermentadores Applikon usan la máxima velocidad de agitación posible (rpm). Por lo tanto, no es posible funcionar el Applikon 10 l con las mismas velocidades de entrada de energía específicas que los otros fermentadores.

	DASGIP 0,6 l	B-DCU 1 l	B-DCU 5 l	C-DCU 10 l	Applikon 10 l	Applikon 100 l
D_t [m]	0,125	0,130	0,160	0,215	0,222	0,491
D_i [m]	0,055	0,054	0,070	0,110	0,074	0,234
Ángulo	+30°	+30°	+30°	+30°	-45°	-45°
rpm [1/min]	250	300	300	200	200	125
Volumen [l]	2	3	5	15	15	130
volumen máximo [l]	1,5	2	5	10	10	100
volumen mínimo [l]	0,4	0,6	1	4	4	30
volumen de trabajo [l]	0,6	1	5	10	10	100
número de agitadores	1		2	2	1	1
H [m]	0,210	0,170	0,255	0,315	0,245	0,593
H_t [m]	0,175	0,13	0,08	0,155	0,21	0,393
H_i [m]			0,13	0,11		
H_b [m]	0,035	0,04	0,045	0,05	0,035	0,2
D_i/D_t	0,44	0,42	0,44	0,51	0,33	0,48
H/D_i	3,82	3,15	3,64	2,86	3,31	2,53
H/D_t	1,68	1,31	1,59	1,47	1,10	1,21

Tabla 3: Propiedades geométricas de los recipientes de fermentación empleados. Agitación del agitador [rpm] basado en la entrada de energía constante para la mayoría del volumen de trabajo común. Leyenda: D_i : diámetro del agitador; D_t : diámetro del fermentador; H: altura del fermentador; H_t : distancia del agitador superior a la superficie del líquido; H_i : distancia entre agitadores; H_b : distancia por debajo del agitador inferior.

Como la entrada de energía se mantiene constante durante el escalado (excepto Applikon 10 l debido a las limitaciones de diseño), las fuerzas de cizallamiento aumentan durante el escalado. Las fuerzas de cizallamiento calculadas [N/m^2] se muestran en la Tabla 4. Se calculan las fuerzas de cizallamiento máximas para la punta del agitador, ya que esta área se considera como la región de mayor disipación de energía. Como el crecimiento celular no parece afectarse y la viabilidad no disminuye con escalas crecientes del reactor, las células GlycoExpress A hPM son resistentes al cizallamiento al menos $0,9 \text{ N/m}^2$ de agitación permanente indujo tensión de cizallamiento. Esto equivale a un aumento de al menos 10 veces de la resistencia al cizallamiento en comparación con las células CHO, que reciben daño a velocidades de cizallamiento de $0,1 \text{ N/m}^2$ [Motobu y otros 1998].

		DASGIP 1l	B-DCU 1l	B-DCU 5l	GDCU 10l	Applikon 10l	Applikon 100l
5	Entrada de energía específica [W/kg]	0,021	0,020	0,023	0,021	0,003	0,022
	Velocidad de punta [m/s]	0,72	0,85	1,10	1,15	0,77	1,53
	Velocidad de cizallamiento de la punta [l/s]	457	492	637	818	550	1375
10	Tiempo de mezcla [s]	2,87	2,77	2,43	2,43	7,32	4,67
	Tiempo de circulación [s]	1,05	0,99	0,89	0,97	2,30	1,80
	Fuerza de cizallamiento [N/m ²]	0,30	0,32	0,45	0,53	0,36	0,90
15	Reynolds	19184	22192	37291	61390	27783	173630

20 Tabla 4: Resultado del escalado para diferentes fermentadores que muestran propiedades de cizallamiento y mezcla. Los cálculos se realizan para la configuración del biorreactor como se muestra en la Tabla 6.

15.2 Comparación de diferentes escalas

25 La fermentación por perfusión se llevó a cabo usando la fermentación en una escala de 1 litro, 10 litros y 100 litros. La Figura 3 muestra resultados ilustrativos para tres fermentaciones similares de GlycoExpress A hPM controladas a 37 °C, pH 7,2 y un DOT de 40 %. La fermentación se realiza en perfusión aplicando una estrategia de alimentación similar a la mostrada en la figura 3 (D). Las tasas de perfusión se establecen dependiendo del consumo de glucosa.

30 Existen varias diferencias entre el proceso a escala de laboratorio y la escala de producción de 100 l con respecto al crecimiento y la productividad. En comparación con una fermentación a escala menor (volumen de trabajo 1 l) en el que se alcanzan concentraciones máximas de células > 10⁶ células/ml, las células no crecen a concentraciones mayores que 6 * 10⁶ células/ml en 10 l y 100 l de perfusión. A continuación, hay menos consumo de glucosa con escala creciente y la concentración de glucosa se mantiene por encima de 1,5 g/l para la escala de 100 l. En las fermentaciones a
35 pequeña escala, donde las células suelen crecer a concentraciones más altas, la glucosa se consume a concentraciones inferiores a 1 g/l.

A diferencia de viabilidades y concentraciones de células viables diferentes, hay casi el mismo nivel de productividad en todas las escalas. Todas las fermentaciones tienen una productividad máxima > 100µg/(mld) y también muestran una
40 curva de productividad muy comparable.

