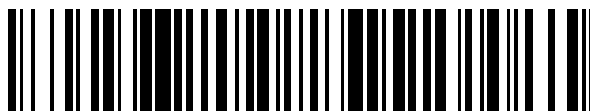


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 060**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2013 PCT/US2013/046756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192395**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2013 E 13733496 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2864471**

54 Título: **Procedimientos para la inactivación vírica y otros agentes adventicios**

30 Prioridad:

20.06.2012 US 201261662349 P
15.03.2013 US 201313844051

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

SHIRATORI, MASARU, KEN;
KISS, ROBERT, DAVID;
PRASHAD, HARDAYAL;
IVERSON, RAQUEL;
BOURRET, JUSTIN;
KIM, MICHAEL y
CHARANIYA, SALIM

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 625 060 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

Procedimientos para la inactivación vírica y otros agentes adventicios

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención proporciona procedimientos de inactivación vírica utilizando un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) y el ajuste de diversos parámetros para reducir y/o minimizar la generación y el depósito de precipitados.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus son potenciales contaminantes en los procesos de fabricación de medicamentos, en particular, en los casos en que los fármacos biológicos proceden de cultivos de células de mamíferos. Una fuente de contaminantes víricos puede ser el medio utilizado para el cultivo celular o las líneas celulares que producen los productos biológicos de interés. Los enfoques actuales para prevenir la contaminación vírica de los fármacos biológicos durante el proceso de fabricación incluyen el tratamiento del medio de cultivo celular rápido a alta temperatura (HTST) para la inactivación de los virus que se pueden introducir en el medio de cultivo celular a través de las materias primas y que se multiplican durante el proceso de cultivo (Schleh, M. *et al.* 2009. *Biotechnol. Prog.* 25(3):854-860 y Kiss, R. 2011. *PDA J Pharm Sci and Tech.* 65:715-729). Se ha informado de que se requieren temperaturas superiores a aproximadamente 85 °C para que el tratamiento HTST sea un procedimiento eficaz de inactivación de virus, con temperaturas superiores a aproximadamente 95 °C necesarias para inactivar el parvovirus, un contaminante vírico común de cultivos celulares que se ha documentado que aparece en los procesos de cultivo celular, y que es resistente a muchos agentes químicos y físicos de inactivación (Schleh *et al.*).

Aunque el tratamiento HTST ha demostrado ser muy eficaz en la inactivación de virus, en diversos medios de cultivo celular se puede producir precipitación o formación de precipitados cuando se someten a este tratamiento. Dicha precipitación conduce a una acumulación de residuos sobre las superficies del sistema HTST y puede contribuir a ensuciar el equipo de modo que ya no pueda calentar el medio a la temperatura objetivo para una adecuada inactivación de los contaminantes víricos. Además, dicha precipitación también puede ensuciar los filtros usados típicamente corriente abajo del sistema HTST durante el procesamiento final para eliminar microorganismos, tales como bacterias, del medio. Dicho ensuciamiento del filtro puede hacer que resulte imposible completar la etapa de procesamiento del medio antes del proceso de cultivo celular. En algunos casos, el precipitado también puede afectar al rendimiento del medio de cultivo celular y prevenir la producción eficiente de fármacos biológicos a partir de las líneas celulares cultivadas. Para evitar la precipitación se puede reducir la temperatura, pero esto puede afectar negativamente al éxito de la inactivación vírica. Además, la formación de precipitado durante el tratamiento HTST del medio celular puede dar como resultado la necesidad de limpiar o reparar con frecuencia el equipo utilizado para el tratamiento HTST durante el proceso de fabricación, lo que contribuye significativamente al coste de procesamiento. Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos para prevenir la formación de precipitado durante el tratamiento HTST sin afectar negativamente a la eficacia de este tratamiento en la eliminación o inactivación de contaminantes víricos.

La invención descrita en el presente documento aborda estas necesidades proporcionando procedimientos para inactivar eficazmente los contaminantes víricos en medios de cultivo celular utilizando el tratamiento HTST con los parámetros de procesamiento ajustados para poder reducir o evitar la formación de precipitados.

45 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona procedimientos, procesos, sistemas y composiciones para inactivar la contaminación vírica y/u otros contaminantes en medios de cultivo celular mediante el uso de un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) en combinación con el ajuste de varios parámetros, tales como el pH y/o la concentración de calcio y/o fosfato en el medio de cultivo. Además, también se divulgan procedimientos, procesos, sistemas y composiciones que reducen el ensuciamiento del equipo y los filtros utilizados para el tratamiento HTST.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona procedimientos para la inactivación de virus o bacterias en medios de cultivo celular mientras se mantiene la idoneidad de los medios para el cultivo celular, en donde dicho procedimiento comprende (a) someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST); y (b) ajustar uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en nivel de pH, calcio y fosfato, con lo que se suprime la formación de precipitado, en el que el tratamiento HTST comprende elevar la temperatura del medio hasta al menos aproximadamente 85 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar virus o bacterias presentes en el medio,

a) en el que el pH se ajusta cuando el medio comprende calcio y fosfato, el pH se ajusta a un nivel bajo adecuado durante la preparación del medio antes del tratamiento HTST, y el pH se ajusta después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular;

b) en el que el nivel de calcio se ajusta cuando el medio comprende fosfato, el nivel de calcio se reduce de modo que

se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato, y el nivel de calcio se ajusta después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular; o

b) en el que el nivel de fosfato se ajusta cuando el medio comprende calcio, el nivel de fosfato se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato, y el nivel de fosfato se ajusta después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular.

En otros aspectos, la invención proporciona procedimientos para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprenden someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprenden someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST. En otros modos de realización, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los modos de realización, el tratamiento HTST comprende elevar la temperatura del medio hasta al menos aproximadamente 85 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus o virus potenciales presentes en el medio. En algunos modos de realización, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 93 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus o virus potenciales presentes en el medio. En algunos modos de realización, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 95, 97, 99, 101 o 103 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus o virus potenciales presentes en el medio. En algunos modos de realización, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos. En algunos modos de realización, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente 6,9 a 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprenden limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos. En algunos modos de realización, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se incrementa a continuación hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de proteínas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus, en donde el procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST. En cualquiera de los modos de realización, el tratamiento HTST comprende elevar la temperatura del medio hasta al menos aproximadamente 85 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En algunos modos de realización, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 93 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En algunos modos de realización, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 95, 97, 99, 101 o 103 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio.

En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus, en donde el procedimiento comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST. En cualquiera de los modos de realización, el virus se selecciona del grupo que consiste en *Parvoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae* y *Picornaviridae*. En cualquiera de los modos de realización, el virus es un virus con envoltura. En cualquiera de los modos de realización, el virus es un virus sin envoltura.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** es un esquema de un skid HTST representativo utilizado en la fabricación.

La **Figura 2** es una gráfica que representa perfiles de calentamiento del procedimiento en baño de arena y del tratamiento HTST en el punto de ajuste objetivo de 102 °C. Las líneas muestran los perfiles de calentamiento en

minutos, donde el punto final de cada línea viene descrito por el tiempo y la temperatura en el punto final (por ejemplo, valor de punto final "6,2;102" = el punto final a 6,2 minutos estaba en 102 °C).

La **Figura 3** es una imagen de muestras de medios conocidos por precipitar durante el tratamiento HTST después del tratamiento térmico por el procedimiento en baño de arena. **A)** Muestras no centrifugadas del Medio 1 a pH 7,0 o pH 6,4 y del Medio 2 a pH 7,0 o pH 6,7 en recipientes a presión sometidos a tratamiento térmico. **A)** Alícuotas centrifugadas del Medio 1 a pH 7,0 o pH 6,4 y del Medio 2 a pH 7,0 o pH 6,7 procedentes de recipientes a presión sometidos a tratamiento.

La **Figura 4** muestra estimaciones de parámetros seleccionados de formulaciones de medios basados en el Medio 4 para parámetros que se correlacionan con un mayor nivel de turbidez de la muestra tratada en baño de arena.

La **Figura 5** es una serie de gráficos que representan la superficie de respuesta de precipitación, medida a partir de la turbidez (NTU) desde 3 perspectivas para formulaciones basadas en el Medio 4 con niveles variables de calcio, fosfato y pH durante el tratamiento térmico en baño de arena. Las porciones de cada plano de perspectiva en donde la cuadrícula es visible muestran una región en la que la turbidez fue inferior a 5 NTU, en correlación con la ausencia de precipitación visible en las muestras de medios sometidas a pruebas y representan un régimen de funcionamiento seguro. **A)** Vista lateral del gráfico que muestra las mediciones de turbidez en medios con concentraciones variables de fosfato y de calcio. Vista superior del gráfico que muestra las mediciones de turbidez en medios con **B)** concentraciones variables de fosfato y de calcio, **C)** concentraciones variables de fosfato y diferentes niveles de pH, y **D)** concentraciones variables de calcio y diferentes niveles de pH.

La **Figura 6** es un gráfico que representa formulaciones de medios situados en la superficie de respuesta del Medio 4 para pH 7,0 con respecto a sus concentraciones conocidas y estimadas de calcio y de fosfato. Independientemente de las otras diferencias de composición entre todas las formulaciones, las concentraciones de calcio y de fosfato están fuertemente correlacionadas con el potencial de precipitación tras el tratamiento térmico. La flecha indica el desplazamiento de un medio en el régimen de precipitación debido a la adición de hidrolizado que contiene niveles adicionales de fosfato y/o calcio.

La **Figura 7** representa un gráfico con el perfil de calentamiento promedio para cuatro formulaciones de medios en el sistema de baño de arena. Se tomaron cinco puntos finales diferentes de temperatura (indicados mediante 2 números, donde, por ejemplo, "2,5;75,9" = muestras tomadas tras 2,5 minutos con una temperatura promedio resultante de 75,9 °C). Las fotografías de la derecha incorporan círculos rellenos o vacíos que se correlacionan con la precipitación visible observada en muestras no centrifugadas o centrifugadas. Círculo vacío = no se detectó precipitación por el procedimiento visual en muestras no centrifugadas o centrifugadas. Círculo relleno = se detectó precipitación por el procedimiento visual en una o ambas muestras.

La **Figura 8** es un gráfico que representa los valores de turbidez (NTU) de las muestras en 5 puntos finales de temperatura diferentes tomadas de 4 formulaciones de medios diferentes. Los valores de turbidez mayores de ~8 NTU se correlacionan con la identificación de precipitación visible mediante inspección visual directa o inspección de muestras centrifugadas.

La **Figura 9** es una serie de gráficos que muestran la pérdida de hierro (gráfica de la izquierda) y de cobre (gráfica de la derecha) tras el tratamiento HTST cuando las operaciones de procesamiento HTST y filtración tuvieron éxito.

La **Figura 10** es una serie de gráficos que muestran representaciones de los principales efectos sobre la recuperación de hierro en función de la variación de **A)** los niveles de pH, **B)** las concentraciones de calcio (Ca), **C)** las concentraciones de fosfato (PO₄), **D)** las concentraciones de hierro (Fe) y **E)** las concentraciones de cobre (Cu) durante el tratamiento térmico.

La **Figura 11** representa una serie de gráficos que demuestran la interacción a partir de los resultados de experimentos diseñados estadísticamente (diseño de experimentos (DoE)) que muestran los efectos de interacción entre los niveles pH, Ca, PO₄ y Fe sobre la recuperación de hierro durante el tratamiento térmico.

La **Figura 12** es un gráfico que muestra la dependencia de la concentración final de Fe con respecto a la concentración inicial de Fe en medios sometidos a tratamiento térmico. El resto de los componentes del medio estaban en niveles normales 1,5 veces superiores a los del Medio 4.

La **Figura 13** es un gráfico que muestra la dependencia de la recuperación de Fe con respecto al ajuste de varios parámetros en los medios sometidos a tratamiento térmico. **A)** Dependencia de la recuperación de Fe con respecto a los niveles de pH, y **B)** dependencia de la recuperación de Fe con respecto a las concentraciones de calcio y de fosfato en medios sometidos a tratamiento térmico. El resto de los componentes del medio estaban en niveles normales 1,5 veces superiores a los del Medio 4. Las concentraciones estándar para el Medio 4 se indican como "1" en la escala del eje X.

La **Figura 14** es un gráfico que demuestra la relación entre las recuperaciones de calcio y de fosfato y las

recuperaciones de Fe tras el tratamiento térmico. Los puntos de datos situados dentro del círculo rojo corresponden a muestras que mostraban precipitación visible y aumento de la turbidez (NTU). La línea indica la relación entre los puntos de datos de calcio.

La **Figura 15** es un gráfico que muestra los niveles de hierro en diversas formulaciones de medios de cultivo celular antes y después del tratamiento HTST. Para un medio de cultivo celular particular (por ejemplo, el Medio 14), la barra de la izquierda indica los niveles esperados de hierro en el medio de cultivo celular después del tratamiento HTST, la barra del medio indica los niveles reales de hierro en el medio de cultivo celular antes del tratamiento HTST (Pre-HTST) y la barra de la derecha indica los niveles reales de hierro en el medio de cultivo celular después del tratamiento HTST (Post-HTST).

La **Figura 16** es un gráfico que demuestra que la adición de hierro a los medios sometidos a tratamiento HTST es beneficiosa para el crecimiento de la línea celular de hibridoma NS0 en el cultivo celular. "HTST+" indica un medio de cultivo celular sometido a un tratamiento HTST. "HTST-" indica un medio de cultivo celular no sometido a un tratamiento HTST. "Fe" indica la presencia de un suplemento de hierro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores han hecho el descubrimiento inesperado de que el ajuste del pH del medio de cultivo celular, el ajuste de la concentración de calcio, el ajuste de la concentración de fosfato, el ajuste de la concentración de calcio y de fosfato y/o la limitación de la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio de cultivo celular, o el ajuste de una combinación de pH, concentración de calcio y concentración de fosfato, y someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST a un intervalo de temperatura específico durante un periodo de tiempo suficiente resulta eficaz para la inactivación de virus (o de otros agentes infecciosos y/o adventicios) en el medio de cultivo, además de reducir el ensuciamiento del equipo al minimizar o prevenir la formación de precipitados.

La presente invención proporciona procedimientos para reducir el precipitado en el equipo utilizado para llevar a cabo un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) para inactivar virus, en donde el procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 o de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para reducir el precipitado en el equipo utilizado para llevar a cabo un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) para inactivar virus, en donde el procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. En otros aspectos, la presente invención proporciona procedimientos para reducir el precipitado en el equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus, en donde el procedimiento comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprenden someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprenden someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. En otros aspectos más de la invención, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En algunos aspectos, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otros aspectos, la presente invención proporciona procedimientos para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprenden limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio de cultivo celular a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST.

I. Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o citados en el presente documento son en general bien entendidos y comúnmente empleados por los expertos en la técnica usando metodología convencional, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain*

Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

II. Definiciones

"Cultivar" una célula se refiere a poner en contacto una célula con un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la célula y/o la proliferación de la célula.

"Cultivo discontinuo" se refiere a un cultivo en el que todos los componentes para el cultivo celular (incluyendo las células y todos los nutrientes de cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al inicio del proceso de cultivo.

La frase "cultivo celular discontinuo alimentado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cultivo discontinuo en el que las células y el medio de cultivo se suministran al recipiente de cultivo inicialmente y en el que el cultivo se alimenta con nutrientes de cultivo adicionales durante el proceso de cultivo, de manera continua o en incrementos discretos, con o sin recolecta periódica de células y/o producto antes de la finalización del cultivo.

"Cultivo por perfusión" es un cultivo por el que las células se retienen en el cultivo mediante, por ejemplo, filtración, encapsulación, anclaje a microportadores, etc., y en el que el medio de cultivo se introduce y retira del recipiente de cultivo de forma continua o intermitente.

"Recipiente de cultivo" se refiere a un recipiente utilizado para el cultivo de una célula. El recipiente de cultivo puede ser de cualquier tamaño, siempre que resulte útil para el cultivo de células.

Los términos "medio" y "medio de cultivo celular" se refieren a una fuente de nutrientes utilizada para el crecimiento o el mantenimiento de células. Como entiende un experto en la técnica, la fuente de nutrientes puede contener los componentes requeridos por la célula para el crecimiento y/o la supervivencia o puede contener componentes que ayudan al crecimiento y/o la supervivencia de las células. Vitaminas, aminoácidos esenciales o no esenciales y oligoelementos son ejemplos de componentes del medio. Se entiende que "medio" y "medios" se utilizan indistintamente en toda esta memoria descriptiva.

Un "medio de cultivo celular químicamente definido" o "CDM" es un medio con una composición específica que está libre de productos de origen animal o indefinidos, tales como suero de animales y peptona. Como entendería un experto en la técnica, un CDM se puede utilizar en un proceso de producción de polipéptidos en el que una célula está en contacto con, y segrega un polipéptido en, el CDM. Por lo tanto, se entiende que una composición puede contener un CDM y un producto polipéptido y que la presencia del producto polipéptido no hace que el CDM sea químicamente indefinido.

Un "medio de cultivo celular químicamente indefinido" se refiere a un medio cuya composición química no se puede especificar y que puede contener uno o más productos de origen animal o indefinidos tales como suero de animales y peptona. Como entendería un experto en la técnica, un medio de cultivo celular químicamente indefinido puede contener un producto de origen animal como fuente de nutrientes.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, por formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los términos "polipéptido" y "proteína", tal como se usan en el presente documento, abarcan específicamente anticuerpos.

Un "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido que ha sido recuperado de una célula o cultivo celular en el que se expresó.

Un "ácido nucleico", tal como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de un nucleótido se puede transmitir antes o después del montaje del polímero.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere y abarca una secuencia de origen no natural, recombinante o de origen natural que se encuentra fuera o separada de su contexto habitual.

- 5 Un polipéptido "purificado" se refiere a un polipéptido cuya pureza se ha aumentado, de modo que existe en una forma que es más pura que en su entorno natural y/o que la que se produce inicialmente y/o se sintetiza y/o amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta.

10 El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), inmunoadhesinas y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza en el presente documento de forma intercambiable con anticuerpo.

15 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, normalmente la región de unión al antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; moléculas de anticuerpo de cadena simple; diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

20 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos, a excepción de posibles mutaciones que se producen de forma natural y que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un
25 único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que se pueden sintetizar sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no se debe interpretar como que requiere que la producción del anticuerpo sea mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los
30 anticuerpos monoclonales que son útiles en la presente invención se pueden obtener mediante la metodología de hibridoma descrita en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden obtener usando procedimientos de ADN recombinante en células de bacterias, animales eucariotas o plantas (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s)
40 cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés del presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias que se unen al dominio variable del antígeno, derivadas de un
45 primate no humano (por ejemplo, el mono del Viejo Mundo, el simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Los anticuerpos "humanizados" son formas de anticuerpos no humanos (p. ej., de roedores) que son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tales como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad
50 deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, pero al menos uno y típicamente dos, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana.
60 Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596 (1992).

"Contaminantes" se refiere a materiales que son diferentes del producto polipéptido deseado. El contaminante incluye, sin limitación: materiales de la célula huésped, tal como CHOP; proteína A lixiviada; ácido nucleico; una variante, fragmento, agregado o derivado del polipéptido deseado; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componente de medio de cultivo celular, etc.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "precipitado" se refiere a la formación de partículas sólidas o insolubles en una solución. Se producen varias formas de precipitado y en el presente documento se describen ejemplos de precipitados. Ejemplos no limitantes incluyen: precipitación de fosfato de calcio, whitlockita insoluble, óxidos, fosfato de hierro, y los precipitados de fosfato de calcio y hierro. La precipitación de fosfato de calcio puede ser un proceso en el que el calcio y los fosfatos en solución forman partículas insolubles, es decir, un precipitado. Las partículas insolubles se pueden denominar fosfatos de calcio. Los fosfatos de calcio incluyen, sin limitación: fosfato de calcio monobásico, fosfato de calcio dibásico, fosfato de calcio tribásico, whitlockita e hidroxiapatita. Las partículas insolubles pueden incluir componentes adicionales, es decir, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, iones, quelantes y metales. También se incluyen dentro de la definición el crecimiento de tales partículas por precipitación adicional o por agregación, floculación y/o reordenamiento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ensuciamiento" se refiere a la acumulación y la formación de materiales no deseados sobre las superficies del equipo de procesamiento. El ensuciamiento se puede caracterizar como un problema combinado, en estado no estacionario, de transferencia de momento, masa y calor en el que también pueden tener lugar procesos químicos, de solubilidad, corrosión y biológicos. El ensuciamiento se puede deber a la precipitación, es decir, precipitación de fosfato de calcio.

Tal como se utiliza en el presente documento, "agente adventicio" abarca los virus y bacterias (incluyendo las bacterias que pueden pasar a través de filtros de grado de esterilización). Un "agente infeccioso" es un tipo de "agente adventicio".

Se entiende que aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen aspectos y modos de realización "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en".

Para uso en el presente documento, salvo indicación clara de lo contrario, los términos "un", "una" y similares se refiere a uno o más.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que se aproximan a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

III. Medios de cultivo celular

Los procedimientos para inactivar los virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios presentes en medios de cultivo celular se pueden aplicar a cualquier tipo de medio de cultivo celular en el que exista preocupación de contaminación vírica, posible contaminación vírica o contaminación por otros agentes infecciosos o contaminación por agentes adventicios. Se entiende que la presente invención contempla composiciones y procedimientos que se pueden aplicar a cultivos de células y a medios de cultivo celular donde existe contaminación vírica potencial, así como contaminación vírica real.

Los procedimientos de inactivación de virus, la reducción de la formación de precipitado y la reducción del ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST se pueden utilizar para producir una composición de medio de cultivo celular en donde los virus, los agentes adventicios y otros agentes infecciosos se han inactivado. De este modo, en el presente documento se contempla y se detalla cualquier composición de medios de cultivo celular y sus intermedios que pasan por el sistema de inactivación vírica, inactivación de agentes adventicios y/o inactivación de agentes infecciosos. Se ha identificado que el ajuste de parámetros específicos de los medios de cultivo celular (pH, niveles de calcio y niveles de fosfato) permite reducir o prevenir la formación de precipitados en los medios después de someterse a un tratamiento HTST a temperaturas eficaces para la inactivación de contaminantes víricos y de otros contaminantes presentes en los medios.

Ajustes independientes de los parámetros de los medios de cultivo celular, tales como pH, concentraciones o cantidades de calcio y concentraciones o cantidades de fosfato (y cualquier combinación de los mismos) se pueden utilizar con el tratamiento HTST para reducir los precipitados (por ejemplo, un complejo que comprende calcio y fosfato), para reducir el ensuciamiento del equipo HTST y para reducir el ensuciamiento del filtro, todo ello manteniendo la idoneidad para el cultivo celular. Los medios de cultivo celular que mantienen la idoneidad para el cultivo celular permiten que las células se propaguen, crezcan, sobrevivan, produzcan cualquier polipéptido, proteína o compuesto, secreten cualquiera de estos productos al medio, y cualquier otra característica que los expertos en la técnica entenderían que se incluya para la idoneidad del cultivo celular.

Los ajustes independientes de los parámetros de cultivo celular descritos en el presente documento son aplicables a cualquier proceso de cultivo celular y pueden ser beneficiosos para la producción de polipéptidos y/o proteínas, así como también para la generación de otros productos, tales como células, medios y otros componentes de los medios. El ajuste de estos parámetros de los medios de cultivo celular para reducir o prevenir la formación de precipitados en medios de cultivo celular es beneficioso para la producción de fármacos biológicos, tal como un fármaco polipéptido.

El uso de medios de cultivo celular con estos parámetros o componentes ajustados es eficaz para eliminar los contaminantes víricos de un fármaco biológico, así como para reducir o prevenir la formación de precipitados que pueden afectar al rendimiento de los medios de cultivo celular, evitan la producción eficiente de fármacos biológicos a partir de las líneas de células cultivadas y contribuyen al ensuciamiento del equipo HTST. Cualquier medio detallado en el presente documento se puede emplear en cualquier etapa de crecimiento celular, mantenimiento y producción de fármacos biológicos y se puede utilizar en el medio basal y/o en el medio de alimentación. Los medios, tal como se describen en el presente documento, dan lugar a niveles aceptables de turbidez o de precipitados de una composición que comprende el fármaco biológico aislado del cultivo de células cultivadas en los medios sometidos a tratamiento HTST.

Se proporciona un medio de cultivo celular que comprende uno o más de los siguientes componentes: (a) calcio y (b) fosfato. En algunas variaciones, un medio de cultivo celular comprende los componentes (a) o (b), o los componentes (a) y (b). En otras variaciones, un medio de cultivo celular no comprende los componentes (a) y (b). En algunos aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente definido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se trata mediante HTST para inactivar virus potencialmente presentes en las materias primas y en los equipos utilizados para preparar los medios.

Se pueden añadir componentes de medios a una composición en formas que son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el calcio se puede proporcionar como, pero no limitado a, cloruro de calcio, cloruro de calcio deshidratado, carbonato de calcio, fosfato de calcio, fosfato de calcio tribásico, L-lactato de calcio hidrato, folinato de calcio y nitrato de calcio tetrahidrato. Por ejemplo, el fosfato se puede proporcionar como, pero no limitado a, fosfato de sodio, fosfato monosódico, fosfato disódico, fosfato de potasio monobásico, solución salina tamponada con fosfato, fosfato de calcio y fosfato de calcio dibásico.