En resumen, el escalado proporciona un proceso que es capaz de producir grandes cantidades de producto. Las concentraciones de productos son similares en todas las escalas. La productividad máxima es > 100 µg/(mld). Sin embargo, hay una disminución significativa en la viabilidad y la concentración máxima de células que se reconocen en el
45 escalado creciente. Con respecto a la concentración celular máxima, la retención celular de la centrifuga tiene un efecto significativo. Mientras que está > 99 % a escala del laboratorio, cae a aprox. 90 % en escalas de producción. Esto resulta en un sangrado constante que conduce a una reducción de la concentración celular máxima.

15.3 Perfusión a gran escala

50 Las operaciones de perfusión a gran escala se llevan a cabo en un fermentador Applikon de 100 l. Con el uso de la perfusión, se usan hasta 250 l de medios/día cuando se trabaja con 100 l de volumen de trabajo. La Figura 4 muestra los resultados de tres corridas de perfusión de 100 l comparables, que se realizan bajo condiciones de BPM. Esas fermentaciones son altamente reproducibles. Todas las fermentaciones se realizaron usando las condiciones del
55 proceso de perfusión establecidas (ver anteriormente). Las tres fermentaciones muestran un comportamiento similar con respecto a la productividad y al crecimiento celular. La concentración máxima de células alcanza un máximo de 6 * 10⁶ células/ml y disminuye significativamente después. En la última etapa de la perfusión se obtienen densidades de células de aproximadamente 3-4 * 10⁶ células/ml. Por consiguiente, como el crecimiento celular está estrechamente ligado a la productividad, también hay un máximo en la productividad específica. Los picos de productividad específicos están a
60 aproximadamente 100 µg/(ml * d). Durante la etapa tardía, la productividad específica cae a < 40µg/(ml * d). En cuanto a la viabilidad, las fermentaciones se inician a > 90 %, pero disminuyen hasta aproximadamente 80 % al inicio de la perfusión.

El patrón de glicosilación fue constante para las tres fermentaciones dentro de las fluctuaciones de medición.

15.4 Conclusiones del escalado

El escalado se aplicó al proceso de perfusión usando la centrífuga continua Centritech. El equipo de fermentación proporciona ciertas limitaciones, por ejemplo diferentes tipos de biorreactores usando diferentes configuraciones de aireación, diferentes propiedades geométricas, limitaciones en agitación (velocidad, número de agitadores). Como las células resultan altamente resistentes a la fuerza de cizallamiento, la entrada de energía se utiliza como criterio de escalado. Esto resulta en un aumento de las fuerzas de cizallamiento inducidas por el agitador con un aumento del tamaño del fermentador, pero proporciona suficiente mezcla a escala de laboratorio. No obstante, el escalado produjo cultivos de alta densidad altamente viables con una glicosilación constante del producto. La calidad del producto (medido por SEC, bioensayo, perfil de glicanos) generalmente no se altera con el escalado. Las fermentaciones se realizan con éxito para la producción de hasta 90 g de anticuerpo (cantidad antes del procesamiento corriente abajo). Se demostró a través de la evaluación cualitativa y cuantitativa del desempeño de los biorreactores de 1 l, 10 l y 100 l, así como a través de un panel de pruebas de caracterización bioquímica, que se mantuvo bien la comparabilidad del proceso y del producto durante el proceso de escalado.

Ejemplo 16: Medios de cultivo

Las células se cultivaron en suspensión usando diferentes medios. Los medios utilizados principalmente son: x-Vivo20 (Lonza, Bélgica), GTM-1 (Biochrom, Alemania), GTM-2 (Biochrom, Alemania), GTM-3 (Biochrom, Alemania), GTM-4 (Biochrom, Alemania), GTM-5 (Biochrom, Alemania), GTM-6 (Biochrom, Alemania), GTM-7 (Biochrom, Alemania), GTM-8 (Biochrom, Alemania) y medio alimentado con GTM (Biochrom, Alemania). Los medios se basan en un medio basal, y se suplementaron con nutrientes adicionales. La nomenclatura general de los medios GTM se da en la Tabla 6.

Nombre	Observación
GTM-1	Medios basales en polvo con otros aditivos
GTM-2	Como GTM1 con osmolaridad reducida debido a un menor contenido de glucosa 4,5 g/l
GTM-3	Medios de investigación como GTM-2 sin Glc/Gln/HSA
GTM-4	Medios con bajo contenido de HSA (0,002%), composición remanente como GTM-2
GTM-5	Como GTM2, basado en el componente único.
GTM-6	Medios con bajo contenido de HSA (0,002%), composición remanente como GTM-5
GTM-7	Medios libres de lípidos basado en GTM-5
GTM-8	Medios con bajo contenido de HSA (0,002%), composición

Como se explicó anteriormente, la entrada de energía se usa preferentemente como criterio de escalado. La siguiente ecuación muestra la fórmula básica para el cálculo de la entrada de energía (P) dependiendo de la velocidad del agitador (N), del diámetro del agitador (di), de la densidad del medio (p) y de una constante del agitador (Ne).

$$P = N_e \rho N^3 d_i^5$$

Teóricamente, la velocidad del agitador durante el escalado puede mantenerse constante, si la relación del diámetro del impulsor a diámetro del recipiente ($d_i = d_t$) se mantiene constante. Sin embargo, en la mayoría de los casos esto no es posible debido a las dimensiones del recipiente del biorreactor. Para correlacionar la entrada de energía con el volumen de fermentación, se puede calcular la entrada de energía específica (Pespec). La entrada de energía específica es un criterio de escalado ampliamente usado. Para aplicarlo a un proceso, las células deben ser bastante insensibles a las fuerzas de cizallamiento, que aumentan con el volumen del biorreactor (V). La siguiente ecuación muestra el cálculo de la entrada de energía específica.

$$P_{\text{espec.}} = \frac{P}{V}$$

La velocidad de la punta aumenta linealmente con el diámetro del agitador y la velocidad de agitación. Por lo tanto, una velocidad de punta constante (vTip) resulta en una disminución de rondas por minuto (rpm) en un recipiente grande. Esto depende directamente de los diámetros mayores del agitador en grandes recipientes. Posiblemente, no hay suficiente entrada de energía que puede resultar en una mezcla pobre o incluso sedimentación celular. En consecuencia, el escalado con la velocidad de cizallamiento de la punta del agitador constante sólo puede aplicarse a las células extremadamente sensibles al cizallamiento. La siguiente ecuación muestra el cálculo de la velocidad de la

punta del agitador dependiendo del diámetro del agitador y de la velocidad del agitador.

$$v_{Tip} = \pi d_i N$$

En un biorreactor, surgen fuerzas de cizallamiento máximas en el lado exterior del agitador. Por lo tanto, la velocidad de cizallamiento

$$\gamma \quad ([\dot{\gamma}] = 1/s)$$

debe calcularse en la punta del agitador usando la fórmula anterior. La velocidad de cizallamiento depende de la velocidad de agitación (N), del diámetro del agitador (di) y de la viscosidad cinemática (v). En este trabajo se asume que la viscosidad cinemática es constante a pesar de que las altas concentraciones celulares pueden aumentarla.

$$\gamma = 3,3 \left(\frac{N d_i^2}{\nu} \right)^{0,5} N^1$$

Con el uso de la velocidad de cizallamiento de la punta del agitador a medida que los criterios del escalado aumentan la velocidad de agitación decrece (rpm) con el aumento del tamaño del fermentador. Como se mencionó anteriormente, puede producirse una mezcla pobre o incluso la sedimentación celular. En consecuencia, el escalado con la velocidad de cizallamiento de la punta del agitador constante se prefiere con las células extremadamente sensibles al cizallamiento. Las células que se usan de conformidad con la presente invención son resistentes al cizallamiento.

Reivindicaciones

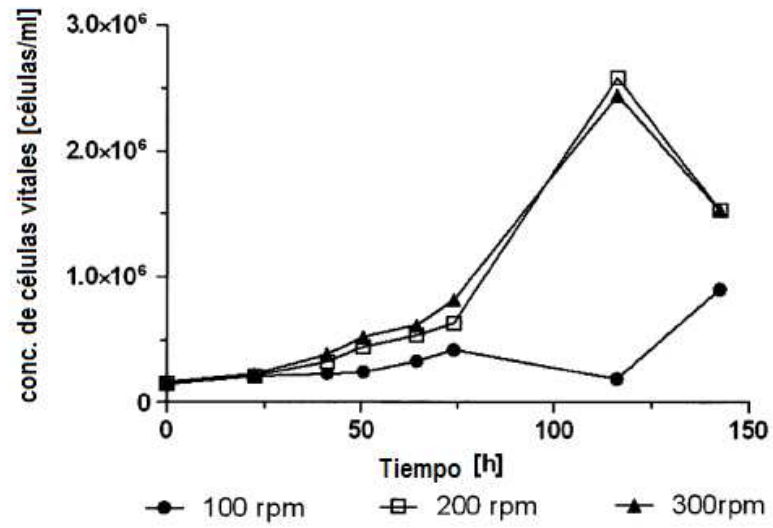
1. Un método para cultivar una suspensión de células sanguíneas humanas inmortalizadas de origen de leucemia mieloide humana o células derivadas de las mismas, en donde dicha suspensión se agita tal que la entrada de energía específica resultante es al menos 0,005 W/kg.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha suspensión se agita con una intensidad que es adecuada para permitir un suministro exclusivo de flujo de gas de dicha suspensión.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha suspensión se agita tal que la fuerza de cizallamiento resultante es de al menos 0,1 N/m².
4. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se usa un agitador para la agitación, y dicha suspensión se agita tal que la velocidad de cizallamiento resultante en la punta del agitador es de al menos 300 s⁻¹.
5. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichas células se suministran con al menos un gas por flujo exclusivo.
6. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichas células se suministran con al menos un gas a una velocidad de flujo de como máximo 0,05 l/h por litro de volumen del reactor.
7. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el suministro de gas tiene una velocidad de flujo máxima de 0,05 vvm o menos.
8. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la entrada de energía específica para la agitación de la suspensión es de al menos 0,01 W/kg y el suministro de gas se logra por flujo exclusivo de gas.
9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde el flujo de gas máximo es de 0,05 vvm o menos.
10. Un método para la producción recombinante de un producto de interés en las células de sangre humana inmortalizada de origen de leucemia mieloide humana o células derivadas de las mismas, en donde dichas células comprenden un gen que codifica el producto de interés y en donde dichas células se cultivan de conformidad con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde el producto de interés expresado se obtiene a partir del cultivo celular.
12. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde el producto de interés se purifica a partir del medio de cultivo celular.
13. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células de leucemia mieloide humana son células K562 o células derivadas de las mismas.
14. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células se cultivan mediante fermentación continua con retención celular (perfusión).
15. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa una centrífuga continua para perfusión.
16. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células se eliminan durante el cultivo.
17. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la densidad celular en el cultivo celular alcanza al menos 1x10⁶ /ml.
18. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la viabilidad celular en el cultivo celular es al menos 70 %.
19. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fermentación tiene una productividad máxima de al menos 80 µg/(mld).
20. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se utiliza un

agitador para la agitación.

21. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se utiliza un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en un rociador en anillo, un micro-rociador y una membrana para la aireación.
22. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde para la aireación, se dan pulsos de al menos un gas durante el proceso de cultivo.
23. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el desarrollo de burbujas causado por la aireación está limitado por el método de aireación elegido.
24. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde para la aireación se suministra oxígeno puro.
25. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se determina el valor de oxígeno en el cultivo de células y se introduce oxígeno y/o un gas o mezcla de gas que contiene oxígeno como un pulso en el medio de cultivo celular si el nivel de oxígeno cae por debajo de un nivel predeterminado.
26. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se añade una base durante el cultivo para mantener el pH a un nivel o rango de pH predeterminado.
27. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formación de agregados celulares se reduce en oposición a un método correspondiente que comprende ninguna de las características definidas en las reivindicaciones 1 a 6.
28. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medio de cultivo celular comprende un agente protector de cizallamiento.
29. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células se cultivan en un medio libre de suero.
30. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cultivo celular se realiza a un intervalo de pH entre 6,5 y 8; una pO_2 de 30 % a 50 % y/o una temperatura de 30 a 40 °C.
31. El método de conformidad con la reivindicación 30, en donde el cultivo celular se realiza a un intervalo de pH entre 7 y 7,5; una pO_2 de 35 % a 45 % y/o una temperatura de 37 °C.
32. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la estructura de glicosilación de una glicoproteína de interés y/o la velocidad de producción de las células no se afecta sustancialmente por el volumen de cultivo.
33. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa un fermentador para cultivo celular que tiene un volumen de al menos 1 l a 1000 l.

Fig. 1

A



B

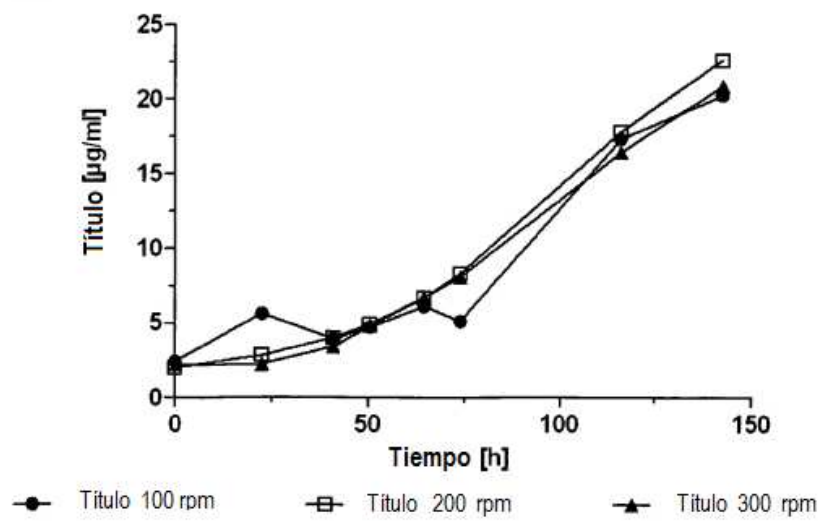


Fig. 1 - continuación

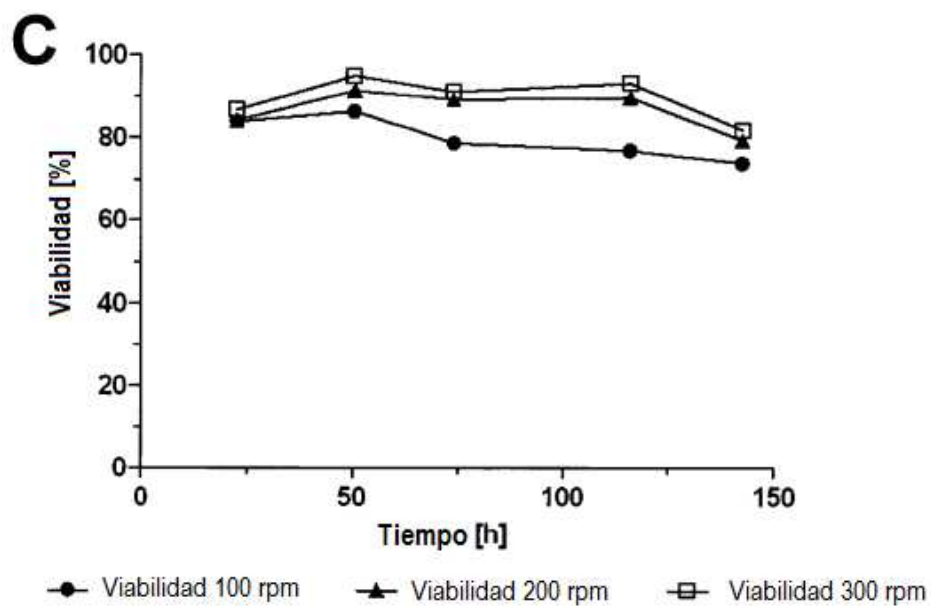
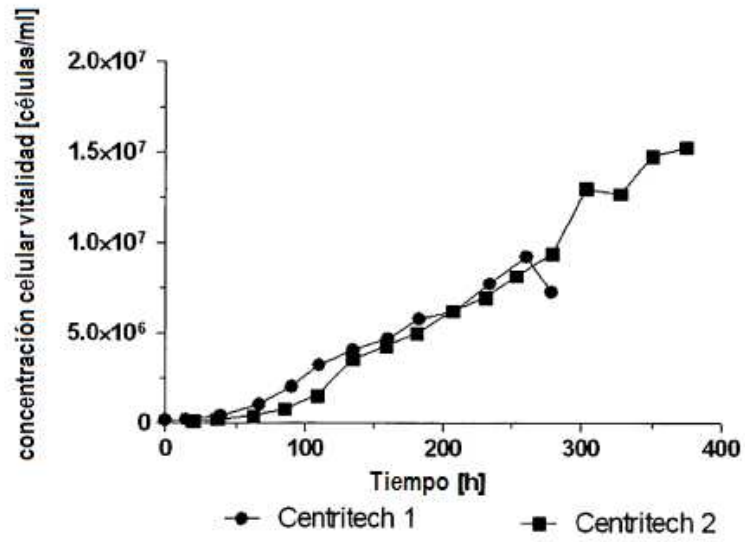