La relación entre el fosfato y el calcio se puede ajustar para el tratamiento HTST de modo que los complejos que comprenden calcio y fosfato (por ejemplo, complejos de fosfato de calcio (CaPO_4)) no se formen. En una variación, la cantidad total de fosfato y de calcio se ajusta o se limita de modo que los complejos que comprenden calcio y fosfato (por ejemplo, complejos de fosfato de calcio (CaPO_4)) no se formen. En otra variación, la cantidad total de fosfato y de calcio se limita de modo que la formación de complejos de CaPO_4 permite una operación exitosa de HTST (por ejemplo, sin ensuciamiento de los equipos de HTST y de filtración). Los procedimientos de detección de condiciones problemáticas suelen incluir mediciones indirectas de precipitación incluyendo turbidez, observaciones operativas de los equipos de HTST y de filtración y observaciones visuales de los equipos de HTST y de filtración (por ejemplo, mediante el uso de un horóscopo). En un aspecto, el medio es un medio de cultivo celular que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio a menos de aproximadamente 10 mM. En otra variación, el fosfato total y el calcio total están en una concentración en el medio de menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM. En otra variación, el fosfato total y el calcio total están en una concentración en el medio de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM. En una variación, el fosfato total y el calcio total están en una concentración en el medio de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos de la invención, la cantidad total de calcio y de fosfato en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales de la invención, la cantidad total de calcio y de fosfato en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular está libre de calcio y de fosfato.

El nivel de calcio en el medio de cultivo celular se puede ajustar cuando el medio comprende fosfato. Los ajustes pueden aumentar o reducir el nivel de calcio. En algunos modos de realización, el nivel de calcio se reduce (incluyendo la eliminación de calcio). En otros modos de realización, el nivel de calcio se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato. En otros modos de realización, se elimina calcio del medio antes del tratamiento HTST. En cualquiera de estos modos de realización, el pH se ajusta de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato (por ejemplo, reducción de la cantidad en comparación con los complejos que formarían si no se hicieran estos ajustes). En otros modos de realización, el nivel de calcio se puede ajustar aún más después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular. El tiempo entre el tratamiento HTST y el ajuste de los niveles de calcio después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular se puede modificar. Dentro del alcance de la invención se contempla un tiempo de segundos, minutos, días, semanas, meses o años.

En otra variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende limitar la cantidad total de calcio a menos de aproximadamente 10 mM. En otra variación, el calcio total está en una concentración en el medio de menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM. En otra variación, el calcio total está en una concentración en el medio de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM. En otra variación, el calcio total está en una concentración en el medio de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos de la invención, la cantidad total de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales de la invención, la cantidad total de calcio en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular está libre de fosfato.

En otro aspecto, el nivel de fosfato se puede ajustar cuando el medio comprende calcio. Los ajustes pueden aumentar o reducir el nivel de fosfato. En algunos modos de realización, el nivel de fosfato se reduce. En algunos modos de realización, el nivel de fosfato se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato. En algunos modos de realización, se elimina fosfato del medio antes del tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el pH se ajusta de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato. En algunos modos de realización, el nivel de fosfato se puede ajustar aún más después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular. El tiempo entre el tratamiento HTST y el ajuste de los niveles de fosfato después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular se puede modificar. Dentro del alcance de la invención se contempla un tiempo de segundos, minutos, días, semanas, meses o años.

En otra variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende limitar la cantidad total de fosfato a menos de aproximadamente 10 mM. En otra variación, el fosfato total está en una concentración en el medio de menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM. En otra variación, el fosfato total está en una concentración en el medio de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de

aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM. En otra variación, el fosfato total está en una concentración en el medio de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos de la invención, la cantidad total de fosfato en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales de la invención, la cantidad total de fosfato en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular está libre de calcio.

En una variación, un medio de cultivo celular comprende 1 o 2 o ambos componentes (a) y (b) en las concentraciones enumeradas en el presente documento que comprende limitar la cantidad total de (a) o de (b) o de (a) y (b) a menos de aproximadamente 10 mM. Se entiende que un medio de cultivo celular puede contener una combinación de los componentes (a) y (b) en cualquiera de los intervalos de concentración proporcionados en el presente documento de igual forma que si todas y cada una de las concentraciones se hubieran enumerado de forma específica e individual. Por ejemplo, se entiende que el medio en una variación que comprende los componentes (a) y (b), en el que la concentración de calcio es de aproximadamente 0,5 mM y la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,5 mM. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente definido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquier aspecto, el medio está libre de calcio durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, se añade calcio al medio de cultivo celular después del tratamiento HTST. En cualquier aspecto, el medio está libre de fosfato durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, se añade fosfato al medio de cultivo celular después del tratamiento HTST.

En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende una concentración de fosfato de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1 mM y una concentración de calcio de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 3 mM. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1,25 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 2,5 mM. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 1,5 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 2,25 mM. En otra variación adicional más, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 1,75 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 2 mM. En una variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 2 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1,75 mM. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 2,25 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1,5 mM. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 2,25 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1,5 mM. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,25 mM a aproximadamente 2,5 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1,25 mM. En otra variación adicional más, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 2,75 mM, y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1,15 mM. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,75 mM a aproximadamente 3 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1 mM. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 3,5 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 0,8 mM. En una variación adicional más, la concentración de fosfato es de aproximadamente 3,5 mM a aproximadamente 4,5 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 0,6 mM. En una variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 4,5 mM a aproximadamente 5 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 0,5 mM. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 5,5 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 0,25 mM. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 5,5 mM a aproximadamente 6 mM y la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 0,1 mM. En otro aspecto, los parámetros de pH, calcio y fosfato se pueden ajustar de forma independiente como se muestra en ejemplo de la Figura 5 (tal como la figura 5B, la Figura 5C y la Figura 5D) de modo que la turbidez (como una medida indirecta de precipitación a base de fosfato de calcio) permanece en el área de la cuadrícula (en donde el área de la cuadrícula representa los valores

de turbidez en o por debajo del umbral de turbidez de fracaso total de 5 NTU en este ejemplo) y evita los intervalos de precipitación que se muestran en las áreas sin cuadrícula (donde las áreas sin cuadrícula representan la respuesta de turbidez por encima del umbral de turbidez de fracaso total de 5 NTU). La superficie de respuesta mostrada en la Figura 5 muestra los efectos multifactoriales del pH, las concentraciones de calcio y las concentraciones de fosfato en la turbidez (como una medida indirecta de precipitación a base de fosfato de calcio). Por lo tanto, la superficie de respuesta demuestra que los factores se pueden ajustar en combinación y no sólo como un único factor a la hora de encontrar puntos de ajuste de operación del tratamiento HTST que sean aceptables para pH en combinación con concentraciones de calcio y de fosfato aceptables en el medio que se va a procesar.

Otro parámetro independiente (además del calcio y fosfato como otros parámetros independientes) que se puede ajustar es el pH. Como tal, el pH se puede ajustar cuando el medio comprende calcio y fosfato. En algunos modos de realización, el pH se ajusta a un nivel bajo adecuado durante la preparación del medio antes del tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el pH se ajusta mediante reducción a un nivel adecuado. En algunos modos de realización, el pH se ajusta a menos de aproximadamente 7,2. En algunos modos de realización, el pH se ajusta a aproximadamente 5,0 a 7,2. En algunos modos de realización, el pH se ajusta aún más después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular. En algunos modos de realización, el pH se ajusta a aproximadamente 6,9 a 7,2. El tiempo entre el tratamiento HTST y el ajuste de los niveles de pH después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular se puede modificar. Dentro del alcance de la invención se contempla un tiempo de segundos, minutos, días, semanas, meses o años.

En otros aspectos, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2. En un aspecto, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente definido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. Esto puede ser antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. Opcionalmente, un experto en la técnica puede ajustar el pH del medio después del tratamiento HTST, de modo que el medio se encuentra a un pH que es adecuado para procesos de cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2. En otra variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9. En otra variación, el pH del medio es un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,7; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,1; de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,0; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,7; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,1; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,9; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,7; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,3; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,1; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 o 6,9; al menos aproximadamente cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 y no más de aproximadamente 6,9. En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2. En otra variación, el pH del medio es un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,7; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,1; de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,0; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,7; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,1; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,9; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,7; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,3; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,1; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,9; de

aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 o 6,9; al menos aproximadamente cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 y no más de aproximadamente 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. Esto puede ser antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. El medio se puede ajustar a un pH adecuado para procesos de cultivo celular según sea necesario después del tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2. En otra variación, el pH del medio es de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,1; de aproximadamente 6,9a aproximadamente 7,1; de aproximadamente 6,9a aproximadamente 7,0; de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 7,1 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente cualquiera de 6,9 o 7,0 o 7,1 o 7,2; de al menos aproximadamente cualquiera de 6,9 o 7,0 o 7,1 y no más de aproximadamente 7,2. En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2. En otra variación, el pH del medio es de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,1; de aproximadamente 6,9a aproximadamente 7,1; de aproximadamente 6,9a aproximadamente 7,0; de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 7,1 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente cualquiera de 6,9 o 7,0 o 7,1 o 7,2; de al menos aproximadamente cualquiera de 6,9 o 7,0 o 7,1 y no más de aproximadamente 7,2 para la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se lleva hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se lleva hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio es de aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM. En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En cualquier variación, el pH y la cantidad de calcio y de fosfato es cualquier cantidad detallada en el presente documento. En cualquier aspecto, el medio está libre de calcio durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, se añade calcio al medio de cultivo celular después del tratamiento HTST. En cualquier aspecto, el medio está libre de fosfato durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, se añade fosfato al medio de cultivo celular después del tratamiento HTST. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se lleva hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En una variación, el medio es un medio de cultivo celular que comprende una concentración de fosfato de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 0,5 mM y un pH de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,4. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 0,75 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,35. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 1 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,25. En otra variación adicional más, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1,25 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,2. En una variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 1,5 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,1. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 1,75 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,05. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 2 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7. En otra variación adicional más, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 2,25 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,9. En una variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,25 mM a aproximadamente 2,5 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,85. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 2,75 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,75. En una variación adicional, la concentración de fosfato es de aproximadamente 2,75 mM a aproximadamente 3 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,7. En una variación adicional más, la concentración de fosfato es de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 3,25 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,6. En una variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 3,25 mM a aproximadamente 3,5 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,5. En otra variación, la concentración de fosfato es de aproximadamente 3,5 mM a aproximadamente 3,75 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,45.

En una variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 1 mM y el pH es de aproximadamente 6,65 a aproximadamente 7,4. En otra variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 0,25 mM y el pH es de aproximadamente 6,55 a aproximadamente 7,4. En una variación adicional, la concentración de calcio es de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 0,5 mM y el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,4. En otra variación adicional más, la concentración de calcio es de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 0,6 mM y el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,2. En una variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 0,75 mM y el pH es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7. En otra variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 0,75 mM a aproximadamente 1 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,9. En una variación adicional, la concentración de calcio es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1,1 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,8. En una variación adicional más, la concentración de calcio es de aproximadamente 1,1 mM a aproximadamente 1,25 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,7. En una variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 1,25 mM a aproximadamente 1,5 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,65. En otra variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 1,5 mM a aproximadamente 1,75 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,55. En una variación adicional, la concentración de calcio es de aproximadamente 1,75 mM a aproximadamente 2 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,5. En una variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 2,25 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,45. En otra variación, la concentración de calcio es de aproximadamente 2,25 mM a aproximadamente 2,5 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,43. En una variación adicional, la concentración de calcio es de aproximadamente 2,5 mM a aproximadamente 2,6 mM y el pH es de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,41.

Componentes de medios individuales pueden estar presentes en cantidades que resultan en una o más ventajosas propiedades, tales como la inactivación vírica, la reducción de la formación de precipitado y la reducción del ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST. En una variación, un medio de cultivo celular como se proporciona en el presente documento contiene parámetros de medios como los que se describen en la Tabla 1. Se entiende que una composición de medio puede comprender uno o más de los componentes del medio de la Tabla 1 (por ejemplo, uno o más de los componentes (a) a (c), tal como una composición de medio que comprende cada uno de los componentes (a), (b) y (c), o una composición de medio que comprende cada uno de los componentes (a), (b) y (d), o una composición de medio que comprende los componentes (a) y (b), o una composición de medio que comprende cada uno de los componentes (a) y (c), o una composición de medio que comprende cada uno de los componentes (b) y (c), o una composición de medio que comprende cada uno de los componentes (a) y (d), o una composición de medio que comprende cada uno de los componentes (b) y (d) en cualquiera de las cantidades que aparecen en la Tabla 1, de la misma manera que si todas y cada una de las combinaciones de componentes y cantidades se hubieran enumerado de forma específica e individual. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente definido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquier aspecto, el medio está libre de calcio durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, se añade calcio al medio de cultivo celular después del tratamiento HTST. En cualquier aspecto, el medio está libre de fosfato durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, se añade fosfato al medio de cultivo celular después del tratamiento HTST. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se lleva hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

Tabla 1. Ejemplos de niveles de componentes o parámetros del medio

Componente o parámetro del medio	Nivel de componente o parámetro en el medio
(a) Calcio	de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM.
(b) Fosfato	de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 2 mM a

	aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 7 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 6 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 3 mM; de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM; de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 9 mM; de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 9 mM; aproximadamente cualquiera de 9 u 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o 1 mM; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 y no más de aproximadamente 9 mM.
(c) pH (antes de la fase de producción de polipéptidos)	de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,7; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,1; de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,0; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,7; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,1; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,9; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,7; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,3; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,1; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 6,9; sobre cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 o 6,9; al menos aproximadamente cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 y no más de aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,9; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 6,6; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 6,3; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,0; de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 5,4 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 5,6 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 6,4 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente cualquiera de 5,0 o 5,2 o 5,4 o 5,6 o 5,8 o 6,0 o 6,2 o 6,4 o 6,6 o 6,8 o 7,0 y no más de aproximadamente 7,2.
(c) pH (para la fase de producción de polipéptidos)	de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,1; de aproximadamente 6,9a aproximadamente 7,1; de aproximadamente 6,9a aproximadamente 7,0; de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente 7,1 a aproximadamente 7,2; de aproximadamente cualquiera de 6,9 o 7,0 o 7,1 o 7,2; de al menos aproximadamente cualquiera de 6,9 o 7,0 o 7,1 y no más de aproximadamente 7,2.

Un medio proporcionado en el presente documento en una variación comprende calcio y fosfato. En una variación, el medio que comprende calcio y fosfato es un medio de alimentación. En otra variación, el medio que comprende calcio y fosfato es un medio basal. En algunos aspectos, el medio de alimentación es un medio de producción. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente definido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se aumenta hasta un nivel suficiente para la expresión de proteínas durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

Un medio proporcionado en el presente documento en una variación comprende un medio de cultivo celular en el que

el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9. En una variación, el medio que comprende calcio y fosfato es un medio de alimentación. En otra variación, el medio que comprende calcio y fosfato es un medio basal. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente definido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, el medio de cultivo celular se utiliza para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En aspectos adicionales, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En cualquiera de los aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se aumenta hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En una variación, la invención proporciona un medio en el que los componentes del medio celular se ajustan utilizando una superficie de respuesta, como se detalla en el Ejemplo 2. En otra variación, la invención proporciona un medio en el que los componentes de del medio celular se ajustan utilizando la superficie de respuesta de la Figura 5 y la Figura 6.

En una variación, la invención proporciona un medio en el que se añaden metales traza al medio después de que el medio se someta a tratamiento HTST. En un aspecto, un metal traza es al menos uno o más metales traza seleccionados del grupo que consiste en hierro o cobre. En una variación, la invención proporciona un medio en el que se añade hierro al medio en una cantidad aproximadamente 1 mM a aproximadamente 125 μ M después de que el medio se someta a tratamiento HTST. En otra variación, el hierro está en una concentración en el medio de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 125 μ M; de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 120 μ M; de aproximadamente 20 μ M a aproximadamente 110 μ M; de aproximadamente 30 μ M a aproximadamente 100 μ M; de aproximadamente 40 μ M a aproximadamente 90 μ M; de aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 80 μ M; de aproximadamente 60 μ M a aproximadamente 70 μ M; 1 m a aproximadamente 120 μ M; 1 m a aproximadamente 110 μ M; 1 m a aproximadamente 100 μ M; 1 m a aproximadamente 90 μ M; 1 m a aproximadamente 80 μ M; 1 m a aproximadamente 70 μ M; 1 m a aproximadamente 60 μ M; 1 m a aproximadamente 50 μ M; 1 m a aproximadamente 40 μ M; 1 m a aproximadamente 30 μ M; 1 m a aproximadamente 20 μ M; 1 m a aproximadamente 10 μ M; 10 m a aproximadamente 125 μ M; 20 m a aproximadamente 125 μ M; 30 m a aproximadamente 125 μ M; 40 m a aproximadamente 125 μ M; 50 m a aproximadamente 125 μ M; 60 m a aproximadamente 125 μ M; 70 m a aproximadamente 125 μ M; 80 m a aproximadamente 125 μ M; 90 m a aproximadamente 125 μ M; 100 m a aproximadamente 125 μ M; 110 m a aproximadamente 125 μ M; 120 m a aproximadamente 125 μ M; de aproximadamente cualquiera de 1 o 10 o 20 o 30 o 40 o 50 o 60 o 70 u 80 o 90 o 100 o 110 o 120 o 125 μ M; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 10 o 20 o 30 o 40 o 50 o 60 o 70 u 80 o 90 o 100 o 110 o 120 y no más de aproximadamente 125 μ M después de que el medio se someta a tratamiento HTST.

Un medio proporcionado en el presente documento en un aspecto da lugar a uno o más atributos favorables cuando se utiliza en un procedimiento para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST en comparación con los atributos que se obtienen cuando se utiliza un medio diferente para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. La formación de precipitado en medios de cultivo celular sometidos a tratamiento HTST para la inactivación de virus para la producción de un fármaco biológico (por ejemplo, un anticuerpo) puede afectar a los atributos de calidad de un fármaco biológico, tales como la actividad del fármaco biológico. Además, la formación de precipitado en medios de cultivo celular durante el tratamiento HTST puede provocar el ensuciamiento del equipo HTST. El ensuciamiento del equipo HTST puede afectar a la capacidad del tratamiento HTST para inactivar los virus de manera eficaz. En un aspecto, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST. En una variación, un medio como se proporciona en el presente documento reduce la precipitación en el medio de cultivo celular cuando se utiliza en un procedimiento para la inactivación de virus en un cultivo celular durante el tratamiento HTST en comparación con la precipitación en un medio diferente utilizado para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En otra variación, un medio como se proporciona en el presente documento reduce el ensuciamiento del equipo HTST cuando se utiliza en un procedimiento para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST en comparación con el ensuciamiento del equipo HTST por un medio diferente utilizado para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST. En otra variación adicional más, un medio como se proporciona en el presente documento reduce el precipitado sobre el equipo utilizado para el tratamiento HTST cuando se utiliza en un procedimiento para la inactivación de virus durante el tratamiento HTST del medio en comparación con el precipitado sobre el equipo utilizado para el tratamiento HTST de un medio diferente. En otra variación, un medio como se proporciona en el presente documento inactiva virus en medios de cultivo celular cuando se utiliza en un procedimiento para el tratamiento HTST del medio en comparación con la inactivación de virus en un medio diferente. En otra variación adicional más, un medio como se proporciona en el presente documento reduce la precipitación resultante del ensuciamiento del filtro en un procedimiento para el tratamiento HTST del medio en comparación con la

inactivación de virus en un medio diferente.

Una observación es que los metales traza, tales como cobre y hierro, que podrían ser importantes para el cultivo celular (incluyendo la producción de polipéptidos/proteínas, el crecimiento celular, la supervivencia y/o la proliferación) se reducen en el transcurso del tratamiento HTST. Como tal, la invención también proporciona procedimientos para la inactivación de virus o agentes adventicios en medios de cultivo celular mientras se mantiene la idoneidad de los medios para el cultivo celular, en donde dicho procedimiento comprende (a) someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST); y (b) ajustar uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en pH, nivel de calcio y nivel de fosfato en el que hay un ajuste adicional de las concentraciones de metales traza. Los metales traza pueden ser hierro o cobre. Las concentraciones de hierro y/o cobre se pueden ajustar de forma independiente en el medio antes de llevar a cabo el tratamiento HTST. En algunos casos, si se anticipa una disminución de la concentración de hierro y/o cobre y, en general, la cantidad es conocida, se puede añadir hierro y/o cobre al medio antes de llevar a cabo el tratamiento HTST. En otros casos en los que no se conoce la cantidad de disminución, el hierro y/o el cobre se pueden reducir (incluso eliminar) del medio antes de llevar a cabo el tratamiento HTST. A continuación, el medio se puede suplementar con hierro y/o cobre después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular.

IV. Composiciones y procedimientos de la invención

Los medios de cultivo celular que se detallan en el presente documento se pueden utilizar en un procedimiento para la inactivación de virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios en medios de cultivo celular durante el tratamiento HTST. El medio se puede utilizar en un procedimiento de cultivo de células, ya sea mediante cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado o cultivo por perfusión. El medio se puede utilizar en un procedimiento para el cultivo de células para producir polipéptidos, incluyendo anticuerpos. El medio se puede utilizar en un procedimiento para el cultivo de células para producir productos basados en células, incluyendo los utilizados en aplicaciones de reemplazo de tejidos o de terapia génica. El medio se puede utilizar en cualquier aplicación de cultivo celular en el que la prevención de la potencial contaminación vírica se beneficie del uso de un tratamiento térmico que inactiva los virus, manteniendo la capacidad del medio para cultivar células. El medio se puede utilizar en un procedimiento de inactivación de virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios en medios de cultivo celular sometidos a cualquiera de las variaciones o modos de realización de tratamiento térmico descritos en el presente documento.

Se proporcionan procedimientos de inactivación de virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios en medios de cultivo celular tal como se detallan en el presente documento en el que el medio de cultivo celular se somete a tratamiento HTST. En una variación, el procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio comprende uno o más componentes de medio como se describen en la Tabla 1 (por ejemplo, un medio que comprende los componentes (a) y (b) o un medio que comprende los componentes (a) y (c) o un medio que comprende los componentes (b) y (c) o un medio que comprende los componentes (a) y (d) o un medio que comprende los componentes (b) y (d) o un medio que comprende cada uno de los componentes (a) a (c) o (a), (b) y (d) en cualquiera de las cantidades que aparecen en la Tabla 1).

Procedimientos para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios en el que el medio de cultivo celular tal como se detalla en el presente documento se utiliza en el equipo y se somete a tratamiento HTST. En una variación, el procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio comprende uno o más componentes de medio como se describen en la Tabla 1 (por ejemplo, un medio que comprende los componentes (a) y (b) o un medio que comprende los componentes (a) y (c) o un medio que comprende los componentes (b) y (c) o un medio que comprende los componentes (a) y (d) o un medio que comprende los componentes (b) y (d) o un medio que comprende cada uno de los componentes (a) a (c) o (a), (b) y (d) en cualquiera de las cantidades que aparecen en la Tabla 1). En una variación particular, el ensuciamiento es ensuciamiento por precipitado. En una variación, el ensuciamiento es el ensuciamiento del filtro.

A. Procedimientos para la inactivación vírica y la inactivación de agentes infecciosos y/o agentes adventicios en medios de cultivo celular

En algunas variaciones, la invención proporciona procedimientos de inactivación de virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios en medios de cultivo celular sometidos a tratamiento a alta temperatura en los que el medio es compatible con el tratamiento térmico en comparación con los medios incompatibles. Por ejemplo, el tratamiento térmico de un medio incompatible precipita o da lugar a precipitación a las temperaturas necesarias para la inactivación eficaz de virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios. Tal como se establece en los medios divulgados en el presente documento, los medios compatibles con el tratamiento térmico no precipitan o reducen la precipitación a la temperatura necesaria para la inactivación eficaz de virus, agentes infecciosos y/o agentes adventicios. En algunos aspectos, el tratamiento térmico es un tratamiento HTST. En otros aspectos, el tratamiento térmico es un tratamiento térmico por lotes, incluyendo, pero no limitado a, un tratamiento en baño de arena y un procedimiento en baño de aceite.