Fig. 2

A



B

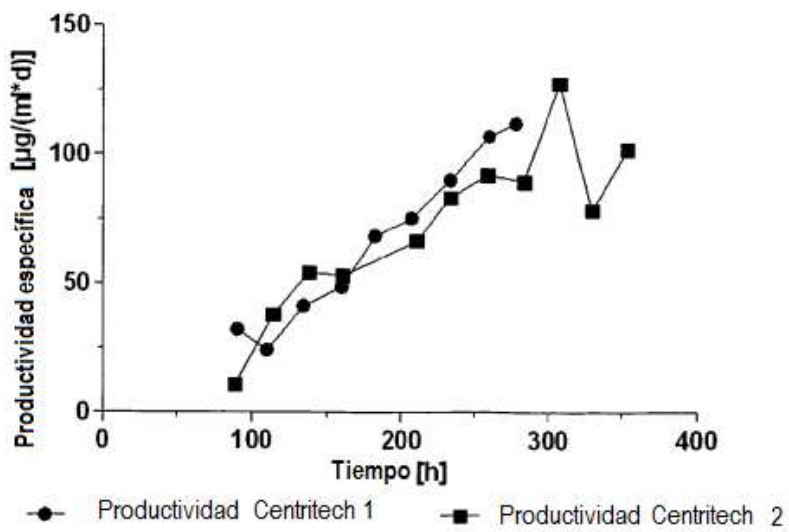
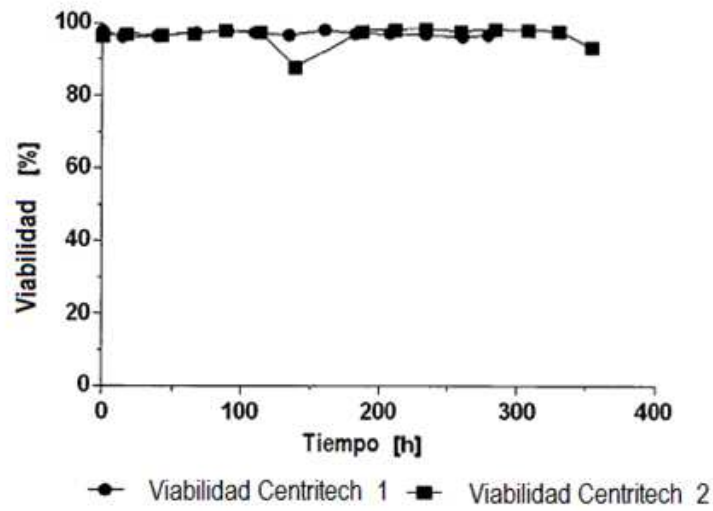