En una variación, la invención proporciona un procedimiento para inactivar virus en medios de cultivo celular que

comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST. En otros aspectos, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación, la invención proporciona un procedimiento para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En una variación adicional más, la invención proporciona un procedimiento para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0 y la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces a aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 y la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se eleva hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. Los virus de cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento pueden ser cualquier virus detallado en el presente documento (por ejemplo, un parvovirus) y el medio del procedimiento puede ser cualquier medio detallado en el presente documento, tal como un medio que comprende los parámetros de los medios que se detallan en la Tabla 1.

a) Temperatura y tiempo de mantenimiento de la temperatura

En cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento, el tratamiento térmico comprende elevar la temperatura del medio a al menos aproximadamente 85 °C durante una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En un aspecto adicional, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 90 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En un aspecto adicional, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 93 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En un aspecto adicional más, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 95, 97, 99, 101 o 103 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En otro aspecto adicional más, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, o 117 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En aún otro aspecto adicional, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En aún otro aspecto adicional, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En algunos aspectos, la temperatura del medio se eleva hasta aproximadamente 95 °C. En otros aspectos, la temperatura del medio se eleva hasta aproximadamente 102 °C. En una variación, la temperatura del medio se eleva hasta aproximadamente 85 °C a aproximadamente 120 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En otra variación, la temperatura del medio se eleva hasta aproximadamente 85 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 87 °C a aproximadamente 118 °C; de aproximadamente 89 °C a aproximadamente 116 °C; de aproximadamente 91 °C a aproximadamente 114 °C; de aproximadamente 93 °C a aproximadamente 112 °C; de aproximadamente 95 °C a aproximadamente 110 °C; de aproximadamente 97 °C a aproximadamente 108 °C; de aproximadamente 99 °C a aproximadamente 106 °C; de aproximadamente 101 °C a aproximadamente 104 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 118 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 116 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 114 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 112 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 110 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 108 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 106 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 104 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 102 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 100 °C; de aproximadamente 85 °C a 98 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 96 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 94 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 92 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 90 °C; de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 88 °C; de aproximadamente 87 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 89 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 91 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 93 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 95 °C a aproximadamente 120 °C; de

aproximadamente 97 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 99 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 101 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 103 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 105 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 107 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 109 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 111 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 113 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 115 °C a aproximadamente 120 °C; de aproximadamente 117 °C a aproximadamente 120 °C; acerca de cualquiera de 85 °C u 86 °C u 88 °C o 90 °C o 92 °C o 94 °C o 96 °C o 98 °C o 100 °C o 102 °C o 104 °C o 106 °C o 108 °C o 110 °C o 112 °C o 114 °C o 116 °C o 118 °C o 120 °C; al menos aproximadamente cualquiera de 85 °C u 86 °C u 88 °C o 90 °C o 92 °C o 94 °C o 96 °C o 98 °C o 100 °C o 102 °C o 104 °C o 106 °C o 108 °C o 110 °C o 112 °C o 114 °C o 116 °C o 118 °C y no más de aproximadamente 120 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En cualquiera de los aspectos, la temperatura del medio se enfría hasta aproximadamente 15 °C a aproximadamente 40 °C para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

La temperatura del tratamiento térmico se mantiene durante el tiempo de mantenimiento de la temperatura para inactivar los virus presentes en el medio. El tiempo de mantenimiento de la temperatura es una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus. En cualquiera de los aspectos, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 1 segundo. En un aspecto adicional, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 2 segundos, 3 segundos o 4 segundos. En otro aspecto adicional más, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 segundos. En otro aspecto adicional más, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 5, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 o 60 segundos. En algunos aspectos, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de 10 segundos. En otros aspectos, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de 2 segundos. En otra variación, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 2 a aproximadamente 58 segundos; de aproximadamente 6 a aproximadamente 54 segundos; de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 segundos; de aproximadamente 14 a aproximadamente 46 segundos; de aproximadamente 18 a aproximadamente 42 segundos; de aproximadamente 22 a aproximadamente 38 segundos; de aproximadamente 26 a aproximadamente 34 segundos; de aproximadamente 30 a aproximadamente 34 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 56 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 52 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 48 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 44 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 36 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 32 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 28 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 22 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 18 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 14 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 segundos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 segundos; de aproximadamente 4 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 12 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 16 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 24 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 28 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 32 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 36 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 44 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 48 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 52 a aproximadamente 60 segundos; de aproximadamente 56 a aproximadamente 60 segundos; aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 4 o 6 u 8 o 10 o 12 o 14 o 16 o 18 o 20 o 22 o 24 o 26 o 28 o 30 o 32 o 34 o 36 o 38 o 40 o 42 o 44 o 46 o 48 o 50 o 52 o 54 o 56 o 58 y no más de aproximadamente 60 segundos. En otros aspectos, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 1 minuto. En un aspecto adicional, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 2,5 minutos. En aún otro aspecto adicional, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 10,5 u 11 minutos. En otra variación, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de aproximadamente 1 a aproximadamente 11 minutos; de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos; de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 minutos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 minutos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 minutos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 minutos; de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 minutos; de aproximadamente 2 a aproximadamente 11 minutos; de aproximadamente 4 a aproximadamente 11 minutos; de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 minutos; de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 minutos; aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 o 11 minutos; al menos aproximadamente cualquiera de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 y no más de aproximadamente 11 minutos.

b) Agentes infecciosos

La invención proporciona procedimientos para la inactivación de virus y/o bacterias en un medio de cultivo celular que comprenden someter el medio a un tratamiento térmico. Los virus pueden ser cualquier virus detallado en el presente

documento (por ejemplo, parvovirus) y el medio de cultivo celular puede ser cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1. Los virus inactivados en el medio de cultivo celular durante el tratamiento térmico pueden ser cualquier virus que sea industrialmente relevante para la fabricación de productos (por ejemplo, polipéptidos, células, tejidos). Los virus industrialmente relevantes son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitantes de virus industrialmente relevantes son: *Parvoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae* y *Picornaviridae*. La nomenclatura formal para la clase de virus (por ejemplo, *Parvoviridae*), se utiliza de manera intercambiable en toda la memoria descriptiva con una nomenclatura menos formal (por ejemplo, parvovirus). Se entiende que cualquiera de las nomenclaturas se refiere a la misma clase de virus (es decir, *Parvoviridae* abarca la misma clase de virus que parvovirus). En una variación, el virus es un virus sin envoltura. En algunos aspectos, un virus sin envoltura incluye, pero no se limita a, un virus de ADN de cadena sencilla, un virus de ADN de doble cadena, un virus de ARN de doble cadena y un virus de ARN de cadena sencilla. En aspectos adicionales, un virus sin envoltura incluye, pero no se limita a, un parvovirus, un reovirus o un picornavirus. En una variación, el virus es un virus con envoltura. En algunos aspectos, un virus con envoltura incluye, pero no se limita a, un virus de ADN de cadena sencilla, un virus de ADN de doble cadena, un virus de ARN de doble cadena y un virus de ARN de cadena sencilla. En aspectos adicionales, un virus con envoltura incluye, pero no se limita a, un retrovirus, un virus de herpes o un hepadnavirus. En cualquier variación de la invención, un virus se selecciona del grupo que consiste en un adenovirus, virus de la peste porcina africana, arenavirus, arterivirus, astrovirus, baculovirus, badnavirus, barnavirus, bimavirus, bromovirus, bunyavirus, calicivirus, capillovirus, carlavirus, caulimovirus, circovirus, clostero virus, comovirus, coronavirus, cotricovirus, cystovirus, deltavirus, dianthovirus, enamovirus, filovirus, flavivirus, furovirus, fusellovirus, geminivirus, hepadnavirus, herpesvirus, hordeivirus, hypovirus, ideaovirus, inovirus, iridovirus, levivirus, lipothrixvirus, luteovirus, machlomovirus, marafivirus, microvirus, myovirus, necrovirus, nodavirus, orthomyxovirus, papovavirus, paramyxovirus, partitivirus, parvovirus, phycodnavirus, picornavirus, plamavirus, podovirus, polydnavirus, potexvirus, potyvirus, poxvirus, reovirus, retrovirus, rhabdovirus, rhizidiovirus, sequevirus, siphovirus, sobemovirus, tectivirus, tenuivirus, tetravirus, tobamavirus, tobravirus, togavirus, tombusvirus, totivirus, trichovirus, tymovirus y umbravirus. En algunos aspectos, los virus incluyen, pero no se limitan a, virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHDV), virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus-1 de ratón (MPV), virus del Valle de Cache, Vesivirus 2117, circovirus porcino (PCV 1), circovirus porcino 2 (PCV 2), parvovirus canino (CPV), parvovirus bovino (BPV) o virus de la lengua azul (BTV). En un aspecto particular, el virus es un parvovirus tal como el virus murino diminuto. En una variación, la invención proporciona procedimientos para la inactivación de un agente subvítico en un medio de cultivo celular que comprenden someter el medio a un tratamiento térmico. En algunos aspectos, el agente subvítico es un viroide o un satélite. En otra variación, la invención proporciona procedimientos para la inactivación de un agente similar a virus en un medio de cultivo celular que comprenden someter el medio a un tratamiento térmico.

En otra variación, la invención proporciona procedimientos para la inactivación de un agente infeccioso en un medio de cultivo celular que comprenden someter el medio a un tratamiento térmico. En algunos aspectos, el agente infeccioso es una bacteria. En un aspecto adicional, la bacteria es un micoplasma. En otro aspecto, el agente infeccioso es una bacteria que es suficientemente pequeña para pasar a través de filtros, incluyendo cualquiera de los filtros descritos en el presente documento. En otro aspecto, el agente infeccioso es un hongo. En otro aspecto adicional más, el agente infeccioso es un parásito. En otro aspecto más, el agente infeccioso es un componente de un agente infeccioso. Un experto en la técnica entiende que un componente de un agente infeccioso puede ser cualquier componente que se obtiene a partir de un agente infeccioso y que no es deseado en los medios de cultivo celular.

En otra variación adicional más, la invención proporciona procedimientos para la inactivación de un agente adventicio en un medio de cultivo celular que comprenden someter los medios a un tratamiento térmico. Un experto en la técnica entiende que cualquier agente adventicio que es susceptible a la inactivación por tratamiento térmico se puede inactivar mediante cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento utilizando cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1. En cualquiera de las variaciones, al menos uno o más tipos de agentes infecciosos y/o adventicios se inactivan en el medio de cultivo celular durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, uno o más tipos de agentes infecciosos y/o adventicios son un virus, agente subvítico, agente similar a virus, bacteria, hongo, parásito o un componente de un agente infeccioso y/o adventicio. En cualquiera de las variaciones, el tratamiento térmico es un tratamiento HTST. Un experto en la técnica entiende que cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento para la inactivación de un agente infeccioso y/o adventicio mediante tratamiento térmico comprende someter cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1, para cualquier tratamiento HTST detallado en el presente documento.

La inactivación de virus se mide mediante ensayos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la inactivación vírica se determina mediante medición o evaluación de un valor de reducción logarítmica (LRV) dado del virus activo. En un aspecto, un valor de reducción logarítmica mayor o igual a 3 para la carga vírica de un medio de cultivo celular utilizando el tratamiento HTST a temperaturas mayores de 95 °C durante 2 segundos se determina como la inactivación de los virus presentes en el medio. En otro aspecto, un valor de reducción logarítmica de aproximadamente 3 en la carga vírica de un medio de cultivo celular utilizando el tratamiento HTST a una temperatura de 100 °C durante 60 segundos se determina como la inactivación de los virus presentes en el medio. En cualquiera de los aspectos, la carga vírica es una carga MVM.

c) Sistemas de tratamiento térmico

Los procedimientos de tratamiento térmico de medios de cultivo celular para la inactivación de agentes infecciosos conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías descritas en Schleh, M. *et al.* 2009. *Biotechnol. Prog.* 25(3):854-860 y Kiss, R. 2011. *PDA J Pharm Sci and Tech.* 65:715-729 se pueden utilizar para el tratamiento térmico de cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1. Por ejemplo, el tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) se utiliza en los procesos de fabricación para inactivar virus. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En otra variación, la invención proporciona un procedimiento para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En aún una variación, la invención proporciona un procedimiento para inactivar virus en medios de cultivo celular que comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. El tratamiento HTST puede comprender un ciclo de HTST en el que el medio de cultivo celular se calienta desde una temperatura ambiente o 37 °C a aproximadamente 102 °C, en el que el medio de cultivo celular se mantiene a 102 °C durante un tiempo de mantenimiento de temperatura de aproximadamente 10 segundos, y en el que el medio de cultivo celular se enfría entonces a aproximadamente la temperatura ambiente o aproximadamente 37 °C. En algunos aspectos, la temperatura ambiente es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C. En otros aspectos, la temperatura ambiente es de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C. El tratamiento HTST puede ser un proceso de flujo continuo que utiliza dos intercambiadores de calor, uno para calentar el fluido y uno para enfriar el fluido, con tubos intermedios para proporcionar un tiempo de mantenimiento de la temperatura deseado para un caudal dado. En un aspecto, la inactivación de virus en el medio de cultivo celular comprende someter el medio de cultivo celular a un ciclo de tratamiento HTST. En otro aspecto, la inactivación de virus en el medio de cultivo celular comprende someter el medio de cultivo celular a al menos dos o más ciclos de tratamiento HTST. En un aspecto, el caudal es 100 lpm. En otro aspecto, el caudal es 125 lpm. En aún otro aspecto, el caudal puede ser cualquier caudal que sea adecuado para proporcionar la temperatura y el tiempo de mantenimiento de la temperatura adecuados para la inactivación de los virus y/o agentes adventicios. En cualquier aspecto, el medio de cultivo celular se calienta de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 102 °C, en el que el medio de cultivo celular se mantiene a 102 °C durante una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus, y en el que el medio de cultivo celular se enfría entonces hasta aproximadamente 37 °C. En un aspecto adicional, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus es de aproximadamente 10 segundos. En cualquier aspecto, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus es cualquier tiempo de mantenimiento de temperatura detallado en el presente documento. En algunos aspectos, la temperatura para inactivar los virus durante el tiempo de mantenimiento de la temperatura es cualquier temperatura detallada en el presente documento. En un aspecto, la temperatura para inactivar los virus es de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 120 °C. En una variación, el medio de cultivo celular se calienta de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 102 °C, en el que el medio de cultivo celular se mantiene a 102 °C durante un tiempo de mantenimiento de temperatura de aproximadamente 10 segundos, y en el que el medio de cultivo celular se enfría entonces hasta aproximadamente 37 °C. En otra variación, el medio de cultivo celular se calienta de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 102 °C, en el que el medio de cultivo celular se mantiene a 102 °C durante un tiempo de mantenimiento de temperatura de aproximadamente 10 segundos, y en el que el medio de cultivo celular se enfría entonces hasta aproximadamente 37 °C.

Para el tratamiento HTST, el equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus procesa un volumen de medio de cultivo celular de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 000 litros (l). Un experto en la técnica entiende que el equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus puede procesar un volumen de medio de cultivo celular inferior a aproximadamente 0,5 l o superior a aproximadamente 20 000 l en cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento utilizando cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1. En un aspecto, un volumen de medio de cultivo celular de aproximadamente 0,5 l a aproximadamente 20 000 l se procesa en una ejecución HTST. En otros aspectos, un volumen de medio de cultivo celular de aproximadamente 0,5 l a aproximadamente 20 000 l se procesa en al menos dos o más ejecuciones HTST. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ejecución HTST" se puede referir al proceso en el que una cantidad especificada del medio se somete a un tratamiento HTST en el equipo (por ejemplo, skid HTST) que se utiliza para el tratamiento HTST durante al menos un ciclo (por ejemplo, calentamiento, mantenimiento, enfriamiento) de tratamiento HTST. Un experto en la técnica entiende que cualquier equipo, tal como un skid HTST, que se utiliza para el tratamiento HTST se puede utilizar para el tratamiento térmico de cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1. En un aspecto, una ejecución HTST puede comprender el procesamiento continuo de al menos uno o más volúmenes de medio de cultivo celular de aproximadamente 0,5 l a aproximadamente 20 000 l. En otro aspecto, una ejecución de HTST puede comprender el procesamiento por lotes de al menos uno o más volúmenes de medio de cultivo celular de aproximadamente 0,5 l a aproximadamente 20 000 l. En cualquier aspecto, al menos uno o más volúmenes de medio de cultivo celular pueden ser el mismo tipo de medio de cultivo celular (por ejemplo, Medio 1). En cualquier aspecto, al menos uno o más volúmenes de medio de cultivo

celular pueden ser de al menos uno o más tipos de medios de cultivo celular (por ejemplo, Medio 1 y Medio 2). En cualquier aspecto de los procedimientos detallados en el presente documento, un volumen de medio de cultivo celular de al menos aproximadamente 0,5 l se procesa a través del equipo para el tratamiento HTST para inactivar virus. En un aspecto adicional, un volumen de medio de cultivo celular de al menos aproximadamente 2 l se procesa a través del equipo para el tratamiento HTST para inactivar virus. En otro aspecto adicional más, una cantidad de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio es de al menos aproximadamente 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000 o 15 000 litros. En algunos aspectos, un volumen de medio de cultivo celular de 2 l se procesa a través del equipo para el tratamiento HTST para inactivar virus. En otros aspectos, un volumen de medio de cultivo celular de 12 000 l se procesa a través del equipo para el tratamiento HTST para inactivar virus. En otra variación, un volumen de medio de cultivo celular de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 000; de aproximadamente 10 a aproximadamente 16 000; de aproximadamente 20 a aproximadamente 14 000; de aproximadamente 40 a aproximadamente 12 000; de aproximadamente 80 a aproximadamente 10 000; de aproximadamente 100 a aproximadamente 8000; de aproximadamente 200 a aproximadamente 6000; de aproximadamente 400 a aproximadamente 4000; de aproximadamente 800 a aproximadamente 2000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 18 000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 16 000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 14 000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 12 000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 8000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 6000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2000; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 800; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 600; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 400; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2; de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 100 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 500 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 1500 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 2000 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 5000 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 15 000 a aproximadamente 20 000; de aproximadamente 1750 a aproximadamente 20 000 litros; de aproximadamente cualquiera de 0,5 o 2 o 10 o 100 o 1000 o 10 000 o 20 000 litros; de al menos aproximadamente cualquiera de 0,5 o 2 o 10 o 100 o 1000 o 10 000 y no más de aproximadamente 20 000 litros se procesa a través del equipo para el tratamiento HTST para inactivar virus.

Procedimientos de inactivación de virus durante el procesamiento del cultivo celular son conocidos por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías descritas en Kiss, R. 2011. *PDA J Pharm Sci and Tech.* 65:715-729 y se pueden usar en combinación con el tratamiento HTST de cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1. Por ejemplo, el tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) se puede utilizar en combinación con al menos uno o más tratamientos de barrera para los virus en los procesos de fabricación para eliminar los virus del medio de cultivo celular. En algunos aspectos, uno o más tratamientos de barrera para los virus incluyen, pero no se limitan a, esterilización por calor, exposición a luz UV, irradiación gamma y filtración. En algunos aspectos, un tratamiento de barrera para los virus es filtración. La presente invención proporciona procedimientos para la eliminación y/o inactivación de un virus en medios de cultivo celular sometidos a un tratamiento HTST, en el que el virus se elimina del medio de cultivo celular mediante filtración en una etapa posterior a que el medio de cultivo celular se someta al tratamiento HTST. En algunos aspectos, la filtración es ultrafiltración. Antes de la ultrafiltración, uno o más componentes de medios tales como los componentes enumerados en la Tabla 1 se añaden al medio de cultivo celular sometido a un tratamiento HTST. En algunos aspectos, antes de la ultrafiltración, uno o más componentes de medios, tales como metales traza (por ejemplo, hierro o cobre) se añaden al medio de cultivo celular sometido a un tratamiento HTST.

Las membranas de ultrafiltración se pueden formar a partir de celulosa regenerada, poliétersulfona, poliarilsulfonas, polisulfona, poliimida, poliamida, difluoruro de polivinilideno (PVDF) o similares. Membranas de ultrafiltración representativas incluyen, pero no se limitan a, membranas Viresolve[®], membranas Viresolve[®] Pro, membranas Viresolve[®] 180, membranas Viresolve[®] 70, membranas Viresolve[®] PFN, membranas Viresolve[®] NFR, membranas Retropore[™], membranas Virosart CPV, membranas Planova 75, membranas Planova 35, membranas Planova 20, membranas Planova 15N, membranas VAG 300, membranas Ultipor DVD, membranas Ultipor DV50, membranas Ultipor DV20 y filtros DVD Zeta Plus VR[™]. En algunos aspectos, la membrana de ultrafiltración es capaz de eliminar partículas de parvovirus. En algunos aspectos, la membrana de ultrafiltración es una membrana de retención de parvovirus.

El tamaño de poro de las membranas de ultrafiltración debe ser lo suficientemente pequeño para retener las partículas de virus no deseados al tiempo que permite el paso de una o más proteínas de la solución acuosa a través de la membrana. En algunos modos de realización de la invención, el tamaño de poro de la membrana de ultrafiltración es inferior a 10 nm, 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm o 200 nm. En algunos modos de realización, el tamaño de poro de la membrana de ultrafiltración es de 20 nm o menos.

Las membranas de ultrafiltración se pueden caracterizar por un corte molecular que representa el peso molecular promedio de la proteína más pequeña que retiene la membrana de ultrafiltración. Por ejemplo, una membrana de ultrafiltración con un corte molecular de 1000 kD retendrá la mayoría de las proteínas globulares con un peso molecular superior a 1000 kD en una tasa del 80 al 90 %, mientras que la mayoría de las proteínas globulares con un peso molecular inferior a 1000 kD pasarán a través de la membrana de ultrafiltración. En algunos aspectos de la invención, el corte molecular de la membrana de ultrafiltración es de entre 200 kD y 1000 kD. En algunos aspectos de las invenciones, la membrana de ultrafiltración tiene un corte molecular de 200 kD, 300 kD, 400 kD, 500 kD, 600 kD, 700 kD, 900 kD o 1.000 kD.

La filtración se puede efectuar con una o más membranas de ultrafiltración, ya sea por filtración de flujo perpendicular (normal) (NFF) o por filtración de flujo tangencial (TFF). En NFF, el flujo de alimentación se hace pasar a través de una membrana y las sustancias de gran peso molecular quedan atrapadas en el filtro, mientras que el filtrado es liberado en el otro extremo. En TFF, la mayoría del flujo de alimentación se desplaza tangencialmente a través de la superficie del filtro, en lugar de pasar por el filtro. De este modo, la torta de filtrado se elimina sustancialmente durante el proceso de filtración, lo que aumenta la cantidad de tiempo que una unidad de filtrado puede estar operativa. Las membranas de ultrafiltración para cualquiera de los modos de filtración se pueden suministrar en forma de un cartucho (NFF), tal como los filtros víricos VIREOLVE® NFP, o como casetes (para TFF), tal como las casetes PELLICON®. En un modo de realización preferente, la filtración es filtración de flujo normal.

En los procedimientos de la invención se puede utilizar más de una membrana de ultrafiltración. En algunos modos de realización, más de una membrana de ultrafiltración se pone en contacto con la solución acuosa en paralelo. El tratamiento HTST en combinación con un tratamiento adicional de barrera para los virus se puede utilizar para el tratamiento de cualquier medio de cultivo celular divulgado en el presente documento, tal como un medio de cultivo celular con los componentes que se detallan en la Tabla 1, para la producción a escala industrial de proteínas y polipéptidos terapéuticos.

Los medios de cultivo celular utilizados durante el tratamiento HTST para la inactivación de agentes infecciosos pueden ser medios compatibles con HTST o medios incompatibles con HTST. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "medios compatibles con HTST" se puede referir a medios de cultivo celular que presentan reducida o nula precipitación durante el tratamiento HTST. Tal como se usa en el presente documento, el término "medios incompatibles con HTST" se puede referir a medios de cultivo celular que presentan una precipitación medible o detectable durante el tratamiento HTST. En una variación, la invención proporciona procedimientos para el cribado de medios de cultivo celular compatible con HTST para su uso en la inactivación de virus durante el tratamiento HTST, en el que el medio compatible con HTST presenta una reducida precipitación en comparación con la precipitación del medio incompatible con HTST. En un aspecto, el cultivo celular compatible con HTST no presenta ninguna precipitación en comparación con la precipitación del medio incompatible con HTST durante el tratamiento HTST. En cualquier variación, el medio compatible con HTST tiene niveles más altos de un metal traza en comparación con el medio incompatible con HTST después del tratamiento HTST. En un aspecto, un metal traza es al menos uno o más metales traza seleccionados del grupo que consiste en hierro o cobre. En cualquier variación, el medio compatible con HTST tiene niveles más bajos de un metal traza en comparación con otro medio compatible con HTST. En un aspecto, un metal traza es al menos uno o más metales traza seleccionados del grupo que consiste en hierro o cobre. La invención proporciona procedimientos para convertir medios incompatibles con HTST en medios compatibles con HTST. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para convertir un medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST en el que los componentes del medio celular se ajustan, tal como se detalla en la Tabla 1. En otra variación, la invención proporciona un procedimiento para convertir un medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST en el que los componentes del medio celular se ajustan utilizando una superficie de respuesta, como se detalla en el Ejemplo 2. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para convertir un medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST en el que el pH del medio se ajusta a aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9. En otra variación, la invención proporciona un procedimiento para convertir un medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST en el que el pH del medio se ajusta a aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2. En algunos aspectos, el pH del medio incompatible con HTST se ajusta a aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 para convertir el medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST. En algunos aspectos, el pH del medio incompatible con HTST se ajusta a aproximadamente pH 6,0 para convertir el medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST. En algunos aspectos, el pH del medio incompatible con HTST se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio incompatible con HTST se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio incompatible con HTST se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En algunos aspectos, el pH del medio incompatible con HTST es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para convertir un medio incompatible con HTST en un medio compatible con HTST en el que la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se ajusta a menos de aproximadamente 10 mM. En un aspecto adicional, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio incompatible con HTST se ajusta a menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM. En algunos aspectos, la

cantidad total de fosfato y de calcio en el medio incompatible con HTST se ajusta a menos de aproximadamente 10 mM antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio incompatible con HTST se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

d) Reducción de la formación de precipitado

En una variación, la invención proporciona procedimientos para reducir la precipitación en medios de cultivo celular durante el tratamiento térmico para la inactivación de virus. Los procedimientos comprenden el ajuste de uno o más niveles de calcio, fosfato y pH en el medio de cultivo celular sometido a tratamiento térmico. En un aspecto, el tratamiento térmico es un tratamiento HTST. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular durante el tratamiento HTST para la inactivación de virus en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En otra variación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular durante el tratamiento HTST para la inactivación de virus en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST. En otros aspectos, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En algunos aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En una variación, el pH del medio es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular durante el tratamiento HTST para la inactivación de virus que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación más, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular durante el tratamiento HTST para la inactivación de virus en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En algunos aspectos, el pH del medio se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0 y la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces a aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 y la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se eleva hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En algunos aspectos de la invención, cualquier medio detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes específicos que se detallan en la Tabla 1, reduce la precipitación durante el tratamiento HTST para la inactivación de agentes infecciosos. En un aspecto, los componentes específicos del medio reducen la precipitación en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 100 %, en comparación con la cantidad de precipitación presente en el mismo medio que carece de los componentes de medio específicos durante el tratamiento HTST. La determinación cuantitativa de la cantidad de precipitación en el medio se puede realizar usando técnicas bien conocidas en la técnica. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular sometidos a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y en el que el medio presenta una precipitación reducida en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en comparación con la precipitación presente en un medio que no tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En un aspecto, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST y en el que el medio presenta una precipitación reducida en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en comparación con la precipitación presente en un medio que no tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST y en el que el medio presenta una precipitación reducida en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en comparación con la precipitación presente en un medio que no tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular

que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST y en el que el medio presenta una precipitación reducida en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en comparación con la precipitación presente en un medio que tiene una cantidad total de fosfato y de calcio superior a aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En un aspecto, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio es inferior a aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 mM durante el tratamiento HTST y en el que el medio presenta una precipitación reducida en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en comparación con la precipitación presente en un medio que no tiene una concentración total de fosfato y de calcio inferior a aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 mM durante el tratamiento HTST. En una variación, la invención proporciona un procedimiento para reducir la precipitación en medios de cultivo celular sometidos a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y que comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST y en el que el medio presenta una precipitación reducida en al menos aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, en comparación con la precipitación presente en un medio que no tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y que tiene una cantidad total de fosfato y de calcio superior a aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST.