Fig. 2 - continuación

C



D

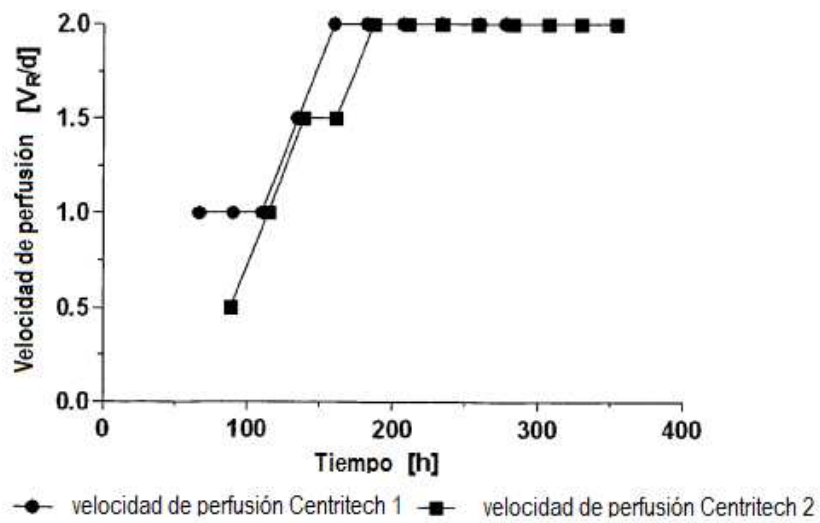


Fig. 2 - continuación

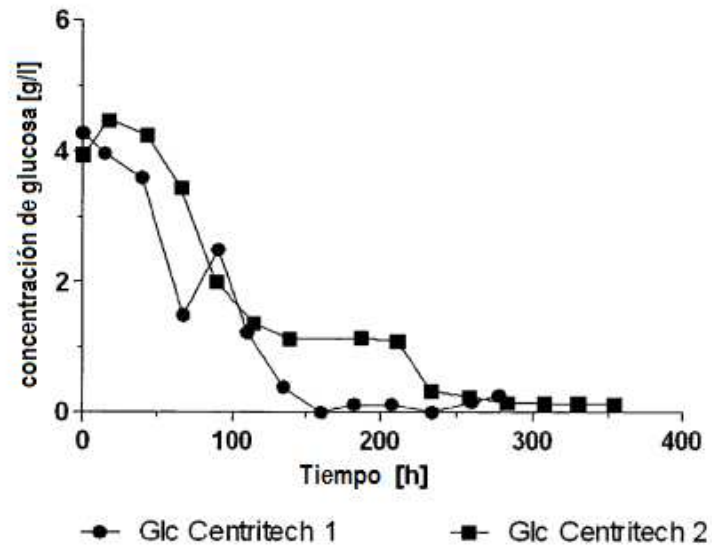
E

Fig. 3

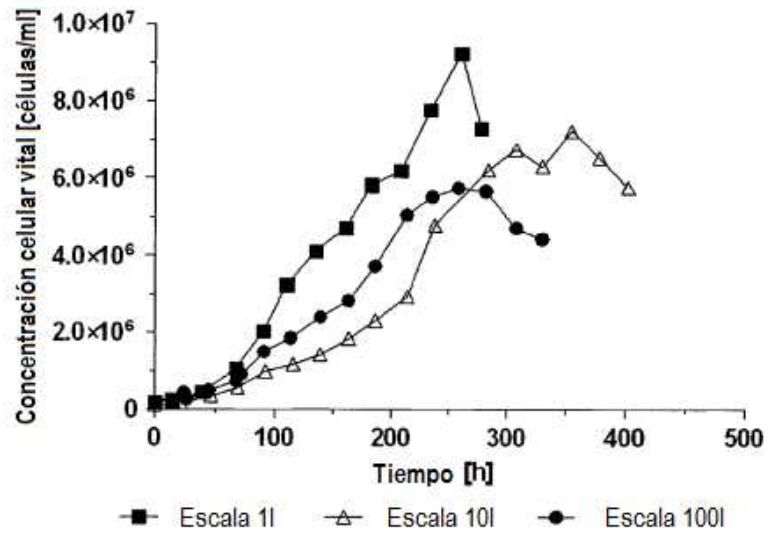
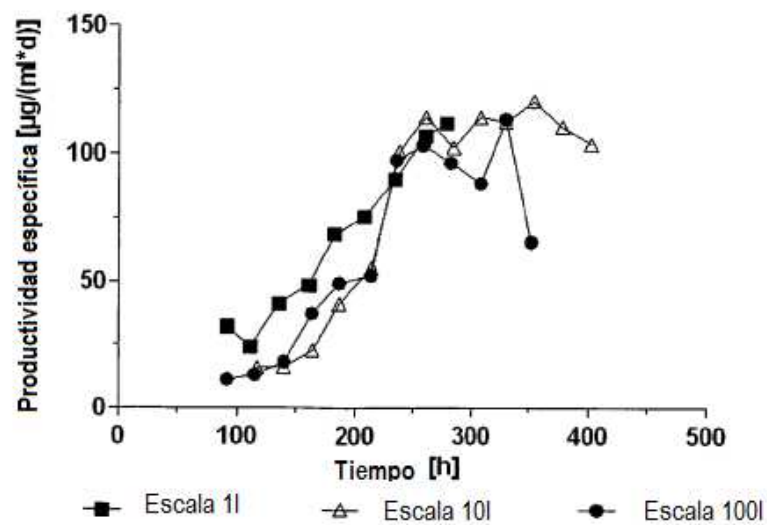
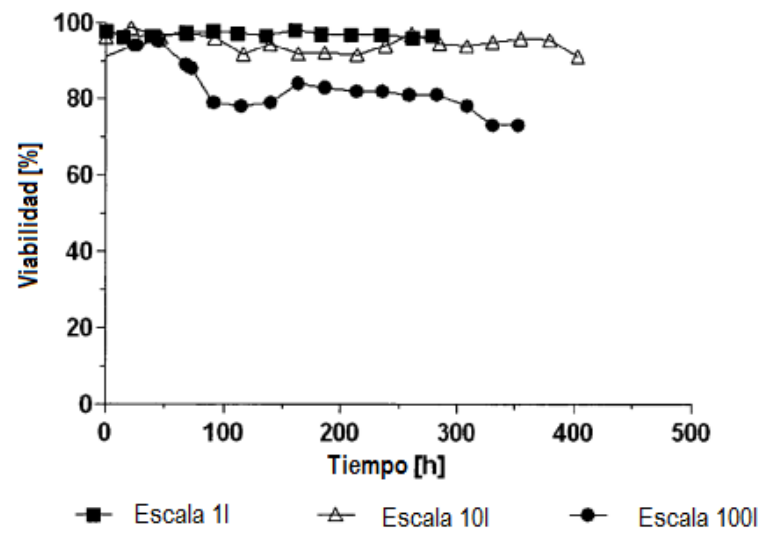
A**B**