El agente infeccioso de cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento puede ser cualquier virus detallado en el presente documento (por ejemplo, un parvovirus) y el medio de los procedimientos puede ser cualquier medio detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1.

B. Métodos para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento térmico

La divulgación proporciona procedimientos para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST para la inactivación de virus en medios de cultivo celular. Los inventores han descubierto que el ajuste de los niveles de componentes o parámetros específicos del medio de cultivo celular sometido a tratamiento HTST reduce el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus. Cualquier medio de cultivo celular que se detalla en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1, se puede utilizar en cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus. En cualquiera de los procedimientos detallados en el presente documento, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST.

En una variación, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST, en donde el procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a un tratamiento HTST en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En un aspecto, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto, el medio tiene un pH de aproximadamente pH 6,0 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto más, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST. En cualquier aspecto, el tratamiento HTST comprende elevar la temperatura hasta al menos aproximadamente 85 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En un aspecto adicional, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 93 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En un aspecto adicional más, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 95, 97, 99, 101 o 103 °C durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio. En una variación, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST, en donde el procedimiento comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio de cultivo celular utilizado en el equipo a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. En un aspecto, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST. En un aspecto adicional, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST.

En cualquier aspecto, el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST se reduce cuando se utiliza un medio compatible con HTST en comparación con un medio incompatible con HTST. En un aspecto, un medio compatible con HTST comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST. En otro aspecto, el medio compatible con HTST comprende una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM. En aún otro aspecto, el medio compatible con HTST comprende un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST. Un medio compatible con HTST es cualquier medio de cultivo celular detallado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1.

Los procedimientos de medición y monitorización del ensuciamiento de distintos equipos utilizados en los procesos de fabricación son conocidos por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías descritas en Awad, M. 2011. *Heat Transfer: Theoretical Analysis, Experimental Investigations and Industrial Systems*. Capítulo 20, páginas 505 a 542 y se pueden utilizar para monitorizar y medir el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST de cualquier medio de cultivo celular divulgado en el presente documento, tal como un medio con los componentes que se detallan en la Tabla 1 y los medios que se detallan en los Ejemplos. Por ejemplo, el ensuciamiento del equipo

se puede medir midiendo cambios en la presión de vapor del intercambiador de calor requerida para alcanzar la temperatura objetivo del medio o midiendo los cambios (reducción) en la temperatura alcanzada. En cualquier aspecto, el ensuciamiento comprende precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST. En un aspecto, uno o más equipos susceptibles al ensuciamiento debido al uso de medios incompatibles con HTST incluyen, pero no se limitan a, un skid HTST, un intercambiador de calor, un tubo, un dispositivo de filtración y una membrana de filtración.

C. Métodos para la producción de polipéptidos con medios de cultivo celular sometidos a tratamiento térmico

a) Células

Los procedimientos y composiciones proporcionados pueden emplear cualquier célula que sea adecuada para el crecimiento celular y/o la producción de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) en un medio descrito en el presente documento, incluyendo células de animal, levadura o insecto. En un aspecto, una célula de los procedimientos y composiciones es cualquier célula o tipo de célula de mamífero adecuada para el cultivo de células y para la expresión de polipéptidos. Los procedimientos proporcionados en el presente documento (por ejemplo, los procedimientos de inactivación de virus en medios de cultivo celular) y composiciones pueden, por tanto, emplear cualquier tipo de célula adecuado, incluyendo una célula animal. En un aspecto, los procedimientos y composiciones emplean una célula de mamífero. Los procedimientos y composiciones también pueden emplear células de hibridoma. En una variación, la célula de mamífero es una célula de mamífero distinta del hibridoma que ha sido transformada con un ácido nucleico aislado exógeno que codifica un polipéptido deseado, tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (incluyendo un fragmento de unión a ligando) y anticuerpos quiméricos. En una variación, los procedimientos y composiciones emplean células de mamíferos seleccionadas del grupo que consiste en retinoblastos humanos (PER.C6 (Crucell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino / DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor de mama murino (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En una variación particular, los procedimientos y composiciones emplean células CHO. En una variación particular, se emplea el cultivo de líneas de células CHO y la expresión de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) a partir de líneas de células CHO. Los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) se pueden secretar al medio divulgado en el presente documento a partir del cual los polipéptidos se pueden aislar y/o purificar o el polipéptido se puede liberar al medio divulgado en el presente documento mediante lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido .

Procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del polipéptido de interés en cultivos de células de vertebrados recombinantes se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); Levinson et al.; EP 117.060; y EP 117.058. Un plásmido particularmente útil para la expresión del polipéptido en cultivo de células mamíferas es pRK5 (pub. EP n.º 307.247) o pSVI6B (pub. PCT n.º WO 91/08291 publicada el 13 de junio de 1991).

Las células huésped se transforman con vectores de expresión o clonación y se cultivan en medios nutrientes modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Para las células de mamífero, el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio de Graham y van der Erb, Virology, 52:456-457 (1978) o el procedimiento de LipofectamineTM. (Gibco BRL) de Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1193) son preferentes. Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huésped de células de mamíferos se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, por Axel en la patente de EE. UU. n.º 4 399 216 publicada el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas de transformación de células de mamíferos, véase, por ejemplo, Keown et al., Methods in Enzymology (1989), Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

Los procedimientos y composiciones también abarcan el uso de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales en cultivo celular. Los anticuerpos monoclonales se preparan recuperando células inmunes (típicamente, células esplénicas o linfocitos de tejido de ganglios linfáticos) de animales inmunizados e inmortalizando las células de manera convencional, por ejemplo, mediante fusión con células de mieloma o mediante transformación con el virus de Epstein-Barr (EB) y selección para obtener clones que expresan el anticuerpo deseado. La técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511 (1976), y también descrita por Hammerling et al, In.: Monoclonal Antibodies and T-Cell hibridomas, Elsevier, NY, pp. 563-681 (1981) se ha aplicado ampliamente para producir líneas celulares híbridas que secretan altos niveles de anticuerpos monoclonales contra numerosos antígenos específicos.

b) Polipéptidos

Los polipéptidos producidos por las composiciones (por ejemplo, células) y los procedimientos que se detallan en el presente documento y que están presentes en las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden ser homólogos a la célula huésped, o preferentemente, pueden ser exógenos, lo que significa que son heterólogos, es decir, extraños, para la célula huésped que se está utilizando, tal como una proteína humana producida por una célula de ovario de hámster chino, o un polipéptido de levadura producido por una célula de mamífero. En una variación, el polipéptido es un polipéptido de mamífero (tal como un anticuerpo) secretado directamente al medio por la célula huésped. En otra variación, el polipéptido se libera al medio mediante lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido.

En una variación, el polipéptido es una secuencia de aminoácidos con una longitud de cadena que es suficiente para producir los niveles superiores de estructura terciaria y/o cuaternaria. En un aspecto, el polipéptido tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 5 a 20 kD, de forma alternativa de al menos aproximadamente 15 a 20 kD, preferentemente de al menos aproximadamente 20 kD.

Cualquier polipéptido que se pueda expresar en una célula huésped se puede producir de acuerdo con la presente divulgación y puede estar presente en las composiciones proporcionadas. El polipéptido se puede expresar a partir de un gen que es endógeno a la célula huésped, o de un gen que se introduce en la célula huésped mediante ingeniería genética. El polipéptido puede ser uno que existe en la naturaleza o puede tener alternativamente una secuencia que ha sido diseñada o seleccionada por la mano del hombre. Un polipéptido de diseño se puede ensamblar a partir de otros segmentos polipeptídicos que se producen de forma individual en la naturaleza, o puede incluir uno o más segmentos que no son de origen natural.

Los polipéptidos que deseablemente se pueden expresar de acuerdo con la presente invención se seleccionarán a menudo sobre la base de una actividad biológica o química interesante. Por ejemplo, la presente invención se puede emplear para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. farmacéuticamente o comercialmente relevantes.

Varios polipéptidos se pueden producir de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, y presentes en las composiciones proporcionadas en el presente documento. Ejemplos de polipéptidos bacterianos incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina y beta-lactamasa. Ejemplos de polipéptidos de mamíferos incluyen moléculas tales como renina, una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana; hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular y el factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como la Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como activador de plasminógeno de tipo uroquinasa u orina o tisular (t-PA) humano; bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (quimiocina de regulación por activación expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora de Müller; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; ADNsa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso como NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión del factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la descomposición; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la cubierta del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores de alojamiento; adreínas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los anticuerpos son ejemplos de polipéptidos de mamíferos producidos de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento y que pueden estar presentes en las composiciones proporcionadas. Los anticuerpos son una clase preferente de polipéptidos que exhiben especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son, en general, glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera presenta asimismo puentes disulfuro intracatenarios separados a intervalos regulares. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un cierto número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio

variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina de origen natural que tienen estructuras diferentes, todas basadas en el pliegue de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras" que se unen mediante puentes disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras comprende una región "constante" (C) y una región "variable" (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte estructural y función en interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunológicos. La especificidad de unión al antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno particular.

La especificidad de unión al antígeno de un anticuerpo viene determinada por las características estructurales de la región V. La variabilidad no se distribuye uniformemente en los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen 9-12 aminoácidos de longitud cada una. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad gracias a las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Cada una de las regiones V comprende típicamente tres regiones determinantes de complementariedad ("CDR", cada una de las cuales contiene un "bucle hipervariable") y cuatro regiones marco. Por tanto, un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima requerida para unirse con una afinidad sustancial a un antígeno particular deseado, incluirá típicamente las tres CDR, y al menos tres, preferentemente cuatro, regiones marco intercaladas para sostener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos de cuatro cadenas clásicos tienen sitios de unión al antígeno que se definen mediante dominios VH y VL en colaboración. Ciertos anticuerpos, tales como anticuerpos de camello y de tiburón, carecen de cadenas ligeras y se basan en los sitios de unión formados sólo por cadenas pesadas. Se pueden preparar inmunoglobulinas de dominio único de diseño en las que los sitios de unión están formados por cadenas pesadas o cadenas ligeras solamente, en ausencia de colaboración entre VH y VL.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en cuanto a su secuencia en los diferentes anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como en los dominios variables de cadena pesada. Las porciones mejor conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan a, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad gracias a las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable puede comprender restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (p. ej., aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio VL y aproximadamente los restos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio VH; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (p.ej., los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio VL y los restos 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio VH; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Los restos "marco" o "FR" son los restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados "Fab", cada

uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y que todavía es capaz de unirse al antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración cuando las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación utilizada en el presente documento para el fragmento Fab' en el que el(los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, λ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunos modos de realización, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

A los efectos del presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros, así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (p.ej., dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "anticuerpos nativos" son, en general, glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera presenta asimismo puentes disulfuro intracatenarios separados a intervalos regulares. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un cierto número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que ciertos restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

Un "anticuerpo desnudo" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no está conjugado a una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

Un anticuerpo se dirige contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente

importante y la administración del anticuerpo a un individuo que padece una enfermedad o afección puede resultar en un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se pueden utilizar anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos de glicolípidos asociados a tumores; véase la patente de EE.UU. n.º 5.091.178).

Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, receptor) o un ligando tal como un factor de crecimiento. Antígenos de ejemplo incluyen moléculas tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular (TF) y el factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como la Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como activador de plasminógeno de tipo uroquinasa u orina o tisular humano (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoietico; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (quimocina de regulación por activación expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora de Müller; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; ADNsa; IgE; un antígeno asociado a linfocito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso como NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión del factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la descomposición; antígeno vírico tal como, por ejemplo, una porción de la cubierta del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores de alojamiento; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Dianas moleculares preferentes para los anticuerpos que se detallan en el presente documento incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20, CD34 y CD40; miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa4/beta7, e integrina alfa5/beta3 incluyendo cualquier subunidad alfa o beta de los mismos (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; factor tisular (TF); interferón alfa (alfa-IFN); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C y similares.

Los anticuerpos (incluyendo fragmentos de los mismos, incluyendo a su vez fragmentos de unión al antígeno de los mismos) que se pueden producir por los procedimientos del presente documento incluyen, sin limitaciones, anti-HER2, anticuerpo 2C4, anti-VEGF, anticuerpo C2B8, anti-CD11a, anticuerpo anti-factor tisular, IgG4b, anti-CD40, anti-CD20, anti-IgE, E25 y E26, anti-PCSK9 y anti-Beta7.

c) Crecimiento celular y producción de polipéptidos

En general, las células se combinan (ponen en contacto) con cualquiera de los medios de cultivo celular descritos en el presente documento en una o más condiciones que promueven el crecimiento celular, el mantenimiento y/o la producción de polipéptidos. Los procedimientos de crecimiento celular y de producción de un polipéptido emplean un recipiente de cultivo (biorreactor) para contener las células y el medio de cultivo celular. El recipiente de cultivo puede estar compuesto de cualquier material que sea adecuado para el cultivo de células, incluyendo vidrio, plástico o metal. Típicamente, el recipiente de cultivo será de al menos 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000 litros o más. Las condiciones de cultivo que se pueden ajustar durante el proceso de cultivo incluyen, pero no se limitan a, pH y temperatura.

En general, un cultivo celular se mantiene en la fase de crecimiento inicial en condiciones que conducen a la supervivencia, el crecimiento y la viabilidad (mantenimiento) del cultivo celular. Las condiciones precisas variarán dependiendo del tipo de célula, del organismo del que procedan las células y de la naturaleza y el carácter del polipéptido expresado.

La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento inicial se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas a las que el cultivo celular sigue siendo viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, las células CHO crecen bien a 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamíferos crecen bien en un

intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C. Preferentemente, las células de mamíferos crecen bien en el intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas apropiadas a las que las células crecen, dependiendo de las necesidades de las células y los requisitos de producción.

En un modo de realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene a una temperatura única y constante. En otro modo de realización, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene dentro de un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede aumentar o disminuir de manera constante durante la fase de crecimiento inicial. Alternativamente, la temperatura se puede aumentar o disminuir en cantidades discretas a diversos tiempos durante la fase de crecimiento inicial. Un experto en la técnica será capaz de determinar si se debe utilizar una única temperatura o múltiples temperaturas, y si la temperatura se debe ajustar de manera constante o en variaciones discretas.

Las células se pueden cultivar durante la fase de crecimiento inicial durante una cantidad mayor o menor de tiempo. En una variación, las células se cultivan durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables que es un porcentaje dado de la densidad máxima de células viables que las células alcanzarían finalmente si se dejan crecer sin interrupciones. Por ejemplo, las células se pueden cultivar durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad máxima de células viables.

En otro modo de realización, las células se dejan crecer durante un período de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración inicial del cultivo celular, la temperatura a la que se cultivan las células y de la tasa de crecimiento intrínseca de las células, las células se pueden cultivar durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, las células se pueden dejar crecer durante un mes o más.

El cultivo celular se puede agitar durante la fase de cultivo inicial a fin de incrementar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, incluyendo, pero no limitado a, pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede controlar mediante el suministro de una cantidad apropiada de ácido o base y la oxigenación se puede controlar con burbujeadores que son bien conocidos en la técnica.

Un paso inicial de cultivo es una fase de crecimiento, en la que las condiciones de cultivo discontinuo de células se modifican para mejorar el crecimiento de células recombinantes, para producir una serie de semillas. La fase de crecimiento se refiere en general al período de crecimiento exponencial en el que las células se dividen en general de forma rápida, por ejemplo, creciendo. Durante esta fase, las células se cultivan durante un período de tiempo, en general de 1 a 4 días, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 días, y en condiciones tales que el crecimiento celular es óptimo. La determinación del ciclo de crecimiento de la célula huésped se puede determinar para la célula huésped particular mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

En la fase de crecimiento, el medio de cultivo basal y las células se pueden suministrar al recipiente de cultivo de forma discontinua. En un aspecto, el medio de cultivo contiene menos de aproximadamente 5 % o menos de 1 % o menos de 0,1 % de suero y otras proteínas de origen animal. Sin embargo, el suero y las proteínas de origen animal se pueden usar si así se desea. En una variación particular, el medio basal tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST para inactivar virus. En un aspecto, el pH del medio basal se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST para inactivar virus antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación particular, el medio basal comprende limitar la cantidad total de fosfato y de calcio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST para inactivar virus. En un aspecto, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se limita a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST para inactivar virus antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación, el medio basal tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST para inactivar virus. En un aspecto, el pH del medio basal se reduce hasta aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y comprende una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST para inactivar virus antes de la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En un aspecto adicional, el pH del medio se lleva entonces a aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 y la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se eleva hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el medio basal es un medio químicamente indefinido. Los aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y otros componentes de medios se pueden usar en una cantidad de una o dos veces los intervalos especificados en la

patente europea EP 307.247 o en la patente de EE. UU. n.º 6.180.401.

Alternativamente, medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma), medio esencial mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma) son adecuados para cultivar las células animales y se pueden suplementar con componentes de medios químicamente definidos como los detallados en el presente documento (por ejemplo, mediante el uso de un kit proporcionado). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes y Sato, Anal. Biochem., 102:255 (1980), las patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762 o 4.560.655; WO 90/03430; WO 87/00195; la patente de EE. UU. n.º 30.985; o la patente de EE. UU. n.º 5.122.469 se puede utilizar como medio de cultivo para las células huésped, cada uno de los cuales se puede suplementar con componentes de medios químicamente definidos como los detallados en el presente documento (por ejemplo, mediante el uso de un kit proporcionado).

Cualquier medio proporcionado en el presente documento también se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), metales traza (tales como hierro y cobre) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica.

En un punto particular de su crecimiento, las células pueden formar un inóculo para inocular un medio de cultivo al comienzo del cultivo en la fase de producción. Alternativamente, la fase de producción puede ser continua con la fase de crecimiento. En general, la fase de crecimiento de las células va seguida de una fase de producción de polipéptidos.

Durante la fase de producción de polipéptidos, el cultivo celular se puede mantener en un segundo conjunto de condiciones de cultivo (en comparación con la fase de crecimiento) que conduce a la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y que es apropiado para la expresión del polipéptido deseado. Por ejemplo, durante la fase de producción subsiguiente, las células CHO expresan polipéptidos y proteínas recombinantes en un intervalo de 25 °C a 35 °C. Se pueden emplear múltiples cambios discretos de temperatura para aumentar la densidad o viabilidad de las células o para aumentar la expresión del polipéptido o proteína recombinante. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fase de producción de polipéptidos" o "fase de expresión de proteínas" se puede referir a la fase de cultivo celular en la que el cultivo de células produce un fármaco biológico (*por ejemplo*, un polipéptido).

Las células se pueden mantener en la fase de producción subsiguiente hasta que se alcance una densidad de células deseada o se alcance el título de la producción. En un modo de realización, las células se mantienen en la fase de producción subsiguiente hasta que el título para el polipéptido recombinante alcanza un máximo. En otros modos de realización, el cultivo se puede recolectar antes de este punto. Por ejemplo, las células se pueden mantener durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables de un 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad máxima de células viables. En algunos casos, puede ser deseable permitir que la densidad de células viables alcance un máximo, y después permitir que la densidad de células viables disminuya hasta cierto nivel antes de recolectar el cultivo.

En ciertos casos, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular durante la fase de producción de polipéptidos subsiguiente con nutrientes u otros componentes del medio que se hayan agotado o que las células hayan metabolizado. Por ejemplo, podría ser ventajoso suplementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes del medio que se haya observado que se han agotado durante la monitorización del cultivo celular. En algunos aspectos, el componente o los componentes agotados incluyen calcio, fosfato, hierro y cobre antes de la fase de producción subsiguiente. En algunos aspectos, los componentes de medios suplementados incluyen calcio, fosfato, hierro y cobre. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular antes de la fase de producción de polipéptidos subsiguiente. En algunos aspectos, el cultivo celular se suplementa con uno o más componentes de medios incluyendo calcio, fosfato, hierro y cobre antes de la fase de producción subsiguiente. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), metales traza (tales como hierro y cobre), aminoácidos, lípidos o glucosa u otra fuente de energía. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "medio de alimentación" o "medio de producción" se refiere a un medio de cultivo celular utilizado durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular.

En una variación particular, el medio de alimentación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST para inactivar virus. En algunos aspectos, el pH del medio de alimentación se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para llevar a cabo la fase de producción de polipéptido del cultivo celular. En algunos aspectos, el pH del medio se lleva entonces hasta aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 después del tratamiento HTST para llevar a cabo la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación particular, el medio de alimentación comprende limitar la cantidad total de fosfato y de

calcio a menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST para inactivar virus. En algunos aspectos, la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se aumenta entonces hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En otra variación, el medio de alimentación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM durante el tratamiento HTST para inactivar virus. En algunos aspectos, el pH del medio se lleva entonces a aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 y la cantidad total de fosfato y de calcio en el medio se eleva hasta un nivel suficiente para la producción de polipéptidos durante la fase de producción de polipéptidos del cultivo celular. En cualquiera de los aspectos, el medio de alimentación es un medio químicamente definido. En cualquiera de los aspectos, el medio de alimentación es un medio químicamente indefinido. Los aminoácidos, vitaminas, oligoelementos y otros componentes de medios se pueden usar en una cantidad de una o dos veces los intervalos especificados en la patente europea EP 307.247 o en la patente de EE. UU. n.º 6.180.401.

D. Kits

Se describe un kit para suplementar un medio de cultivo celular con componentes químicamente definidos. El kit puede contener componentes secos que haya que reconstituir, y también puede contener instrucciones de uso (por ejemplo, para suplementar un medio con los componentes del kit). El kit puede contener los componentes del medio proporcionados en el presente documento en cantidades adecuadas para suplementar un medio de cultivo celular. En una variación, un kit comprende los componentes del medio de la Tabla 1. En otra variación, un kit comprende componentes del medio para ajustar el pH del medio a los niveles de pH divulgados en la Tabla 1.

E. Composiciones

Las composiciones que comprende el medio de cultivo celular y uno o más componentes, tales como una célula o un polipéptido deseado (por ejemplo, un anticuerpo), también se proporcionan. En una variación, se proporciona una composición que comprende: (a) una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido; y (b) un medio de cultivo celular como se proporciona en el presente documento. En otra variación, se proporciona una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo celular como se proporciona en el presente documento, en el que, en un aspecto, el polipéptido es secretado al medio por una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido. En otra variación más, se proporciona una composición que comprende: (a) un polipéptido; y (b) un medio de cultivo celular como se proporciona en el presente documento, en el que, en un aspecto, el polipéptido es liberado al medio por lisis de una célula que comprende un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido. La célula de la composición puede ser cualquier célula detallada en el presente documento (por ejemplo, una célula CHO) y el medio de la composición puede ser cualquier medio detallado en el presente documento, tal como un medio que comprende los componentes del medio que se detallan en la Tabla 1. Del mismo modo, el polipéptido de la composición puede ser cualquier polipéptido detallado en el presente documento, tal como un anticuerpo.

F. Sistemas para inactivación vírica

La invención contempla sistemas y/o procesos para la inactivación de virus para medios de cultivo celular. El sistema puede incluir, pero no se limita a: medios, unidad(es) de contención del medio, medidor de pH (u otro medio para medir el pH), medios para medir y/o cuantificar la concentración y/o cantidad de calcio y/o fosfato; medios para la transferencia del medio (por ejemplo, tubos), fuente(s) de calor para aumentar la temperatura del medio, medios para ajustar un punto de control objetivo (por ejemplo, temperatura), unidades de contención de mantenimiento (por ejemplo, tubos de mantenimiento), fuente(s) de enfriamiento para disminuir la temperatura del medio, suministro de aire, medios para entrada y salida de presión (por ejemplo, válvulas de presión, bomba peristáltica, bomba centrífuga, bomba de desplazamiento positivo), medios para entrada y salida del medio, medios para entrada y salida de gas, medios para filtración, medios para ajustar el caudal y otros aspectos relacionados con la dinámica de flujo y, opcionalmente, conectado a un biorreactor donde se lleva a cabo la producción de polipéptidos deseados o cultivo celular o medio de cultivo celular.

Un sistema para inactivación vírica que comprende los elementos anteriores también puede incluir un sistema para tratamiento térmico. Un sistema de tratamiento térmico ejemplar que se puede utilizar con diversos parámetros (por ejemplo, pH, concentraciones de calcio y/o fosfato) que se describen en el presente documento se muestra en la Figura 1. Tales sistemas descritos en el presente documento son útiles para llevar a cabo los procesos de inactivación de virus en medios de cultivo celular a fin de que los medios se puedan utilizar para la producción de diversos productos finales (por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos, etc.)