Fig. 3 - continuación

C



D

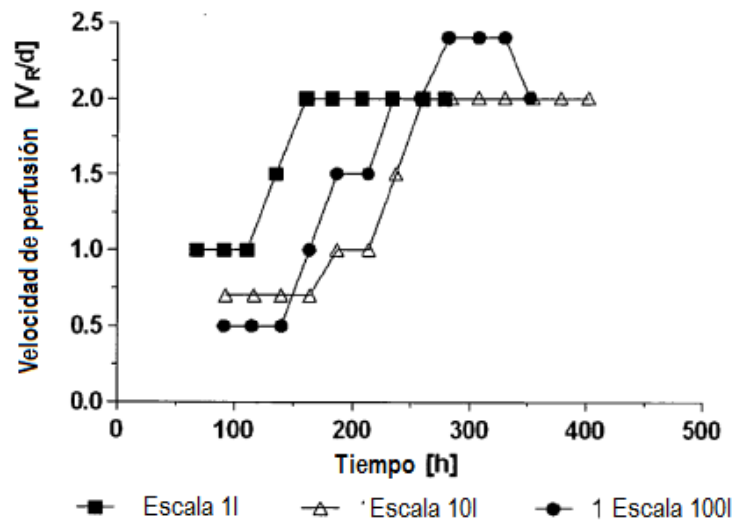


Fig. 3 - continuación

E

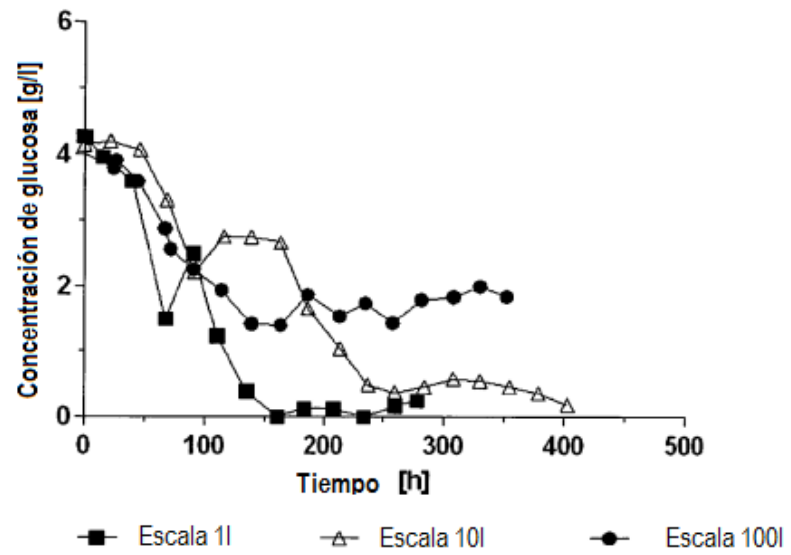