G. Ejemplos de modos de realización

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para la inactivación de virus o bacterias en medios de cultivo celular mientras se mantiene la idoneidad de los medios para el cultivo celular, en donde dicho procedimiento comprende (a) someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST); y (b) ajustar uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en pH, nivel de calcio y el nivel de fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, los procedimientos comprenden además ajustar las concentraciones de metales traza.

5 En cualquiera de los modos de realización anteriores, los metales traza se seleccionan del grupo que consiste en hierro y cobre.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, las concentraciones de hierro y/o cobre se ajustan en el medio antes del tratamiento HTST.

10 En cualquiera de los modos de realización anteriores, se eliminan hierro y/o cobre del medio antes del tratamiento HTST.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, los procedimientos comprenden, además, suplementar el medio con hierro y/o cobre después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular.

15 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta cuando el medio comprende calcio y fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta a un nivel bajo adecuado durante la preparación del medio antes del tratamiento HTST.

20 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta mediante reducción a un nivel adecuado.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta a menos de aproximadamente 7,2.

25 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta a aproximadamente 5,0 a 7,2.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el procedimiento comprende además ajustar el pH después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular.

30 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta a aproximadamente 6,9 a 7,2.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de calcio se ajusta cuando el medio comprende fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de calcio se reduce.

35 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de calcio se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, se elimina calcio del medio antes del tratamiento HTST.

40 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, los procedimientos comprenden además ajustar el nivel de calcio después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular.

45 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de fosfato se ajusta cuando el medio comprende calcio.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de fosfato se reduce.

50 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el nivel de fosfato se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, se elimina fosfato del medio antes del tratamiento HTST.

55 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH se ajusta de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, los procedimientos comprenden además ajustar el nivel de fosfato después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular.

60 En cualquiera de los modos de realización anteriores, la concentración total de fosfato y de calcio en el medio es inferior a aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST.

65 En cualquiera de los modos de realización anteriores, los niveles de calcio y de fosfato se ajustan.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, los niveles de pH, de calcio y de fosfato se ajustan.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para inactivar virus o bacterias en medios de cultivo celular mientras se mantiene la idoneidad de los medios para el cultivo celular, en donde dicho procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST), en el que el medio tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,2 antes de y/o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el pH es de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9, de aproximadamente pH 5,3 a aproximadamente pH 6,3 o de aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 antes de o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además ajustar el pH después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular. En algunos modos de realización, el medio comprende calcio y fosfato. En algunos modos de realización, la concentración de metales traza (por ejemplo, hierro y/o cobre) en el medio se ajusta antes del tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio no contiene hierro y/o cobre antes de o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además suplementar el medio con hierro y/o cobre después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para inactivar virus o bacterias en medios de cultivo celular mientras se mantiene la idoneidad de los medios para el cultivo celular, en donde dicho procedimiento comprende someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST), en el que la cantidad total de fosfato y calcio en el medio es inferior a aproximadamente 10 mM antes de y/o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, la cantidad total de fosfato y calcio en el medio es inferior a aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM antes de o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio no contiene fosfato antes de o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio no contiene calcio antes de o durante el tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además ajustar el nivel de fosfato y/o de calcio después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular. En algunos modos de realización, la concentración de metales traza (por ejemplo, hierro y/o cobre) en el medio se ajusta antes del tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el medio no contiene hierro y/o cobre antes del tratamiento HTST. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además suplementar el medio con hierro y/o cobre después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, la formación de precipitado se suprime.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el ensuciamiento del equipo utilizado para el tratamiento HTST se reduce.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el ensuciamiento del filtro se suprime.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el tratamiento HTST comprende elevar la temperatura del medio hasta al menos aproximadamente 85 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar virus o bacterias presentes en el medio.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 93, 95, 97, 99, 101, 102 o 103 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, la temperatura se eleva durante al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 segundos.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el virus se selecciona del grupo que consiste en *Parvoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae* y *Picornaviridae*.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el virus es un virus con envoltura.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el virus es un virus sin envoltura.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, el agente adventicio es una bacteria.

Todas las características divulgadas en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación. Cada una de las características divulgadas en esta memoria descriptiva se puede sustituir por una característica alternativa que tenga un propósito igual, equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada una de las características divulgadas es sólo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar, la invención.

EJEMPLOS

La contaminación por agentes víricos de los procesos de cultivo celular representa una amenaza para la producción de fármacos biológicos (por ejemplo, proteínas recombinantes) a partir de líneas celulares y plantea potenciales problemas de seguridad con respecto a la capacidad de eliminar los agentes víricos durante la purificación del producto. Se pueden adoptar diversos enfoques para reducir al mínimo el riesgo de que agentes adventicios entren en los procesos de producción, incluyendo el uso de un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST) de medios de cultivo celular. Sin embargo, aunque es eficaz en la inactivación de virus cuando funciona correctamente, un medio determinado puede ser incompatible con el uso del tratamiento HTST para la inactivación de partículas víricas (Schleh, M. *et al.* 2009. *Biotechnol. Prog.* 25(3):854-860 y Kiss, R. 2011. *PDA J Pharm Sci and Tech.* 65:715-729). La incompatibilidad del medio puede dar como resultado el ensuciamiento de las superficies del equipo HTST que están en contacto con el proceso. Un elemento que contribuye al ensuciamiento es la precipitación del medio como resultado de las operaciones de calentamiento y de enfriamiento del tratamiento HTST. La precipitación conduce al depósito de residuos que ensucian los intercambiadores de calor y provoca la parada del skid HTST debido a la incapacidad del sistema para mantener los puntos de ajuste de temperatura. Además, la precipitación en un medio que es incompatible con el tratamiento térmico puede provocar el ensuciamiento de los filtros del proceso utilizados para eliminar las bacterias presentes en el medio que no se inactivaron en las condiciones HTST. El ensuciamiento de los filtros debido a la precipitación puede conducir a un fallo de procesamiento y a un aumento significativo en los costes de filtración. Además, la precipitación en un medio incompatible con el tratamiento térmico puede afectar negativamente al rendimiento de cultivo de células (por ejemplo, título de producto, crecimiento celular, viabilidad celular) y a la calidad del producto.

Como se describe en el presente documento, se han identificado varias modificaciones en el medio que hacen que sea compatible para su uso durante el tratamiento HTST u otro tratamiento térmico para la inactivación de virus. Se han identificado varias formulaciones de medios que reducen o previenen la precipitación en el equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus. Se describen los procedimientos de inactivación de virus en los medios proporcionados en el presente documento, así como los procedimientos para reducir el precipitado en el equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus. En un aspecto, un medio puede tener un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST para su uso en la inactivación de virus. En otro aspecto, un medio puede tener un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 durante el tratamiento HTST para su uso en la inactivación de virus antes de la fase de expresión de proteínas del cultivo celular. En un aspecto adicional, se puede llevar el pH de un medio de aproximadamente pH 6,9 a aproximadamente pH 7,2 para la fase de expresión de proteínas del cultivo celular. En un aspecto, un medio puede comprender limitar la cantidad total de fosfato y de calcio a menos de aproximadamente 10 mM durante tratamiento HTST para su uso en la inactivación de virus. En otro aspecto, un medio puede comprender limitar la cantidad total de fosfato y de calcio a menos de aproximadamente 10 mM durante tratamiento HTST para su uso en la inactivación de virus antes de la fase de expresión de proteínas del cultivo celular. En un aspecto adicional, se puede aumentar la cantidad total de fosfato y de calcio de un medio hasta un nivel suficiente para la expresión de proteínas durante la fase de expresión de proteínas del cultivo celular. En cualquier aspecto, el medio puede comprender un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,9 y una cantidad total de fosfato y de calcio de menos de aproximadamente 10 mM durante tratamiento HTST para su uso en la inactivación de virus en medios de cultivo celular. Los medios se pueden usar en todas las fases del cultivo celular y se pueden usar en el medio basal y/o el medio de alimentación. Los medios se pueden usar para reducir el precipitado en el equipo utilizado para el tratamiento HTST para inactivar virus. También se contemplan kits para suplementar un medio de cultivo celular con componentes químicamente definidos.

Ejemplo 1: Validación del procedimiento de selección en baño de arena para reproducir las observaciones de funcionamiento del skid HTST.

Durante el tratamiento HTST a escala de fabricación, las preparaciones líquidas del medio de cultivo celular se calientan a 102 °C durante 10 segundos en un proceso de flujo continuo que utiliza dos intercambiadores de calor, uno para calentar el fluido y uno para enfriar el fluido, con tubos intermedios para proporcionar un tiempo de mantenimiento de la temperatura deseado para un caudal dado (Fig. 1). El procedimiento de selección en baño de arena se utilizó para probar más rápidamente composiciones de medios con requisitos de volumen del medio a escala de laboratorio (~20 ml) para evaluar el comportamiento después del tratamiento térmico. Este procedimiento se basa en "el peor caso" de exposición térmica para detectar e identificar medios compatibles para su uso en skids HTST a escala piloto y de fabricación (Tabla 2).

Tabla 2. Principales diferencias entre el aparato de baño de arena y el skid HTST a dos escalas de funcionamiento.

Característica	Baño de arena	Skid HTST a escala piloto	Skid HTST a escala de fabricación
Escala de volumen del proceso	~20 ml	~50 a 400 l	~1000s de l
Flujo de fluido (tasa de transferencia de calor en el lado de la muestra)	Estático (convección impulsada por calentamiento)	~1-2 l/min, flujo de pistón	~100 l/min, flujo de pistón
Material (resistencia a la	Vidrio	Acero inoxidable 316L	Acero inoxidable 316L

transferencia de calor)			
Perfil de la exposición térmica	Función de paso lento (aumento gradual durante 5-8 minutos de 19-25 °C o 37 °C a 102 °C, mantenimiento durante 10 s, seguido de enfriamiento por extinción durante varios minutos)	Función de paso casi instantáneo (t.a. o 37 °C a 102 °C, mantenimiento durante 10 s, seguido de retorno a 37 °C)	Función de paso casi instantáneo (t.a. o 37 °C a 102 °C, mantenimiento durante 10 s, seguido de retorno a 37 °C)

Materiales y procedimientos

Preparación de medios

- 5 Los medios utilizados en este estudio incluyen medios de producción basales y medios de alimentación discontinua con diferentes niveles de pH (Tabla 3). Todos los medios se prepararon utilizando agua purificada desionizada procesada a través de un sistema de purificación de agua ultrapura Millipore SuperQ. Los medios se prepararon utilizando los caldos de medio en polvo apropiado (SAFC y Life Technologies). Se utilizaron una sonda de pH de electrodo de vidrio (Mettler Toledo) y un osmómetro (Advanced Instruments) durante las preparaciones líquidas para garantizar el pH y la osmolalidad objetivo de una preparación dada. Tras la disolución completa de los componentes y los ajustes finales de pH y osmolalidad, los medios se filtraron usando filtros de membrana PES de tamaño de poro de 0,1 µm en frascos que variaban desde 250 ml a 1 l (Corning) para las preparaciones a pequeña escala.

Tabla 3. Formulaciones de medios sometidas a prueba de estabilidad durante el tratamiento térmico

Descripción de los medios	pH objetivo
Medio 1 (alimentado, indefinido)	6,40
	7,00
Medio 2 (basal, indefinido)	6,70
	7,00

Ajuste del pH

- 20 La desviación de pH debida a la liberación de gases que se produjo durante el tiempo transcurrido entre la finalización de la preparación del medio y la aplicación del tratamiento térmico se corrigió. Antes del tratamiento térmico, una alícuota de 30 ml de cada preparación de medio se transfirió a tubos de 50 ml (Falcon) y las tapas de los tubos Falcon originales se reemplazaron por tapas ventiladas de matraces Erlenmeyer de 250 ml de Corning. Los tubos se colocaron a continuación en una incubadora con corriente de CO₂ durante 30 minutos para reducir el pH (CO₂ al 15 % para muestras a pH 6.2 y CO₂ al 12 % para las demás muestras, 200 rpm, 37 °C); este paso fue capaz de reducir el pH por debajo del valor objetivo. Los tubos se agitaron manualmente mientras se monitorizaba el pH utilizando una sonda de pH con electrodo de vidrio y un medidor (Mettler Toledo) hasta que el pH volvió de nuevo a un valor por encima del pH objetivo. Las mediciones finales de pH se realizaron con un analizador NOVA bioprofiler.

Procedimiento en baño de arena

- 30 Para el procedimiento en baño de arena, 22 ml de medio líquido preparado se transfirieron a recipientes a presión de vidrio de 20 ml (vidrio Ace). Los recipientes se sellaron con una tapa roscada con vaina (thermowell) para que no quede ningún espacio de cabeza de aire en el recipiente al llenarlo completamente y permitir que el exceso de medio sea desplazado por la tapa y el thermowell. El exterior del recipiente se limpió para evitar el ensuciamiento de la superficie exterior con los medios expuestos directamente a la matriz de la fuente de calor. Se utilizó cinta de teflón para cubrir la interfaz entre el borde del recipiente de vidrio y la tapa roscada para mejorar el sellado del recipiente de vidrio a presión y evitar que la arena o el aceite del depósito del termopar entraran en contacto con las muestras para el tratamiento térmico. Se configuró un baño de arena fluidizado (Techne SBS-4) con regulador de temperatura (Techne TC-8D) (presión de entrada de aire comprimido = 5 kPa, temperatura del baño = 110 °C) y se dejó equilibrar durante 30 minutos. Los termopares conectados a un único termómetro digital VWR se insertaron en los thermowells de los recipientes de muestra geoméricamente situados en el centro de la dimensión radial del tubo. Se añadió aceite de silicona al depósito del termopar para proporcionar un medio de transferencia de calor entre la pared de vidrio del depósito del termopar y el termopar. Los recipientes de las muestras se colocaron en el baño de arena y se puso en marcha un temporizador. Se registraron datos cinéticos de temperatura aproximadamente cada 30-60 segundos. Cuando un recipiente alcanzó 102 °C según las lecturas del termómetro, se mantuvo en el baño de arena durante un periodo de mantenimiento de 10 segundos. Tras los pasos de calentamiento y mantenimiento, los recipientes se transfirieron a un baño de agua a temperatura ambiente hasta que la lectura de temperatura del termómetro alcanzó 35 °C. Después del tratamiento térmico, 15 ml de cada muestra se transfirieron a un vial para realizar mediciones de turbidez y visuales.

Mediciones de precipitación

La precipitación de las muestras de medios se analizó antes y después del tratamiento térmico por dos procedimientos: 1) medición de turbidez mediante un turbidímetro (2100Q Hach); y 2) centrifugación de las muestras en tubos Falcon de 50 ml a 10 000 x g durante 10 minutos (Sorvall RC 6 plus, rotor SS-34) para obtener el sedimento de precipitado para la identificación visual y la determinación cualitativa de precipitación basada en el tamaño de gránulo (por ejemplo, cantidad nula, baja, moderada o alta de precipitado visible). Las muestras no centrifugadas también se analizaron para la identificación visual de la precipitación.

Resultados

A partir de los perfiles de calentamiento en baño de arena y HTST se realizaron dos observaciones principales: 1) el perfil de calentamiento del sistema de tratamiento térmico en baño de arena fue considerablemente más largo que el de las operaciones del skid HTST a mayor escala y 2) el baño de arena fue capaz de alcanzar el punto objetivo de 102°C en aproximadamente 6,5 minutos (Fig. 2). Los perfiles de calentamiento del procedimiento en baño de arena variaron consistentemente de 5 a 8 minutos con un tiempo promedio de ~6 a ~6,5 minutos para calentar desde la temperatura ambiente (~21 a 25 °C) o 37 °C hasta el valor objetivo de 102 °C para el mantenimiento de 10 segundos antes de enfriar las muestras en un baño de agua. En cuanto a los sistemas HTST de flujo continuo a escala piloto o de fabricación, el área bajo la curva para el calentamiento, el mantenimiento y el enfriamiento fue considerablemente mayor en el procedimiento en baño de arena. Se determinó que las muestras de medios del procedimiento en baño de arena eran el peor caso de exposición térmica total en relación con las operaciones HTST a escala piloto y de fabricación. Por lo tanto, cualquier cambio significativo en los componentes de una formulación de medio determinada impulsado principalmente por la exposición térmica en el procedimiento en baño de arena proporcionaría datos relevantes para tratamientos HTST a escalas más grandes.

Se observó que, durante el tratamiento HTST, la disminución del pH de la formulación del medio de alimentación (Medio 1) desde pH 7,0 a pH 6,4 podría aliviar cualquier problema operativo de HTST (Tabla 3). Del mismo modo, en el caso de la formulación del medio basal (Medio 2), se encontró que el tratamiento del medio a un pH de 6,7 en lugar de pH 7,0 también aliviaría cualquier problema operativo (Tabla 3). Estos medios se procesaron cada uno a los dos niveles de pH en el procedimiento en baño de arena para determinar si el procedimiento en baño de arena podría reflejar de forma precisa el comportamiento de precipitación que se produjo en las operaciones de tratamiento HTST a escala. Las mediciones visuales antes y después del tratamiento térmico indicaron que el sistema de baño de arena demostró con precisión el comportamiento de precipitación debido al tratamiento térmico para medios con conocidos problemas de compatibilidad con HTST en el procesamiento a pH neutro (Fig. 3A y B). En consonancia con "el peor caso" para cambios basados en la exposición térmica de los medios, el Medio 2 todavía mostraba signos de precipitación a pH 6,7 en el baño de arena a pesar de que se había mejorado significativamente en relación con la muestra tratada a pH 7.0 del mismo medio. En general, estos resultados validaron el uso del procedimiento en baño de arena para detectar e identificar formulaciones de medios que sean compatibles para su uso en tratamiento HTST a escala piloto y de fabricación.

Ejemplo 2: Los niveles de pH, calcio y fosfato contribuyen a la precipitación en los medios durante el tratamiento térmico para inactivación vírica.

Materiales y procedimientos

Preparación de medios

Los medios utilizados en este estudio incluyen medios basales de producción y medios de alimentación discontinua a niveles de pH en un intervalo de aproximadamente pH 5,9 a aproximadamente pH 7,5, intervalos de concentración de calcio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 3,5 mM (o mayor en los medios indefinidos) e intervalos de concentración de fosfato de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 6,5 mM (o mayor en los medios indefinidos). Todos los medios se prepararon utilizando agua purificada desionizada procesada a través de un sistema de purificación de agua ultrapura Millipore SuperQ. Los medios se prepararon utilizando los caldos de medio en polvo apropiado (SAFC y Life Technologies). Se utilizaron una sonda de pH de electrodo de vidrio (Mettler Toledo) y un osmómetro (Advanced Instruments) durante las preparaciones líquidas para garantizar el pH y la osmolalidad objetivo de una preparación dada. Tras la disolución completa de los componentes y los ajustes finales de pH y osmolalidad, los medios se filtraron usando filtros de membrana PES de tamaño de poro de 0,1 µm en frascos que variaban desde 250 ml a 1 l (Corning) para las preparaciones a pequeña escala.

Ajuste del pH

La desviación de pH debida a la liberación de gases que se produjo durante el tiempo transcurrido entre la finalización de la preparación del medio y la aplicación del tratamiento térmico se corrigió. Antes del tratamiento térmico, una alícuota de 30 ml de cada preparación de medio se transfirió a tubos de 50 ml (Falcon) y las tapas de los tubos Falcon originales se reemplazaron por tapas ventiladas de matraces Erlenmeyer de 250 ml de Corning. Los tubos se colocaron a continuación en una incubadora con corriente de CO₂ durante 30 minutos para reducir el pH (CO₂ al 15 % para muestras a pH 6.2 y CO₂ al 12 % para las demás muestras, 200 rpm, 37 °C); este paso fue capaz de reducir el pH por debajo del valor objetivo. Los tubos se agitaron manualmente mientras se monitorizaba el pH utilizando una

sonda de pH con electrodo de vidrio y un medidor (Mettler Toledo) hasta que el pH volvió de nuevo a un valor por encima del pH objetivo. Las mediciones finales de pH se realizaron con un analizador NOVA bioprofiler.

Procedimiento en baño de arena

Para el procedimiento en baño de arena, 22 ml de medio líquido preparado se transfirieron a recipientes a presión de vidrio de 20 ml (vidrio Ace). Los recipientes se sellaron con una tapa roscada con vaina (thermowell) para que no quede ningún espacio de cabeza de aire en el recipiente al llenarlo completamente y permitir que el exceso de medio sea desplazado por la tapa y el thermowell. El exterior del recipiente se limpió para evitar el ensuciamiento de la superficie exterior con los medios expuestos directamente a la matriz de la fuente de calor. Se utilizó cinta de teflón para cubrir la interfaz entre el borde del recipiente de vidrio y la tapa roscada para mejorar el sellado del recipiente de vidrio a presión y evitar que la arena o el aceite del depósito del termopar entraran en contacto con las muestras para el tratamiento térmico. Se configuró un baño de arena fluidizado (Techne SBS-4) con regulador de temperatura (Techne TC-8D) (presión de entrada de aire comprimido = 5 kPa, temperatura del baño = 110 °C) y se dejó equilibrar durante 30 minutos. Los termopares conectados a un único termómetro digital VWR se insertaron en los thermowells de los recipientes de muestra geoméricamente situados en el centro de la dimensión radial del tubo. Se añadió aceite de silicona al depósito del termopar para proporcionar un medio de transferencia de calor entre la pared de vidrio del depósito del termopar y el termopar. Los recipientes de las muestras se colocaron en el baño de arena y se puso en marcha un temporizador. Se registraron datos cinéticos de temperatura aproximadamente cada 30-60 segundos. Cuando un recipiente alcanzó 102 °C según las lecturas del termómetro, se mantuvo en el baño de arena durante un periodo de mantenimiento de 10 segundos. Tras los pasos de calentamiento y mantenimiento, los recipientes se transfirieron a un baño de agua a temperatura ambiente hasta que la lectura de temperatura del termómetro alcanzó 35 °C. Después del tratamiento térmico, 15 ml de cada muestra se transfirieron a un vial para realizar mediciones de turbidez y visuales.

Mediciones de precipitación

La precipitación de las muestras de medios se analizó antes y después del tratamiento térmico por dos procedimientos: 1) medición de turbidez mediante un turbidímetro (2100Q Hach); y 2) centrifugación de las muestras en tubos Falcon de 50 ml a 10 000 x g durante 10 minutos (Sorvall RC 6 plus, rotor SS-34) para obtener el sedimento de precipitado para la identificación visual y la determinación cualitativa de precipitación basada en el tamaño de gránulo (por ejemplo, cantidad nula, baja, moderada o alta de precipitado visible). Las muestras no centrifugadas también se analizaron para la identificación visual de la precipitación.

Resultados

Se prepararon varias formulaciones de medios con niveles variables de valores de pH, así como de concentraciones de calcio y de fosfato (Tabla 4). La precipitación de los medios preparados se evaluó antes y después del tratamiento térmico mediante observaciones visuales de las muestras no centrifugadas y centrifugadas, y mediante mediciones de turbidez.

Tabla 4. Formulaciones de medios sometidas a prueba de precipitación en el procedimiento en baño de arena

Descripción de los medios	pH real	pH objetivo	Precipitación (Sí / No)	Turbidez (NTU)	[Ca] mM	[PO ₄] mM	Relación [Ca]/[PO ₄]
Medio 1† (alimentado, indefinido)	7,00	7,00	Sí	50,7	3,5	3,17	1,10
	n/d	6,90	Sí	n/d	3,5	3,17	1,10
	n/d	6,50	Sí	n/d	3,5	3,17	1,10
	6,40	6,40	No	1,2	3,5	3,17	1,10
	n/d	6,20	No	n/d	3,5	3,17	1,10
Medio 2† (basal, indefinido)	7,00	7,00	Sí	100,2	2,1	1,9	1,11
	6,68	6,70	Sí	37,5	2,1	1,9	1,11
Medio 3 (basal, definido)	7,05	7,00	Sí	8,3	1,5	3	0,50
Medio 4 (basal, definido)	n/d	7,20	Sí	n/d	1,5	3	0,50
	7,11	7,10	Sí	23,0	1,5	3	0,50
	6,93	6,70	No	19,11	1,5	3	0,50
	6,35	6,30	No	2,94	1,5	3	0,50
Medio 5† (basal, indefinido)	7,02	7,00	Sí	20,5	1,3	2,6	0,5
Medio 6 (basal, definido)	7,07	7,10	No	1,0	0,42	2,54	0,17

Medio 7 (basal, definido)	7,00	7,00	No	0,5	0,4	4,15	0,10
Medio 8 (alimentado, definido)	7,04	7,00	No	0,2	0	30	0
Medio 9 (alimentado, definido)	6,90	7,20	No	0,2	0	30	0
	6,50	6,50	No	1,1	0	30	0
Medio 10 (basal, indefinido)	n/d	7,20	Sí	n/d	2,3	2,9	n/d
	n/d	6,70	Sí	n/d	2,3	2,9	n/d
	n/d	6,20	Sí	n/d	2,3	2,9	n/d

† = para los Medios 1, 2, 5 y 10, la contribución del hidrolizado/peptona no está incluida en la estimación de las concentraciones de calcio y fósforo.

n/d indica no disponible.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

La medición de precipitación en las muestras indicó que los datos obtenidos por el procedimiento en baño de arena reflejan un escenario posible para la exposición térmica total en relación con las operaciones de tratamiento HTST, ya que las formulaciones del Medio 4 y del Medio 5, que previamente no habían mostrado problemas operacionales en el tratamiento HTST a escala piloto o de fabricación, mostraron turbidez medible y precipitación visible en el procedimiento en baño de arena. A través del procedimiento en baño de arena, se determinó que las concentraciones de calcio y fósforo y los niveles de pH son componentes de las formulaciones de medios que contribuyen a provocar cambios significativos en los medios durante la exposición térmica a al menos 102 °C. En varias formulaciones, la reducción de los niveles de pH sin modificar las concentraciones de calcio y fósforo dio lugar a una menor turbidez (Tabla 4). Además, las formulaciones sin calcio o con bajas concentraciones de calcio tampoco mostraron eventos de precipitación y no se obtuvieron mediciones de alta turbidez incluso a pH neutro (Tabla 4). Se observó una correlación entre la precipitación reducida y la menor proporción entre el calcio y el fósforo, además de con las menores concentraciones de calcio y de fósforo (Tabla 4). Estas observaciones condujeron a la determinación de que la formación de precipitados de fósforo de calcio tras el calentamiento y el enfriamiento que se llevan a cabo durante el tratamiento térmico es una función de la concentración de calcio, la concentración de fósforo y los niveles de pH.

El Medio 4 se eligió para un diseño de los experimentos (DoE) con todos los factores para el análisis multivariante de formulaciones sometidas a tratamiento térmico en el sistema de baño de arena y se utilizó la medida de respuesta a la turbidez (NTU) para generar una superficie de respuesta a la precipitación. Las variables que se variaron fueron la concentración de calcio (0,1 a 2,9 mM), la concentración de fósforo (0,1 a 5,9 mM) y el pH (6,0 a 7,2). Las estimaciones de los parámetros ordenados determinadas mediante mediciones de turbidez y confirmadas mediante observaciones visuales, identificaron que la formación de fósforo de calcio dependiente del pH tras el tratamiento térmico de una formulación de medio que contiene calcio y fósforo da como resultado la formación de precipitación en el medio (Fig. 4). El efecto que más influye en la precipitación del medio es el producto vectorial de la concentración de calcio y de fósforo (Fig. 4). Esto está de acuerdo con la cinética de reacción esperada de las formas insolubles de fósforo de calcio que depende de la concentración de calcio y de fósforo. Además, la estimación de la turbidez a partir del producto de las concentraciones de calcio y de fósforo también está de acuerdo con la observación de que, si la concentración de calcio o la concentración de fósforo son cero, no se producirá ningún incremento significativo de la turbidez (como una estimación de la compatibilidad con HTST).

Posteriormente, se realizó una modelización de una superficie de respuesta a partir de los datos de turbidez y de los insumos (concentración de calcio, concentración de fósforo y pH) de los DoE. El punto de corte para un régimen operativo bueno frente a un régimen operativo malo en el peor caso de tratamiento térmico en baño de arena elegido fue una turbidez de 5 NTU basándose en el análisis de todos los valores de turbidez relativos a la precipitación visible observada durante la inspección visual de muestras de medios sometidas a tratamiento térmico centrifugadas y no centrifugadas. Los datos sugieren que son posibles múltiples opciones o palancas para la modificación de una formulación de medio para garantizar la compatibilidad con HTST. En particular, la reducción de la concentración de calcio, la concentración de fósforo, el pH, o alguna combinación de los tres parámetros fueron todas las palancas potenciales para la obtención de una formulación de medio que fuera compatible para el tratamiento HTST u otros procedimientos de tratamiento térmico (Fig. 5).

Basándose en la superficie de respuesta modelizada generada a partir de los datos del Medio 4 sometido a tratamiento térmico, la estabilidad de los medios en los estudios de tratamiento térmico en baño de arena resultó ser particularmente dependiente de las concentraciones de calcio y de fósforo, así como de los niveles de pH. Para determinar modificaciones en otras formulaciones de medios que permitirían pasar de un medio incompatible con HTST a un medio compatible con HTST, otras formulaciones de medios que no comprenden hidrolizado (Medio 3, Medio 4, Medio 6, Medio 7, Medio 8, Medio 9, Medio 11, Medio 12 y Medio 13) se representaron en el modelo de superficie de respuesta basándose en sus concentraciones de calcio y fósforo a un pH de 7,0 (Fig. 6). Los medios que contenían hidrolizado añadieron complejidad al análisis debido a los niveles variables de calcio y fósforo. El Medio 11

caía en el área de superficie de respuesta que indicaba que estaba fuera del intervalo de precipitación y, por lo tanto, se determinó que era probable que fuera un medio compatible con HTST (Fig. 6, punto C). La adición de hidrolizado el Medio 11 para la producción del Medio 5 (Tabla 4) y, basándose en las estimaciones conocidas de los niveles de fosfato y de calcio en el hidrolizado, dio lugar a un desplazamiento del medio hacia el intervalo de precipitación y, por lo tanto, a la probabilidad de que fuera un medio incompatible con HTST (Fig. 6, flecha en punto C). El Medio 12 estaba dentro del intervalo de precipitación y, basándose en el modelo, se predijo que la adición de hidrolizado para la producción del Medio 2 (Tabla 4) desplazaría el medio aún más hacia el intervalo de precipitación (Fig. 6, flecha en punto D). Las formulaciones que se preveía que estuvieran dentro o fuera del intervalo de precipitación basándose en el modelo de superficie de respuesta se correlacionaron con precipitación visible tras el tratamiento térmico en baño de arena, incluyendo las dos formulaciones que tenían problemas de ensuciamiento del intercambiador de calor en las operaciones del skid HTST a escala de fabricación. El uso de los modelos de superficie de respuesta generados indicó que había una fuerte correlación entre la presencia de precipitación en la formulación de medio de cultivo celular tras el tratamiento térmico y las altas concentraciones de calcio y fosfato a pH casi neutro (Fig. 5 y 6). Además, se pueden generar modelos de superficie de respuesta basados en los datos del baño de arena para proporcionar una recomendación de cambios que se pueden realizar en la formulación para convertir medios incompatibles con HTST en medios compatibles con HTST.

Ejemplo 3: Efecto de la temperatura sobre el comportamiento de precipitación de los medios durante la inactivación vírica.

Materiales y procedimientos

Preparación de medios

Los medios utilizados en este estudio incluyen medios de producción basales y medios de alimentación discontinua. Todos los medios se prepararon utilizando agua purificada desionizada procesada a través de un sistema de purificación de agua ultrapura Millipore SuperQ. Los medios se prepararon utilizando los caldos de medio en polvo apropiado (SAFC y Life Technologies). Se utilizaron una sonda de pH de electrodo de vidrio (Mettler Toledo) y un osmómetro (Advanced Instruments) durante las preparaciones líquidas para garantizar el pH y la osmolalidad objetivo de una preparación dada. Tras la disolución completa de los componentes y los ajustes finales de pH y osmolalidad, los medios se filtraron usando filtros de membrana PES de tamaño de poro de 0,1 µm en frascos que variaban desde 250 ml a 1 l (Corning) para las preparaciones a pequeña escala.

Ajuste del pH

La desviación de pH debida a la liberación de gases que se produjo durante el tiempo transcurrido entre la finalización de la preparación del medio y la aplicación del tratamiento térmico se corrigió. Antes del tratamiento térmico, una alícuota de 30 ml de cada preparación de medio se transfirió a tubos de 50 ml (Falcon) y las tapas de los tubos Falcon originales se reemplazaron por tapas ventiladas de matraces Erlenmeyer de 250 ml de Corning. Los tubos se colocaron a continuación en una incubadora con corriente de CO₂ durante 30 minutos para reducir el pH (CO₂ al 15 % para muestras a pH 6.2 y CO₂ al 12 % para las demás muestras, 200 rpm, 37 °C); este paso fue capaz de reducir el pH por debajo del valor objetivo. Los tubos se agitaron manualmente mientras se monitorizaba el pH utilizando una sonda de pH con electrodo de vidrio y un medidor (Mettler Toledo) hasta que el pH volvió de nuevo a un valor por encima del pH objetivo. Las mediciones finales de pH se realizaron con un analizador NOVA bioprofiler.

Procedimiento en baño de arena

Para el procedimiento en baño de arena, 22 ml de medio líquido preparado se transfirieron a recipientes a presión de vidrio de 20 ml (vidrio Ace). Los recipientes se sellaron con una tapa roscada con vaina (thermowell) para que no quede ningún espacio de cabeza de aire en el recipiente al llenarlo completamente y permitir que el exceso de medio sea desplazado por la tapa y el thermowell. El exterior del recipiente se limpió para evitar el ensuciamiento de la superficie exterior con los medios expuestos directamente a la matriz de la fuente de calor. Se utilizó cinta de teflón para cubrir la interfaz entre el borde del recipiente de vidrio y la tapa roscada para mejorar el sellado del recipiente de vidrio a presión y evitar que la arena o el aceite del depósito del termopar entraran en contacto con las muestras para el tratamiento térmico. Se configuró un baño de arena fluidizado (Techne SBS-4) con regulador de temperatura (Techne TC-8D) (presión de entrada de aire comprimido = 5 kPa, temperatura del baño = 110 °C) y se dejó equilibrar durante 30 minutos. Los termopares conectados a un único termómetro digital VWR se insertaron en los thermowells de los recipientes de muestra geoméricamente situados en el centro de la dimensión radial del tubo. Se añadió aceite de silicona al depósito del termopar para proporcionar un medio de transferencia de calor entre la pared de vidrio del depósito del termopar y el termopar. Los recipientes de las muestras se colocaron en el baño de arena y se puso en marcha un temporizador. Se registraron datos cinéticos de temperatura aproximadamente cada 30-60 segundos. Cuando un recipiente alcanzó 102 °C según las lecturas del termómetro, se mantuvo en el baño de arena durante un periodo de mantenimiento de 10 segundos. Tras los pasos de calentamiento y mantenimiento, los recipientes se transfirieron a un baño de agua a temperatura ambiente hasta que la lectura de temperatura del termómetro alcanzó 35 °C. Después del tratamiento térmico, 15 ml de cada muestra se transfirieron a un vial para realizar mediciones de turbidez y visuales.

Mediciones de precipitación

La precipitación de las muestras de medios se analizó antes y después del tratamiento térmico por dos procedimientos: 1) medición de turbidez mediante un turbidímetro (2100Q Hach); y 2) centrifugación de las muestras en tubos Falcon de 50 ml a 10 000 x g durante 10 minutos (Sorvall RC 6 plus, rotor SS-34) para obtener el sedimento de precipitado para la identificación visual y la determinación cualitativa de precipitación basada en el tamaño de gránulo (por ejemplo, cantidad nula, baja, moderada o alta de precipitado visible). Las muestras no centrifugadas también se analizaron para la identificación visual de la precipitación.

Resultados

El efecto de la temperatura sobre la precipitación del medio se estudió adicionalmente mediante la variación del punto de ajuste objetivo para el calentamiento en el sistema de baño de arena. Las mediciones se realizaron a temperaturas de aproximadamente 75, 85, 90, 97 y 102 °C para el Medio 1 (alimentado, indefinido), el Medio 2 (basal, indefinido), el Medio 4 (basal, definido) y el Medio 10 (basal, indefinido), todos ellos formulados a pH neutro de 7,0. La inspección visual de las muestras no centrifugadas y centrifugadas tomadas a lo largo de la curva de calentamiento demostró que las cuatro formulaciones de medios diferentes presentaban eventos de precipitación en el momento en que las muestras alcanzaban 90 °C (Fig. 7, círculos rellenos). El Medio 4 y el Medio 10 continuaron mostrando eventos de precipitación a temperaturas más bajas de 85 °C y 75 °C (Fig. 7, círculos rellenos). El Medio 2 mostró eventos de precipitación a 85 °C durante el tratamiento térmico, pero no produjo precipitados visibles a 75 °C, lo que indica que el Medio 2 es compatible con el tratamiento térmico a una temperatura de aproximadamente 75 °C o menos (Fig. 7, círculo vacío). El Medio 1 no produjo precipitación a 85 °C lo que indica que el Medio 1 es compatible con el tratamiento térmico a temperaturas de aproximadamente 85 °C o menos (Fig. 7, círculo vacío). Estas observaciones se confirmaron con las mediciones de turbidez, que demostraron que las cuatro formulaciones de medios diferentes tenían una medida de turbidez de aproximadamente 20 NTU o mayor en el momento en que las muestras alcanzaban 90 °C (Fig. 8). Los valores de turbidez de los medios sometidos a tratamiento térmico disminuyeron al pasar de 97 °C a 102 °C para los Medios 2, 4 y 10 (Fig. 8). La turbidez de una solución como la de los medios es una función de la distribución de tamaño de partícula y, en particular, un intervalo específico de tamaños de partículas coloidales será más activo en la medición que otras partes de la distribución de tamaños. Por lo tanto, es posible que la disminución en la turbidez medida a la temperatura más alta sea un resultado del comportamiento de floculación/agregación de partículas que conduce a un cambio en la distribución de tamaño de partícula que produce un artefacto en los datos de turbidez (por ejemplo, mayor tamaño de partícula pero menor cantidad). Estos resultados indicaron que una ligera reducción de la temperatura mientras todavía se mantiene la inactivación de virus no redujo significativamente la turbidez.

Se requieren temperaturas superiores a 85 °C a 90 °C en periodos de mantenimiento relevantes de la operación de HTST a gran escala para que un procedimiento de inactivación de virus sea eficaz y se requieren temperaturas superiores a 95 °C para lograr las reducciones logarítmicas deseadas para los parvovirus de interés industrial. Aunque el procedimiento en baño de arena es más riguroso para la observación de eventos de precipitación de medios derivados del tratamiento térmico, los datos sugieren que se puede usar una operación a una temperatura menor que el punto de ajuste objetivo actual del tratamiento HTST de 102 °C para evitar eventos de precipitaciones que conducen al ensuciamiento de los intercambiadores de calor. Puesto que el propósito del tratamiento HTST es la inactivación vírica, es evidente que la reducción del punto de ajuste de temperatura objetivo no es una opción y que, para diversas formulaciones de medios, la precipitación es un problema operativo potencial para aplicaciones de HTST en los medios. Por lo tanto, las concentraciones de calcio y de fosfato, así como los niveles de pH, son componentes que se pueden ajustar para reducir o prevenir eventos de precipitación durante la inactivación vírica de los medios mediante el tratamiento HTST a temperaturas de al menos 90 °C.

Ejemplo 4: Los niveles de pH, calcio y fosfato contribuyen a la precipitación en los medios durante el tratamiento HTST de medios a escala piloto y a gran escala para la inactivación vírica.

Materiales y procedimientos

HTST a escala piloto

Para los estudios que utilizan HTST a escala piloto, las formulaciones de medios se procesaron desde la concentración más baja hasta la concentración más alta de calcio o de fosfato con el fin de minimizar la posible transferencia a ejecuciones posteriores. Cada ejecución HTST requirió 15 l a 20 l de medio para eliminar el agua de enjuague desionizada utilizada entre ejecuciones y para equilibrar la bobina de calentamiento a la temperatura de funcionamiento de 102 °C (intervalo aceptable: 97 °C-110 °C) para el proceso HTST. Tras el equilibrado, se procesaron aproximadamente 20 l de medio en el skid HTST y el flujo de salida se recogió en un contenedor de plástico. Se recogieron muestras del medio antes del tratamiento HTST del tanque de mezcla de medios y del medio de salida en el contenedor, y se filtraron a través de un filtro de membrana de cápsula de PVDF de 0,1 µm (Millipore) a una bolsa de almacenamiento del medio para servir como las muestras "Pre-HTST" y "Post-HTST". Todas las muestras de medios filtrados procesadas y no procesadas se almacenaron entonces a 2-8 °C antes de su uso en

ensayos de rendimiento de cultivo celular y pruebas analíticas.

HTST a escala de fabricación

- 5 Se utilizó una preparación de Medio 4 o Medio 1 de 1800 l para una ejecución de ingeniería a escala de fabricación para el tratamiento térmico de medios con un skid HTST a escala de fabricación. El propósito de esta preparación de medios fue determinar: 1) si las condiciones de mezcla para la fabricación para el Medio 4 eran suficientes para cumplir con los tiempos de mezcla de la receta de control de calidad especificados, y 2) para generar datos de rendimiento del tratamiento HTST a escala de fabricación del Medio 4. Se recogieron muestras del medio antes y después del tratamiento HTST mediante la conexión aséptica de los colectores de bolsas de recogida de medio de 6 x 20 l (Sartorius Stedim Biotech) a los puertos de toma de muestras del tanque de mezcla de medios y al biorreactor de destino. Para las muestras tomadas antes del tratamiento HTST, los medios se filtraron a través de un filtro de membrana de cápsula de PVDF de 0,1 µm (Millipore) antes de la recogida y, para las muestras tomadas después de la HTST, los medios se pasaron a través de la serie de filtros de fabricación que consiste en un cartucho filtrante de PVDF de doble capa 0,5/0,2 µm pre-filtro (Millipore) y un filtro final de 0,1 µm de nylon (Pall) antes de la recolección. Las muestras se utilizaron entonces para los ensayos de rendimiento de cultivo de células y pruebas analíticas.

Resultados

- 20 En las operaciones HTST a escala piloto y a escala de fabricación no se produjeron eventos durante el proceso que condujeran al apagado del skid HTST o a dificultades para controlar la temperatura de salida cuando se procesaron volúmenes deseados de Medio 4. Por lo tanto, no había ninguna indicación de eventos de precipitación suficientemente importantes como para provocar el ensuciamiento de las superficies del intercambiador de calor o en la posterior filtración. El Medio 4 procesado a escala piloto estaba visualmente libre de partículas antes de la filtración final y de su uso en el cultivo de células. No se pudieron tomar muestras del Medio 4 procesado a escala de fabricación antes de la filtración final debido a la disposición de los puertos de muestreo para el sistema. Se realizaron pruebas de rendimiento del cultivo celular y pruebas analíticas en el Medio 4 con y sin el tratamiento HTST. Las pruebas analíticas realizadas en el Medio 4 mostraron que se estaban produciendo pérdidas de metales traza en el tratamiento HTST lo que sugiere que se estaban produciendo eventos de precipitación que modifican las concentraciones de los componentes de los medios sin conducir a una precipitación suficiente para generar dificultades operativas durante el tratamiento HTST. En el tratamiento HTST a escala de fabricación del Medio 4, los datos de los ensayos de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) mostraron una pérdida de Fe (hierro) de un 24 % y una pérdida de Cu (cobre) de un 16 % tras un tratamiento térmico en relación con el Medio 4 no sometido a tratamiento térmico (Fig. 9).

- En las operaciones HTST a escala piloto y a escala de fabricación se produjeron eventos durante el proceso que condujeron al apagado del skid HTST y a dificultades para controlar la temperatura de salida cuando se procesaron volúmenes deseados de Medio 1 a pH 7,10. Los eventos de precipitación fueron suficientemente significativos para dar lugar al ensuciamiento de las superficies del intercambio de calor. El Medio 1 procesado a escala piloto presentaba partículas antes de la filtración final y de su uso en el cultivo de células. No se pudieron tomar muestras del Medio 1 procesado a escala de fabricación antes de la filtración final debido a la disposición de los puertos de muestreo para el sistema. El ajuste del pH del Medio 1 a aproximadamente pH 6,34 redujo la precipitación. En las operaciones HTST a escala piloto y a escala de fabricación no se produjeron eventos durante el proceso que condujeran al apagado del skid HTST o a dificultades para controlar el punto de ajuste de temperatura de salida cuando se procesaron volúmenes deseados de Medio 1 a pH 6,34. Por lo tanto, no había ninguna indicación de eventos de precipitación suficientemente importantes como para provocar el ensuciamiento de las superficies del intercambiador de calor. El Medio 1 procesado a escala piloto estaba visualmente libre de partículas antes de la filtración final y de su uso en el cultivo de células. No se pudieron tomar muestras del Medio 1 procesado a escala de fabricación antes de la filtración final debido a la disposición de los puertos de muestreo para el sistema.

Ejemplo 5: Los niveles de pH, calcio y fosfato contribuyen a la pérdida de metales traza en los medios durante el tratamiento térmico para inactivación vírica.

55 Materiales y procedimientos

Preparación de medios

- 60 Los medios utilizados en este estudio incluyen medios basales de producción y medios de alimentación discontinua a niveles de pH en un intervalo de aproximadamente pH 5,9 a aproximadamente pH 7,5, intervalos de concentración de calcio de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 3,5 mM (o mayor en los medios indefinidos), intervalos de concentración de fosfato de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 6,5 mM (o mayor en los medios indefinidos) e intervalos de concentración de hierro de aproximadamente 0 µM a aproximadamente 125 µM (o mayor en los medios indefinidos). Todos los medios se prepararon utilizando agua purificada desionizada procesada a través de un sistema de purificación de agua ultrapura Millipore SuperQ. Los medios se prepararon utilizando los caldos de medio en polvo apropiado (SAFC y Life Technologies). Se utilizaron una sonda de pH de electrodo de vidrio (Mettler Toledo)

y un osmómetro (Advanced Instruments) durante las preparaciones líquidas para garantizar el pH y la osmolalidad objetivo de una preparación dada. Tras la disolución completa de los componentes y los ajustes finales de pH y osmolalidad, los medios se filtraron usando filtros de membrana PES de tamaño de poro de 0,1 µm en frascos que variaban desde 250 ml a 1 l (Corning) para las preparaciones a pequeña escala.

Ajuste del pH

La desviación de pH debida a la liberación de gases que se produjo durante el tiempo transcurrido entre la finalización de la preparación del medio y la aplicación del tratamiento térmico se corrigió. Antes del tratamiento térmico, una alícuota de 30 ml de cada preparación de medio se transfirió a tubos de 50 ml (Falcon) y las tapas de los tubos Falcon originales se reemplazaron por tapas ventiladas de matraces Erlenmeyer de 250 ml de Corning. Los tubos se colocaron a continuación en una incubadora con corriente de CO₂ durante 30 minutos para reducir el pH (CO₂ al 15 % para muestras a pH 6.2 y CO₂ al 12 % para las demás muestras, 200 rpm, 37 °C); este paso fue capaz de reducir el pH por debajo del valor objetivo. Los tubos se agitaron manualmente mientras se monitorizaba el pH utilizando una sonda de pH con electrodo de vidrio y un medidor (Mettler Toledo) hasta que el pH volvió de nuevo a un valor por encima del pH objetivo. Las mediciones finales de pH se realizaron con un analizador NOVA bioprofiler.

Procedimiento en baño de arena

Para el procedimiento en baño de arena, 22 ml de medio líquido preparado se transfirieron a recipientes a presión de vidrio de 20 ml (vidrio Ace). Los recipientes se sellaron con una tapa roscada con vaina (thermowell) para que no quede ningún espacio de cabeza de aire en el recipiente al llenarlo completamente y permitir que el exceso de medio sea desplazado por la tapa y el thermowell. El exterior del recipiente se limpió para evitar el ensuciamiento de la superficie exterior con los medios expuestos directamente a la matriz de la fuente de calor. Se utilizó cinta de teflón para cubrir la interfaz entre el borde del recipiente de vidrio y la tapa roscada para mejorar el sellado del recipiente de vidrio a presión y evitar que la arena o el aceite del depósito del termopar entraran en contacto con las muestras para el tratamiento térmico. Se configuró un baño de arena fluidizado (Techne SBS-4) con regulador de temperatura (Techne TC-8D) (presión de entrada de aire comprimido = 5 kPa, temperatura del baño = 110 °C) y se dejó equilibrar durante 30 minutos. Los termopares conectados a un único termómetro digital VWR se insertaron en los thermowells de los recipientes de muestra geoméricamente situados en el centro de la dimensión radial del tubo. Se añadió aceite de silicona al depósito del termopar para proporcionar un medio de transferencia de calor entre la pared de vidrio del depósito del termopar y el termopar. Los recipientes de las muestras se colocaron en el baño de arena y se puso en marcha un temporizador. Se registraron datos cinéticos de temperatura aproximadamente cada 30-60 segundos. Cuando un recipiente alcanzó 102 °C según las lecturas del termómetro, se mantuvo en el baño de arena durante un periodo de mantenimiento de 10 segundos. Tras los pasos de calentamiento y mantenimiento, los recipientes se transfirieron a un baño de agua a temperatura ambiente hasta que la lectura de temperatura del termómetro alcanzó 35 °C. Después del tratamiento térmico, 15 ml de cada muestra se transfirieron a un vial para realizar mediciones de turbidez y visuales.

HTST a escala piloto

Para los estudios que utilizan HTST a escala piloto, las formulaciones de medios se procesaron desde la concentración más baja hasta la concentración más alta de calcio o de fosfato con el fin de minimizar la posible transferencia a ejecuciones posteriores. Cada ejecución HTST requirió 15 l a 20 l de medio para eliminar el agua de enjuague desionizada utilizada entre ejecuciones y para equilibrar la bobina de calentamiento a la temperatura de funcionamiento de 102 °C (intervalo aceptable: 97 °C-110 °C) para el proceso HTST. Tras el equilibrado, se procesaron aproximadamente 20 l de medio en el skid HTST y el flujo de salida se recogió en un contenedor de plástico. Se recogieron muestras del medio antes del tratamiento HTST del tanque de mezcla de medios y del medio de salida en el contenedor, y se filtraron a través de un filtro de membrana de cápsula de PVDF de 0,1 µm (Millipore) a una bolsa de almacenamiento del medio para servir como las muestras "Pre-HTST" y "Post-HTST". Todas las muestras de medios filtrados procesadas y no procesadas se almacenaron entonces a 2-8 °C antes de su uso en ensayos de rendimiento de cultivo celular y pruebas analíticas.