Fig. 4

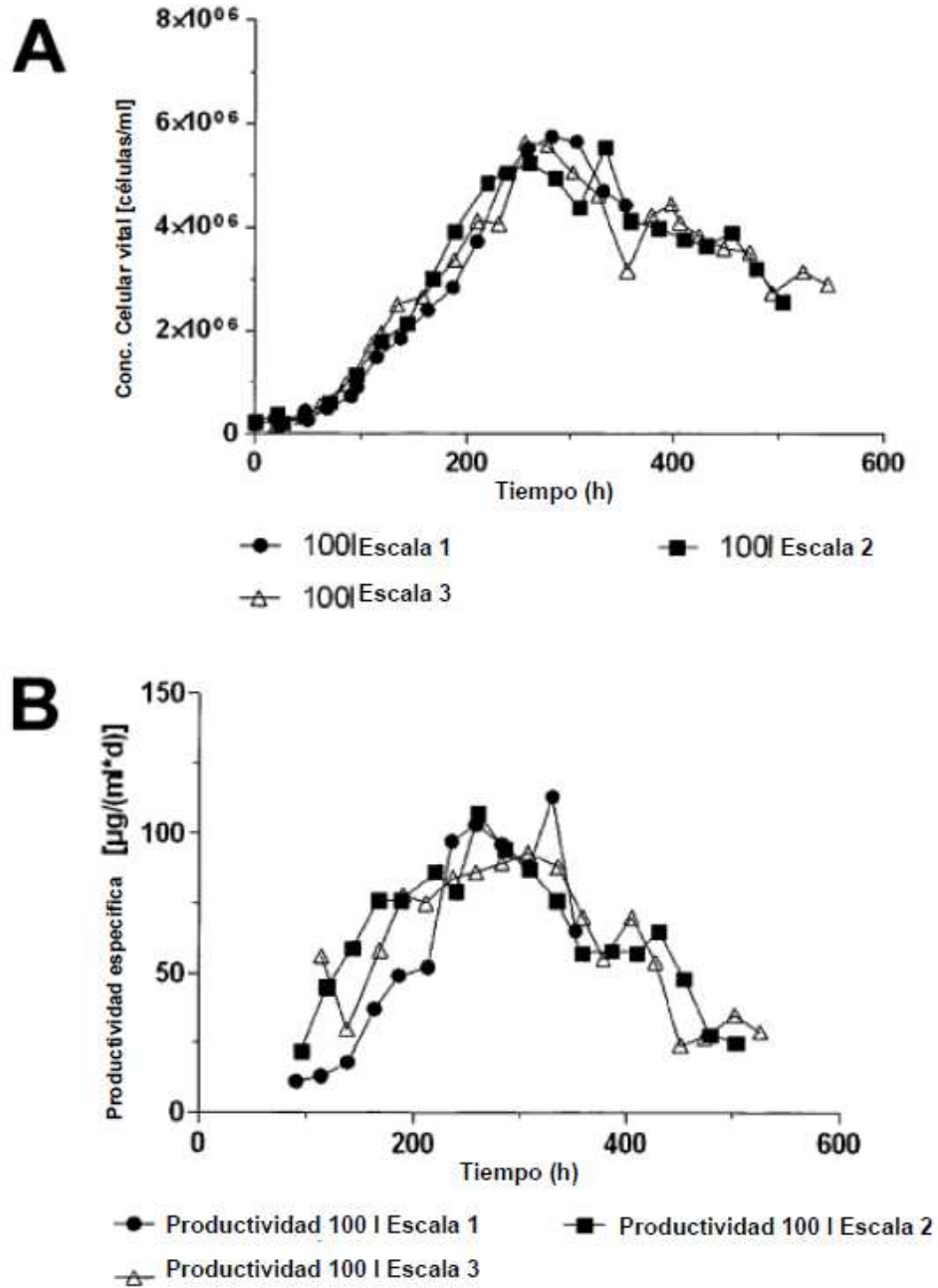


Fig. 4 - continuación

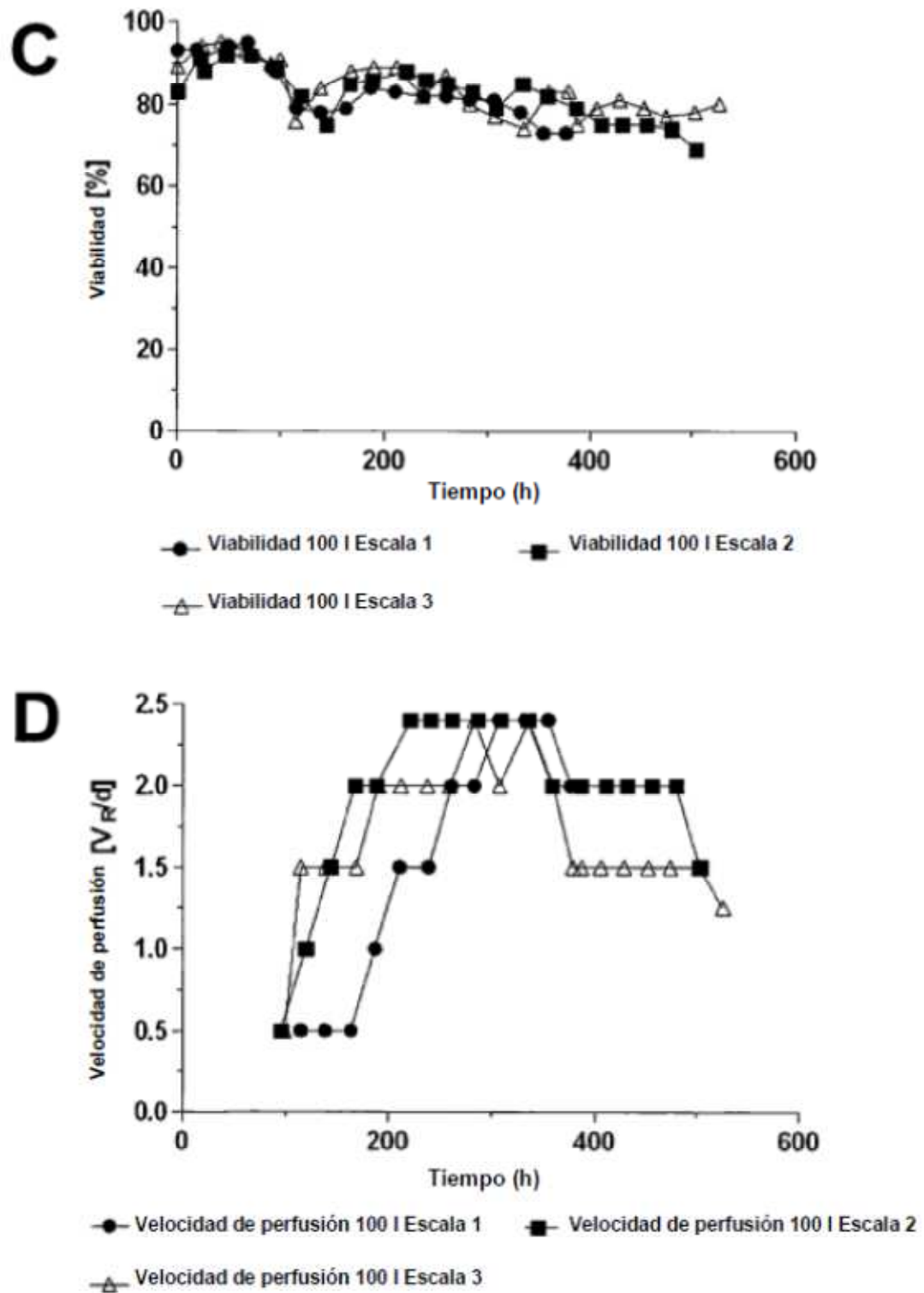


Fig. 4 - continuación