HTST a escala de fabricación

Se utilizó una preparación de Medio 4 de 1800 l para una ejecución de ingeniería en apoyo de una campaña de producción de anticuerpos y se utilizó el skid HTST U1281 a escala de fabricación para tratar el medio. El propósito de esta preparación de medios fue determinar: 1) si las condiciones de mezcla para el Medio 4 eran suficientes para cumplir con los tiempos de mezcla de la receta especificados, y 2) para generar datos de rendimiento del tratamiento HTST a escala de fabricación del Medio 4. Se recogieron muestras del medio antes y después del tratamiento HTST mediante la conexión aséptica de los colectores de bolsas de recogida de medio de 6 x 20 l (Sartorius Stedim Biotech) a los puertos de toma de muestras del tanque de mezcla de medios y al biorreactor de destino. Para las muestras tomadas antes del tratamiento HTST, los medios se filtraron a través de un filtro de membrana de cápsula de PVDF de 0,1 µm (Millipore) antes de la recogida y, para las muestras tomadas después de la HTST, los medios se pasaron a través de la serie de filtros GMP que consiste en un cartucho filtrante de PVDF de doble capa 0,5/0,2 µm pre-filtro (Millipore) y un filtro final 0,1 µm de nylon (Pall) antes de la recolección. Las muestras se utilizaron entonces para los

ensayos de rendimiento de cultivo de células y pruebas analíticas.

Mediciones de precipitación

- 5 La precipitación de las muestras de medios se analizó antes y después del tratamiento térmico por dos procedimientos: 1) medición de turbidez mediante un turbidímetro (2100Q Hach); y 2) centrifugación de las muestras en tubos Falcon de 50 ml a 10 000 x g durante 10 minutos (Sorvall RC 6 plus, rotor SS-34) para obtener el sedimento de precipitado para la identificación visual y la determinación cualitativa de precipitación basada en el tamaño de gránulo (por ejemplo, cantidad nula, baja, moderada o alta de precipitado visible). Las muestras no centrifugadas también se analizaron para la identificación visual de la precipitación.

Análisis de los cambios en la concentración de componente de medios

- 15 Los sobrenadantes pre-HTST y post-HTST tratados se analizaron para detectar cualquier cambio significativo en las concentraciones de componentes de medios medibles. Los ensayos usados incluyen: medición de vitaminas solubles en agua, medición de aminoácidos y medición de fosfato inorgánico. Los oligoelementos se analizaron mediante dos ensayos diferentes de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Además, las muestras para el hierro, cobre y zinc se midieron mediante un ensayo de espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) para una cuantificación de mayor rendimiento de estos elementos. Todos los análisis estadísticos, en caso aplicable, se realizaron y representaron gráficamente utilizando el software JMP y Excel.

Resultados

- 25 Con el fin de comprender mejor las pérdidas de metales traza que se producen a las escalas de fabricación más grandes, se realizaron estudios en baño de arena usando el Medio 4 como una formulación de medio modelo. Para determinar si las pérdidas de metales traza estaban asociadas a los eventos de precipitación de fosfato de calcio en medios que contienen dichos componentes y que se procesan a pH neutro o superior, se generó un diseño semifactorial para evaluar el efecto de variar el pH, calcio (Ca), fosfato inorgánico (PO₄), hierro (Fe) y cobre (Cu) sobre los niveles de Fe y Cu recuperados tras un tratamiento térmico (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de componentes probados

Factores	Concentraciones
pH	5,9 – 7,5
Ca (mM)	0 – 3,5
PO ₄ (mM)	0 – 6,5
Fe (μM)	0 – 125
Cu (nM)	0 – 1750

Nota: Con la excepción de los factores anteriores, el resto de componentes del Medio 4 se encontraban en niveles normales

- 35 El análisis de la recuperación de metales traza demostró que los niveles altos de pH, Ca y PO₄ fueron los principales factores responsables de las pérdidas de Fe (Fig. 10). Un aumento de los niveles de uno cualquiera de estos tres factores conduce a menores recuperaciones de Fe. La concentración inicial de Fe muestra un efecto principal similar, pero menor en comparación con los niveles de pH, Ca, y PO₄, mientras que el nivel de Cu no muestra prácticamente ningún efecto sobre la recuperación de Fe. La importancia de los niveles de pH, Ca y PO₄ está de acuerdo con la posibilidad de que las pérdidas de Fe estén relacionados con eventos de precipitación de fosfato de calcio que no son perceptibles desde una perspectiva operacional (por ejemplo, no lo suficientemente importantes para causar problemas operativos en el skid HTST), pero que son perceptibles desde la perspectiva de los efectos adversos sobre el rendimiento de los medios de cultivo celular (por ejemplo, título de producto, crecimiento celular, viabilidad celular y calidad del producto).

- 45 Con el fin de explicar la varianza o dispersión en las principales representaciones gráficas de efectos, se generó un modelo factorial completo a partir de los datos usando los cuatro factores más potentes (pH, Ca, PO₄ y Fe). Los gráficos de interacciones de este análisis demuestran dos efectos de interacción que influyen en las recuperaciones de Fe después del tratamiento térmico: 1) pH*Ca y 2) pH*PO₄ (Fig. 11). Estos resultados sugieren que se requiere reducción de las concentraciones de calcio y fosfato, reducción de los niveles de pH o reducción de alguna combinación de los tres factores con el fin de generar formulaciones de medios que eviten pérdidas de Fe tras el tratamiento térmico. Además, estos datos demuestran que la pérdida de Fe se produce incluso cuando no se observa precipitación visible ni un aumento de la turbidez.

- 55 Un medio con niveles de sulfato ferroso en el intervalo de 75 a 150 μM (pero por lo demás equivalente al Medio 4) se sometió a pruebas para determinar el alcance de la relación entre los niveles de Fe post-HTST y los niveles iniciales de Fe. Los datos muestran una relación no lineal inesperada entre la concentración inicial de Fe y la concentración post-HTST de Fe (Fig. 12). Sin embargo, se descubrió que la muestra de Fe 125 μM experimentó una variación de pH en relación con las otras tres muestras. En ambos conjuntos de muestras, la muestra de Fe 125 μM tenía el pH más alto antes de la prueba HTST. El pH varió entre 7,08 y 7,17 y entre 7,09 y 7,14 para los conjuntos de muestras del

Ensayo 1 y del Ensayo 2.

Los resultados del experimento DoE sugirieron que el medio a pH 7,0 estaba cerca de producir un fallo en el sistema de tratamiento térmico en baño de arena y que la pérdida de Fe comienza a producirse por encima de pH 6,7. Preparaciones del Medio 4 con niveles de pH en el intervalo de 6,6 a 7,2 se sometieron a pruebas para caracterizar este régimen. La evidencia de que cualquier variación de pH (incluso una de tan solo una fracción de una unidad de pH) puede ser significativa en el sistema de tratamiento térmico en baño de arena se muestra en los datos de la valoración de pH a alta resolución (Fig. 13A). A partir de pH 6,8, la recuperación de Fe fue muy sensible al pH, cayendo rápidamente y llegando a una meseta a pH 7,2. Esta fuerte dependencia del pH sugirió que los resultados de las valoraciones de sulfato ferroso se habían confundido muy probablemente por la variabilidad del pH. También sugiere que un cambio muy pequeño en el pH (es decir, 0,2 unidades de pH) podría colocar las formulaciones de medios en un régimen en el que no se producen pérdidas de Fe.

Los resultados del experimento DoE también sugirieron que se podían conseguir grandes mejoras en la recuperación de Fe con cambios relativamente pequeños en los niveles de Ca y PO_4 (Fig. 13B). Preparaciones del Medio 4 con niveles de Ca y PO_4 que van desde 0,5 a 1,17 veces los niveles estándar del Medio 4 se sometieron a pruebas para cuantificar mejor los cambios en Ca y PO_4 que serían necesarios para conseguir el beneficio observado con anterioridad. Para esta valoración, la relación de los niveles de Ca y PO_4 se mantuvo constante a 0,5. El análisis de los datos gráficos demostró un perfil curvado con mayor pérdida de Fe cuanto mayores son los niveles de Ca y PO_4 (Fig. 13B). La formulación del Medio 4 se encuentra en la parte de la pendiente más pronunciada, donde es posible conseguir grandes mejoras en la recuperación de Fe con pequeños cambios en las concentraciones de Ca y PO_4 . Por ejemplo, la disminución de las concentraciones de Ca y PO_4 en un 30 % (y manteniendo la misma relación) puede dar lugar a una recuperación de Fe del 100 % tras un tratamiento térmico en baño de arena que se puede trasladar a un tratamiento HTST.

Si las pérdidas de metal traza se correlacionaron con la precipitación de fosfato de calcio, debería existir una relación entre la recuperación de calcio y fosfato y la recuperación de Fe. El análisis de los datos demostró que la recuperación de fosfato no muestra una relación clara con la recuperación de Fe cuando las recuperaciones de Fe eran bajas y se identificó precipitación (Fig. 14, los diamantes dentro de un círculo). Es posible que la detección de pequeñas diferencias de concentración en la muestra con alta concentración inicial relativa de fosfato fuera difícil debido a la relación señal-ruido. Relacionando esto con la posibilidad de que el fosfato de calcio estuviera interactuando con el hierro, una cantidad relativamente pequeña de fosfato podía ser eliminada en estequiometría 1:1 con el hierro y sería difícil detectar la pérdida de fosfato. Otra causa potencial puede estar relacionada con el hecho de que el ensayo detecta solamente una forma particular de fosfato inorgánico. La recuperación de calcio estaba en el intervalo de 60-80 % y parecía estar linealmente relacionada con la recuperación de Fe en el intervalo de 10-30 %, cuando las recuperaciones de Fe eran bajas y se identificó precipitación (Fig. 14, los cuadrados dentro de un círculo). El análisis de ese subconjunto de datos con una regresión de mínimos cuadrados demostró que un 69 % de la varianza en la recuperación de Ca podía explicarse por la recuperación de Fe. Estos datos muestran que el Fe está directamente vinculado a la recuperación de Ca.

También se realizaron ejecuciones de tratamiento HTST a escala piloto y escala de fabricación del Medio 4 (y variaciones del Medio 4) y del Medio 9. Se obtuvieron datos de las ejecuciones realizadas para ensayos analíticos y para estudios de rendimiento del cultivo celular para evaluar el impacto del tratamiento HTST sobre el rendimiento del cultivo celular y la calidad del producto. En las pruebas analíticas no se identificaron pérdidas significativas de ningún componente, con la excepción de hierro y cobre. Además, no se observaron cambios significativos en los parámetros clave de rendimiento del cultivo celular (título, crecimiento, viabilidad) ni en la calidad del producto (incluyendo variantes básicas). La pérdida de cobre no dio lugar a cambios en el rendimiento del cultivo celular ni en los niveles de variantes básicas, ya que las pérdidas no eran lo suficientemente grandes como para provocar cambios ilícitos en la línea de células huésped utilizada para las pruebas basadas en las valoraciones de cobre para esa línea celular. Las cantidades relativamente pequeñas de metales traza tales como hierro y cobre ($75 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$, respectivamente) en comparación con el calcio y el fosfato ($1,5 \text{ mM}$ y 3 mM , respectivamente) en las formulaciones del Medio 4 permitieron la formación de cantidades muy escasas de precipitados de fosfato de calcio (complejos de CaPO_4) que no dieron lugar a un ensuciamiento significativo de los intercambiadores de calor, pero que podían interactuar con el hierro y el cobre presentes en el medio líquido. Estas interacciones de complejos de CaPO_4 pueden quelar el hierro y el cobre de alguna manera para secuestrarlos del medio líquido y depositarlos en algún lugar dentro del flujo de proceso, junto con los complejos de CaPO_4 que precipitan. Independientemente del mecanismo, el hecho es que se observan pérdidas de hierro y cobre tras el tratamiento HTST de los medios, incluso cuando el medio se trata con éxito para inactivar virus. Las reducciones de las concentraciones de hierro y de cobre tras el tratamiento HTST podrían influir negativamente en el uso exitoso de los medios sometidos a tratamiento HTST en la fase de producción posterior si las pérdidas son significativas con respecto a las concentraciones de hierro y cobre requeridas para la fase de producción.

Se llevaron a cabo ejecuciones de tratamiento HTST a escala piloto y escala de fabricación para siete formulaciones de medios diferentes. Los niveles de hierro en la formulación del medio se midieron antes del tratamiento HTST y se determinaron los niveles esperados de hierro después de un tratamiento HTST. El análisis de los niveles de hierro en los medios después del tratamiento HTST (post-HTST) demostró que el tratamiento HTST había provocado la pérdida de los niveles de hierro. La pérdida de hierro fue de un 44 % en el Medio 14, de un 42 % en el Medio 15, de un 20 %

en el Medio 16, de un 1,3 % en el Medio 17 y de un 42 % en el Medio 18 (Fig. 15). El Medio 19 y el Medio 20 se suplementaron con hierro después del tratamiento HTST.

Se realizaron ensayos de crecimiento de células NS0, una línea celular de mieloma murino, en medios de cultivo celular que se habían sometido a tratamiento HTST y se habían suplementado con hierro. El análisis del crecimiento celular demostró que las células cultivadas en medios de cultivo celular no tratados por HTST, tanto si se habían suplementado o no con hierro, habían crecido de forma comparable en el tiempo (Fig. 16). En comparación, las células crecieron en cantidades inferiores cuando se cultivaron en medios tratados con HTST y no suplementados con hierro. La adición de hierro al cultivo celular tratado por HTST permitió la recuperación del crecimiento celular a niveles más altos en comparación con los medios de cultivo celular no tratados por HTST (Fig. 16).

En general, estos datos demostraron que las pérdidas de Fe se correlacionan con niveles de calcio, fosfato y pH que sugieren una estrecha relación entre las pérdidas de metales traza y los eventos de precipitación de fosfato de calcio durante el tratamiento térmico, incluyendo aquellos eventos que no son necesariamente detectables como precipitados visibles, cambios significativos de turbidez o problemas operacionales. La pérdida de metales traza tales como Fe puede afectar negativamente al rendimiento del cultivo celular en diversas líneas de células y a la calidad del producto.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la inactivación de virus o bacterias en medios de cultivo celular mientras se mantiene la idoneidad de los medios para el cultivo celular, en donde dicho procedimiento comprende (a) someter el medio de cultivo celular a un tratamiento rápido a alta temperatura (HTST); y (b) ajustar uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en nivel de pH, calcio y fosfato, con lo que se suprime la formación de precipitado, en el que el tratamiento HTST comprende elevar la temperatura del medio hasta al menos aproximadamente 85 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar virus o bacterias presentes en el medio,
- 10 a) en el que el pH se ajusta cuando el medio comprende calcio y fosfato, el pH se ajusta a un nivel bajo adecuado durante la preparación del medio antes del tratamiento HTST, y el pH se ajusta después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular;
- 15 b) en el que el nivel de calcio se ajusta cuando el medio comprende fosfato, el nivel de calcio se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato, y el nivel de calcio se ajusta después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular; o
- 20 c) en el que el nivel de fosfato se ajusta cuando el medio comprende calcio, el nivel de fosfato se reduce de modo que se suprime la formación de complejos que comprenden calcio y fosfato, y el nivel de fosfato se ajusta después del tratamiento HTST a un nivel adecuado para el cultivo celular.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además el ajuste de las concentraciones de metales traza, en el que el metal traza se selecciona del grupo que consiste en hierro y cobre, y en el que se eliminan hierro y/o cobre del medio antes del tratamiento HTST.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 2 que comprende además suplementar el medio con hierro y/o cobre después del tratamiento HTST para alcanzar un nivel adecuado para el cultivo celular.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH se ajusta a aproximadamente 5,0 – 7,2 antes del tratamiento HTST.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH se ajusta a aproximadamente 6,9 – 7,2 después del tratamiento HTST.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se elimina calcio del medio antes del tratamiento HTST.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se elimina fosfato del medio antes del tratamiento HTST.
- 45 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la concentración total de fosfato y calcio en el medio es inferior a aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mM durante el tratamiento HTST.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los niveles de calcio y de fosfato se ajustan.
- 50 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los niveles de pH, de calcio y de fosfato se ajustan.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura del medio se eleva hasta al menos aproximadamente 93, 95, 97, 99, 101, 102 o 103 grados Celsius durante un periodo de tiempo suficiente para inactivar los virus presentes en el medio.
- 55 12. El procedimiento de la reivindicación 1 u 11, en el que la temperatura se eleva durante al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 segundos.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el virus se selecciona del grupo que consiste en *Parvoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae* y *Picornaviridae*.

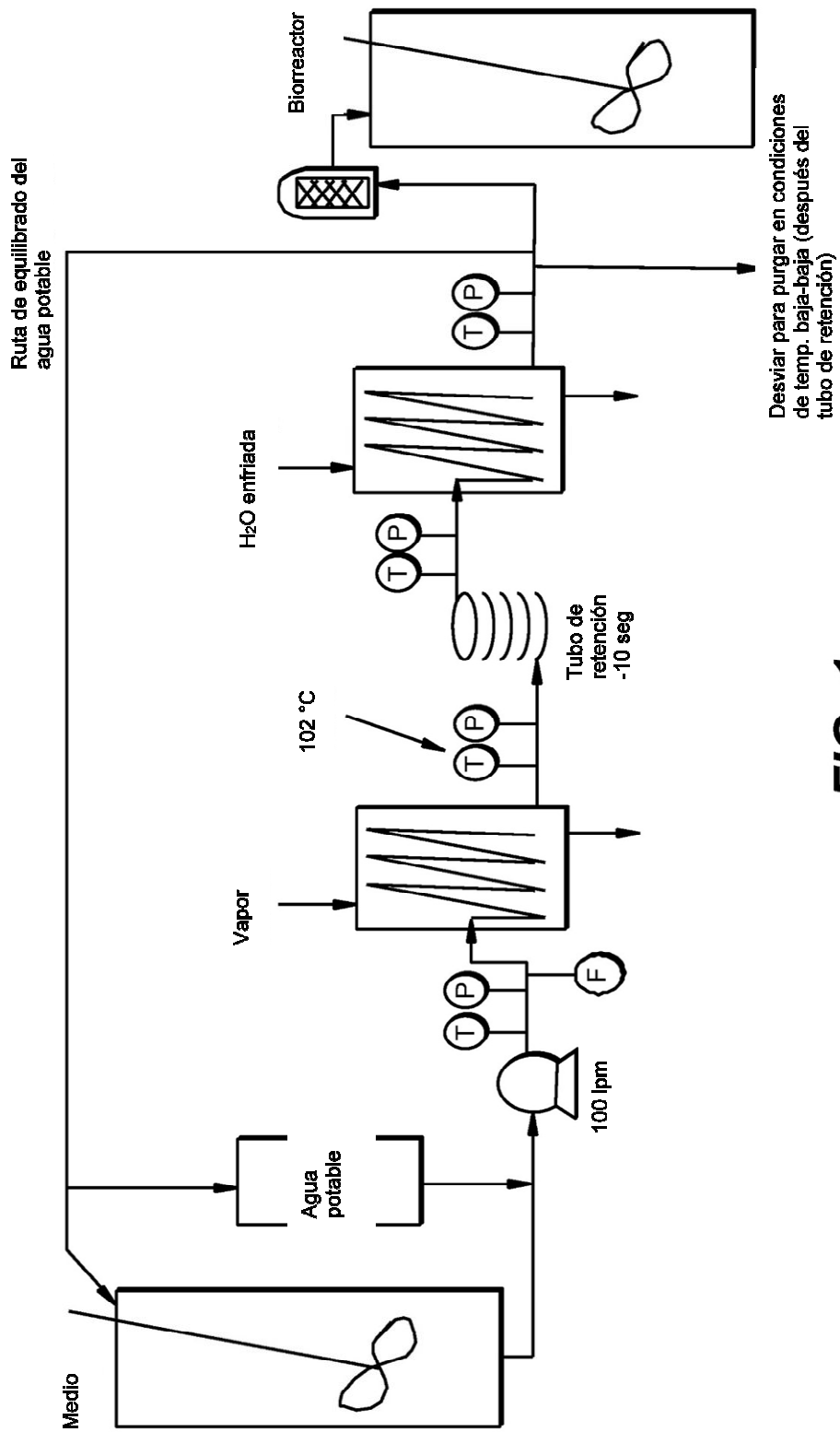


FIG. 1

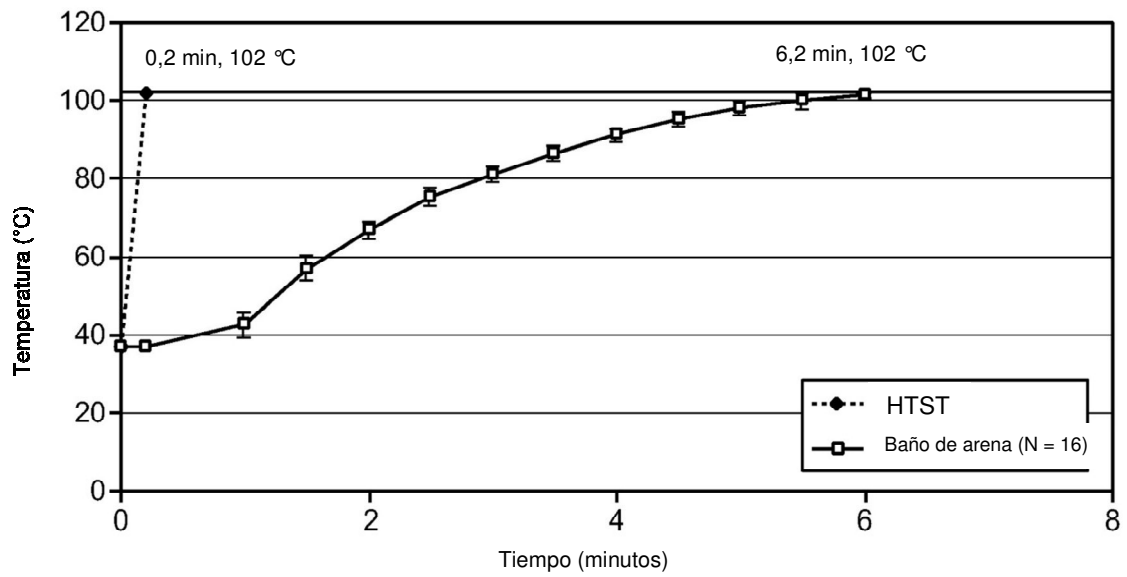


FIG. 2

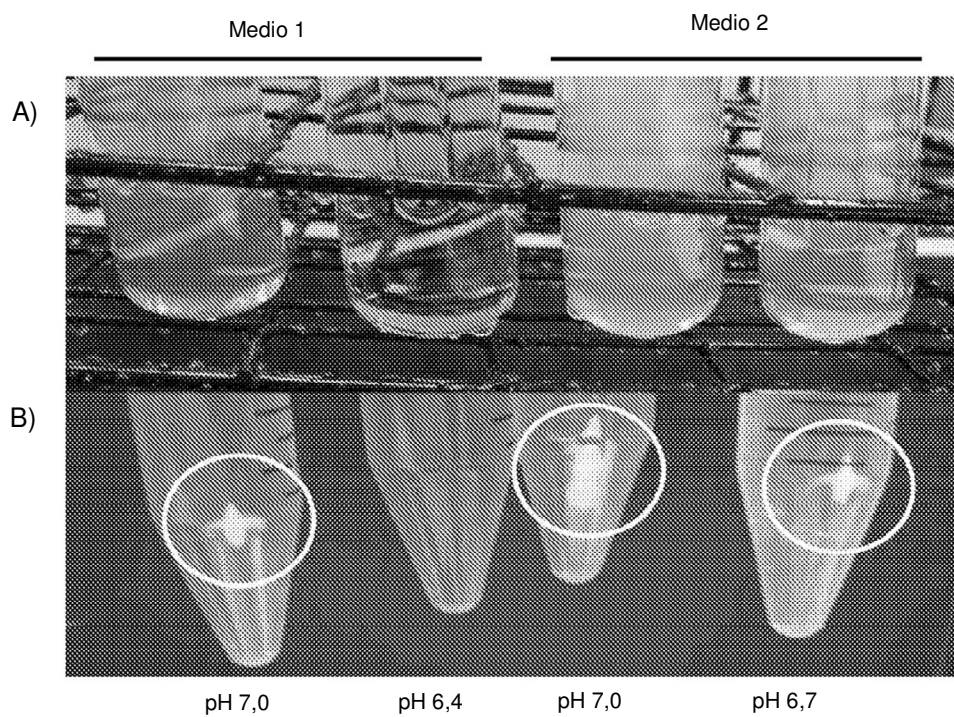


FIG. 3

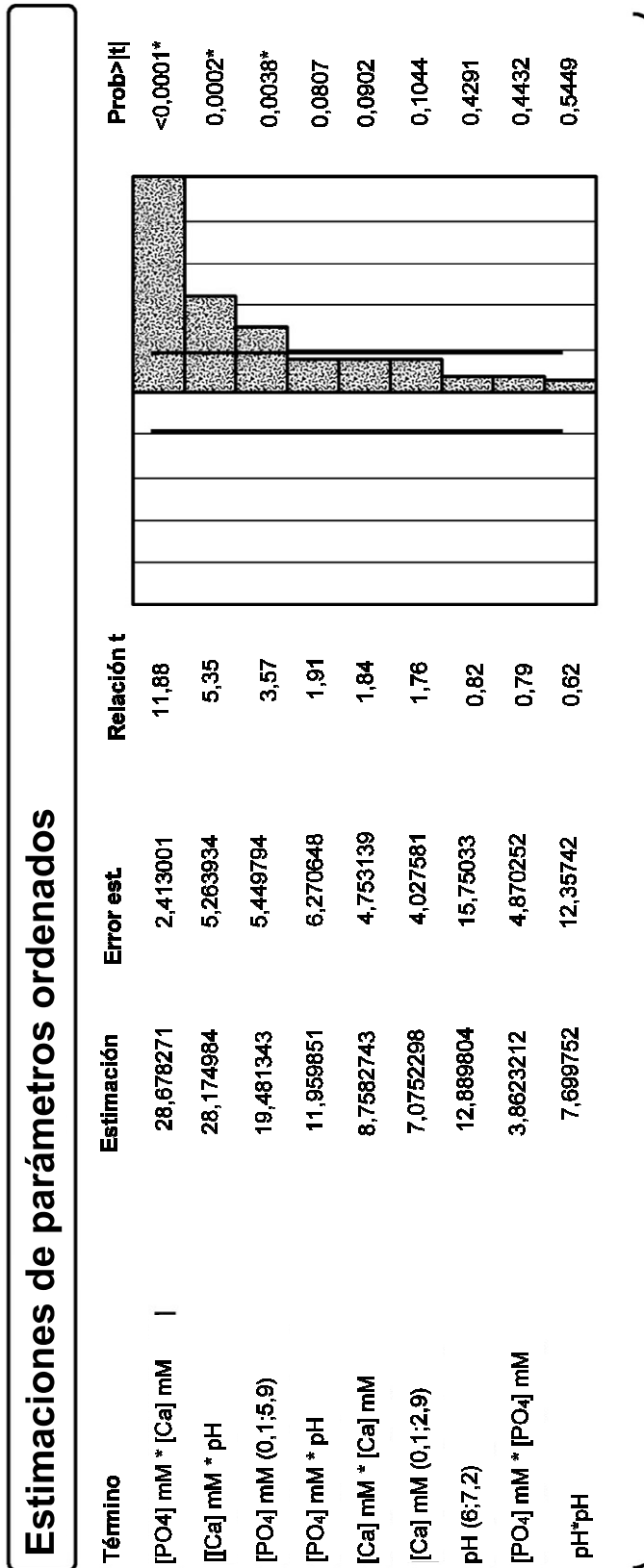


FIG. 4

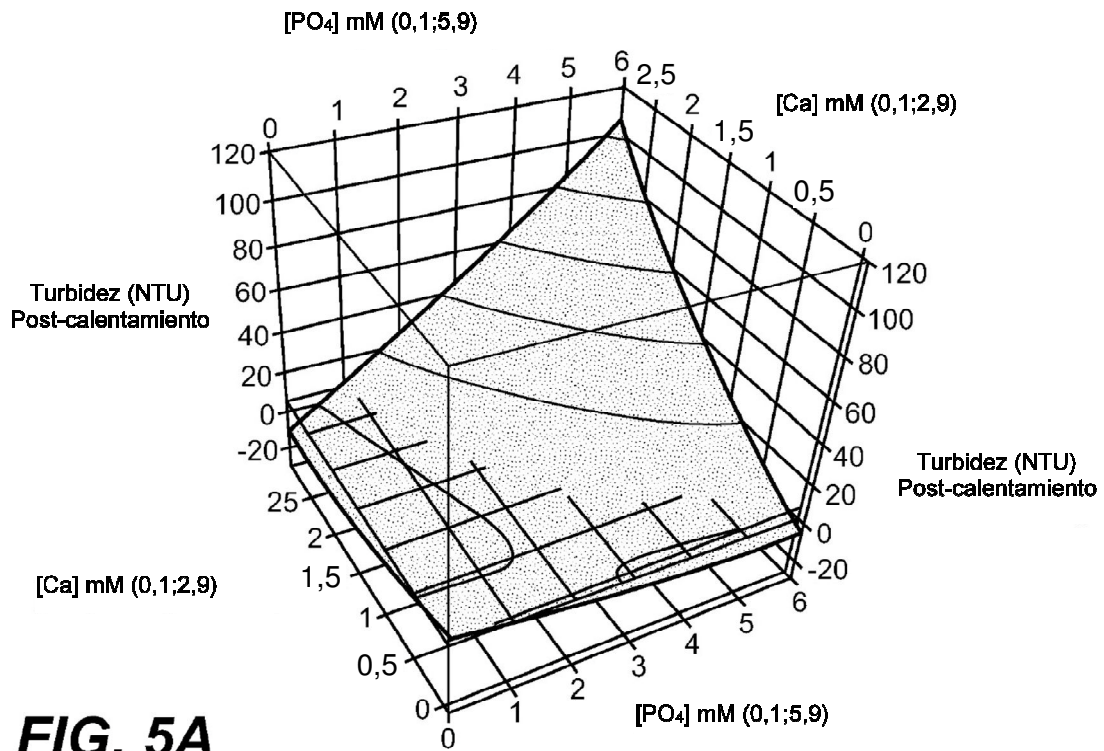


FIG. 5A

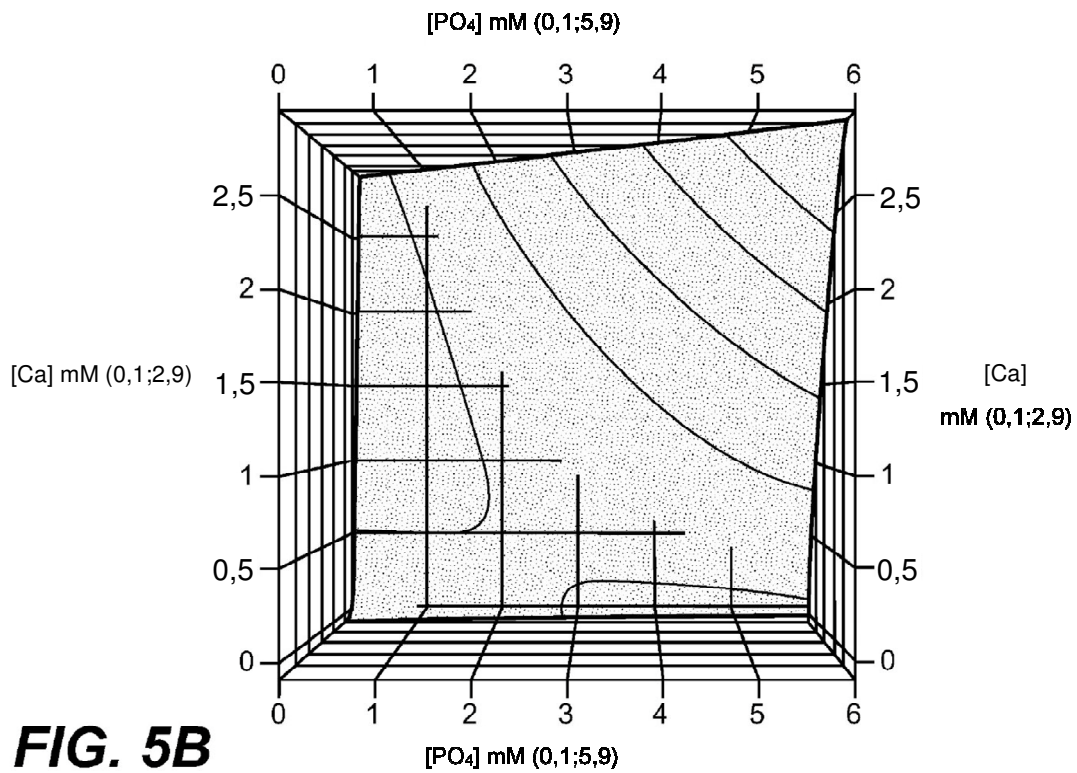
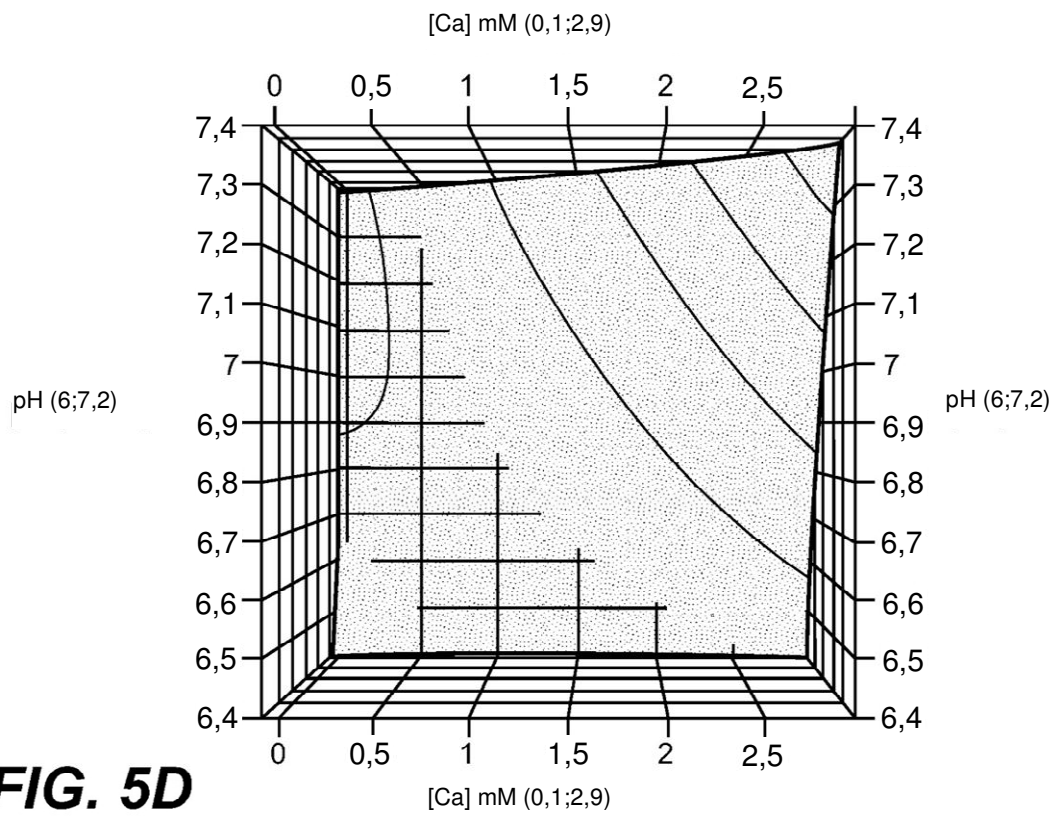
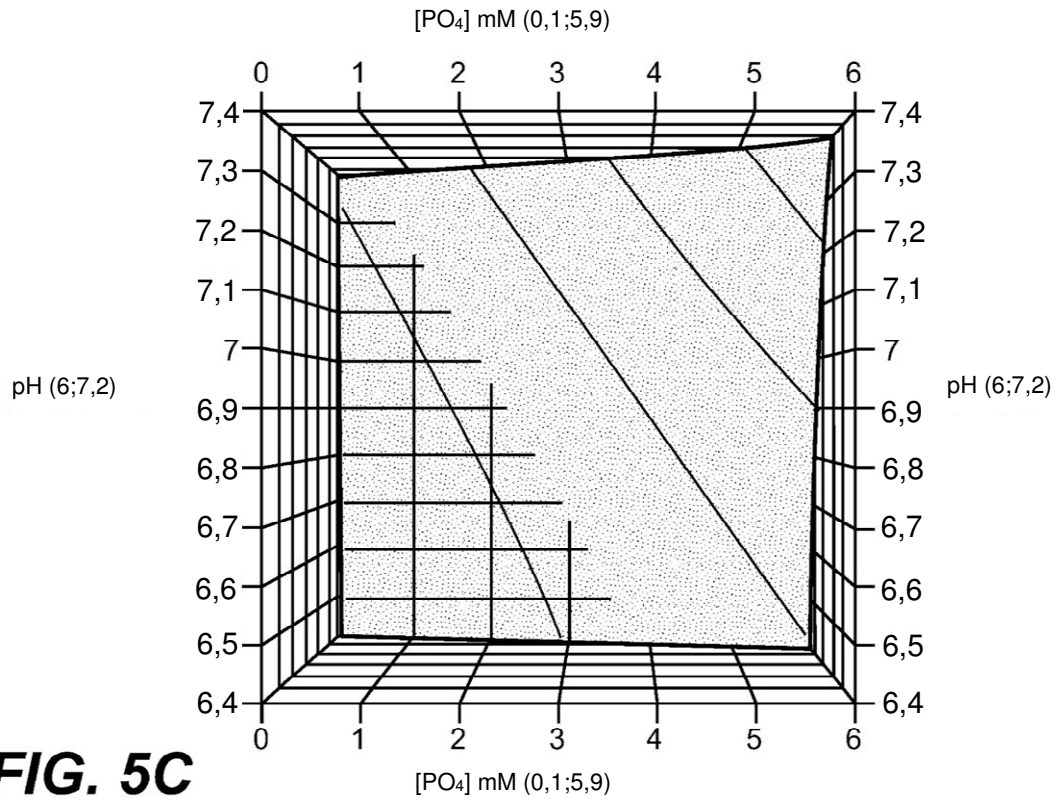


FIG. 5B



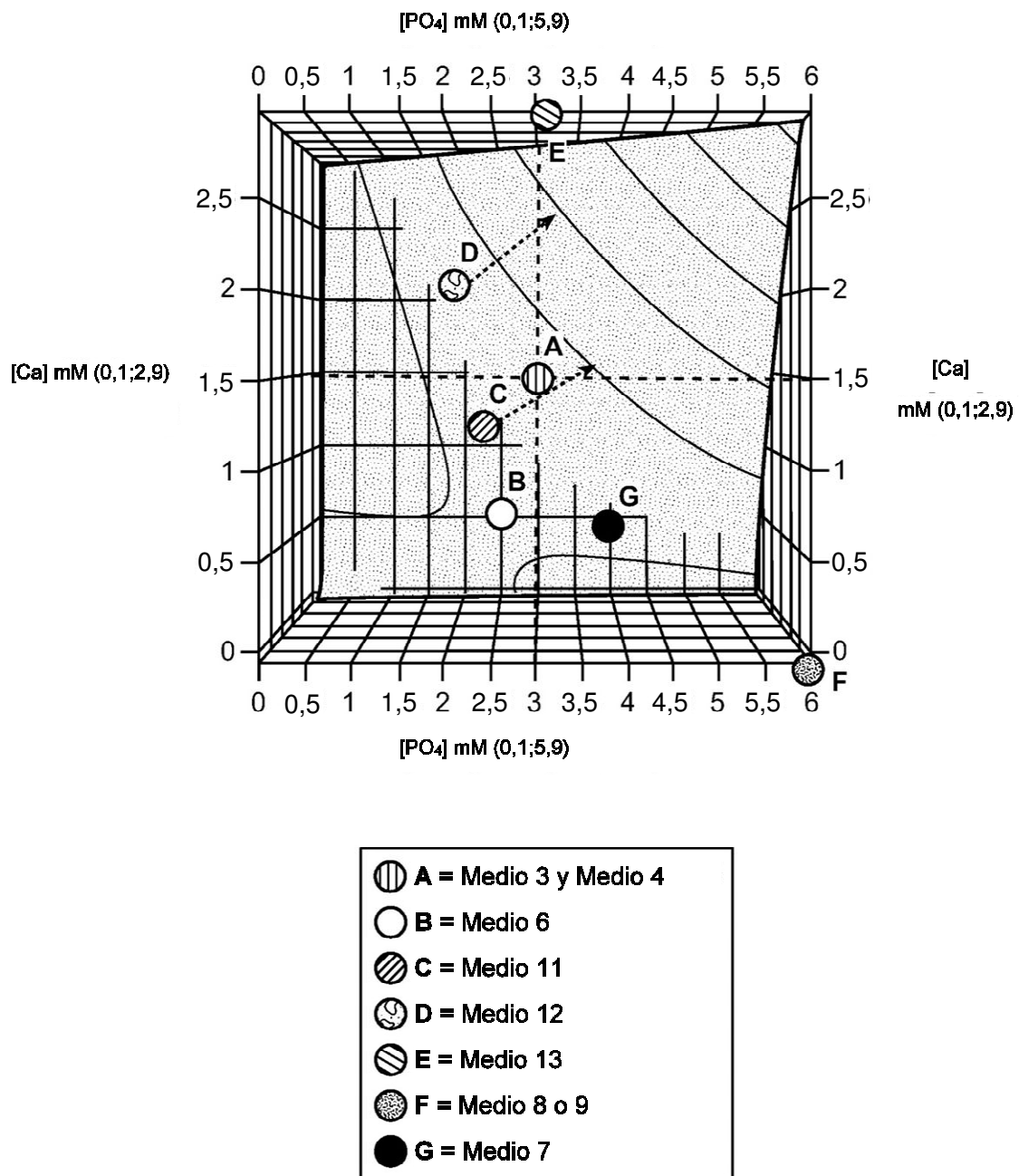


FIG. 6

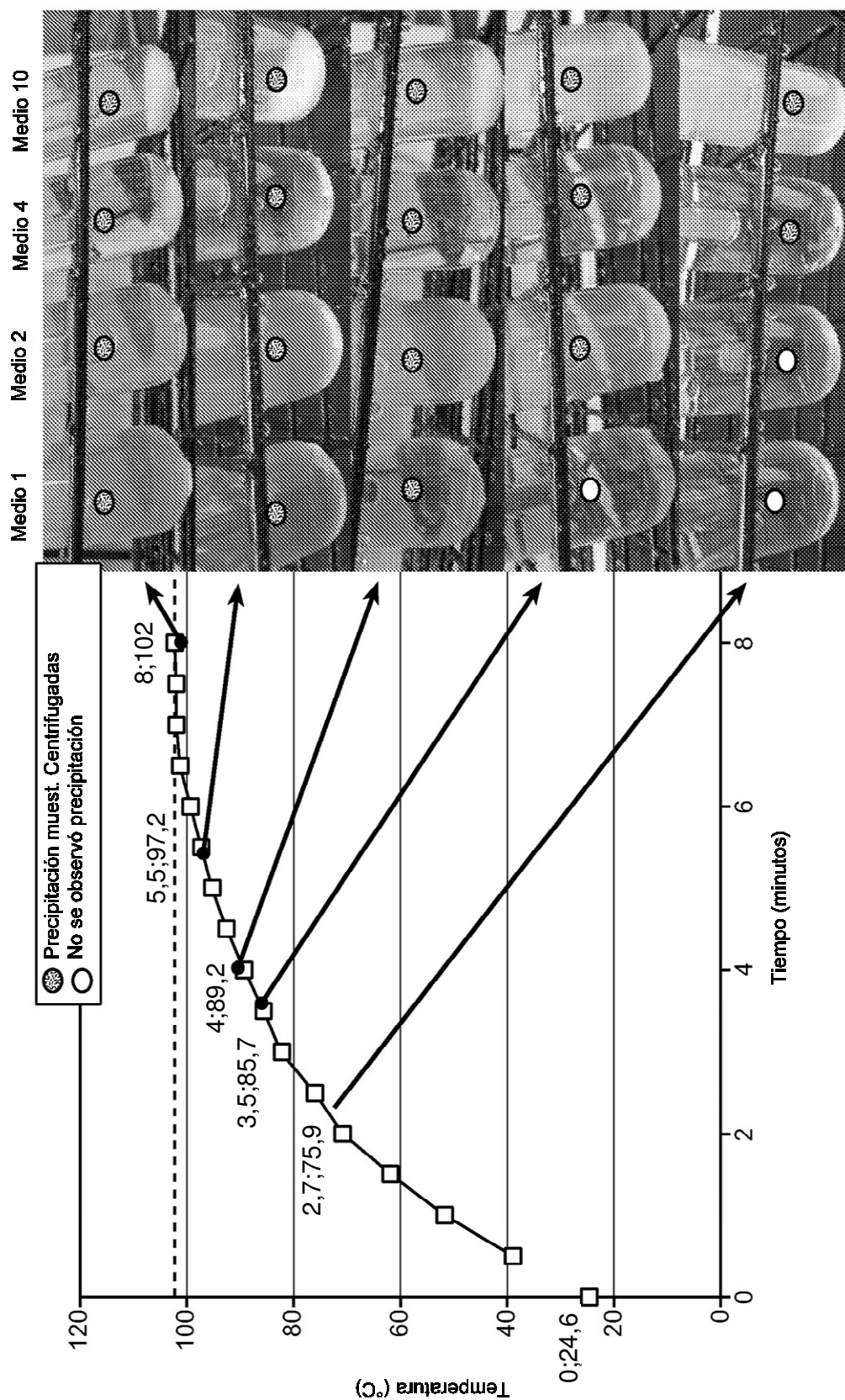


FIG. 7

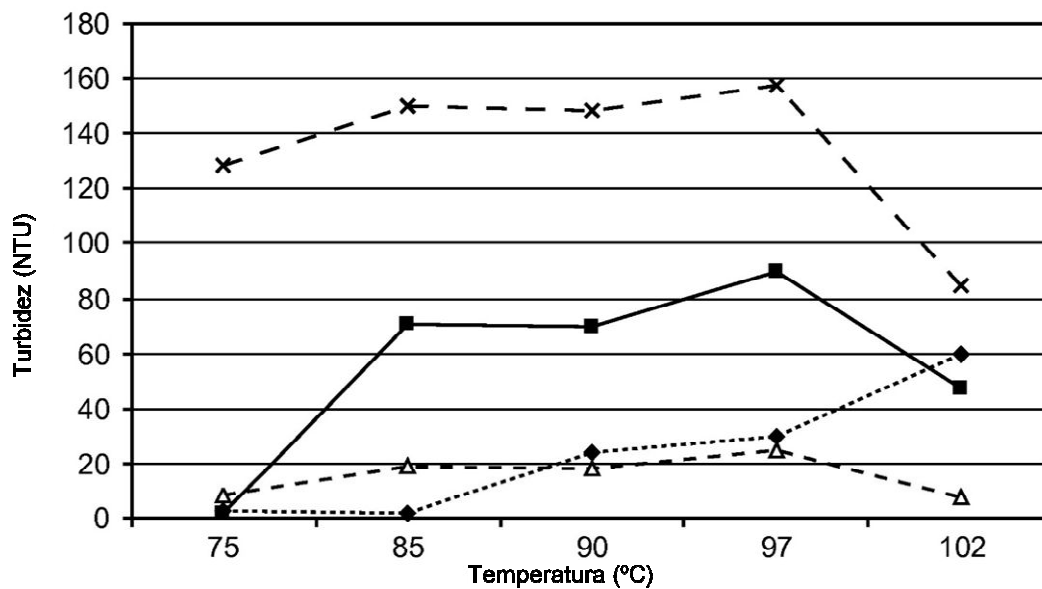


FIG. 8

---◆--- Medio 1, pH 7 —■— Medio 2, pH 7
 -△- Medio 4, pH 7 -x- Medio 10, pH 7

FIG. 9

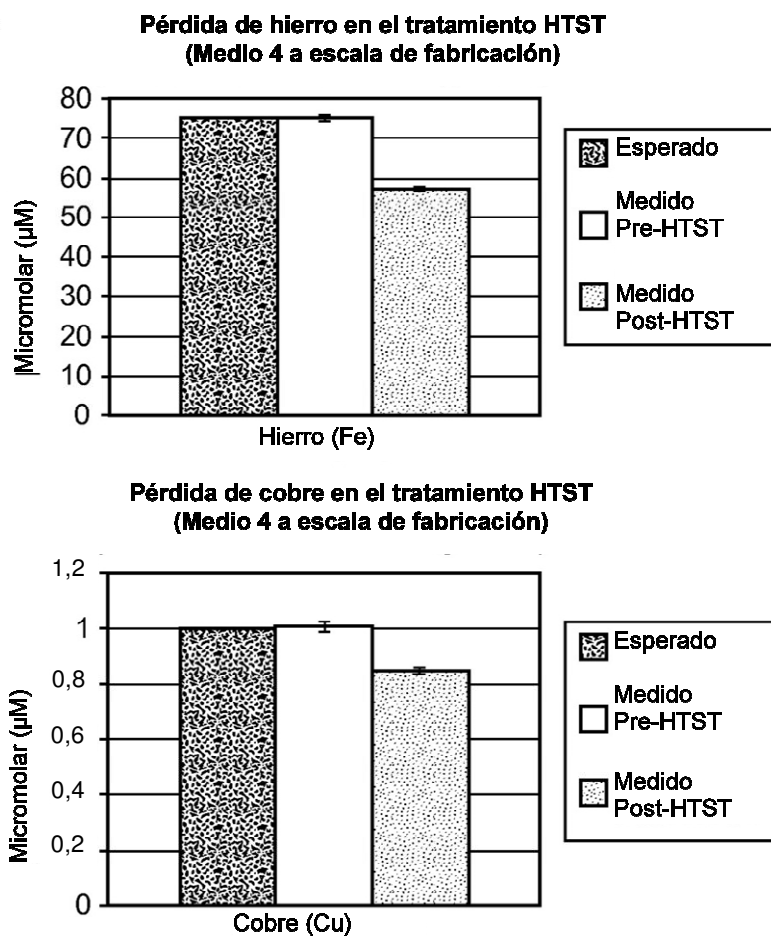


FIG. 10A

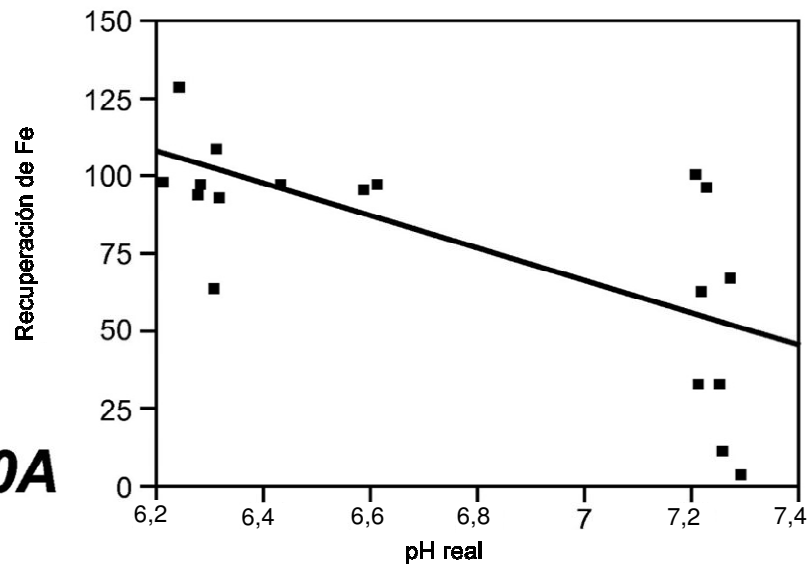


FIG. 10B

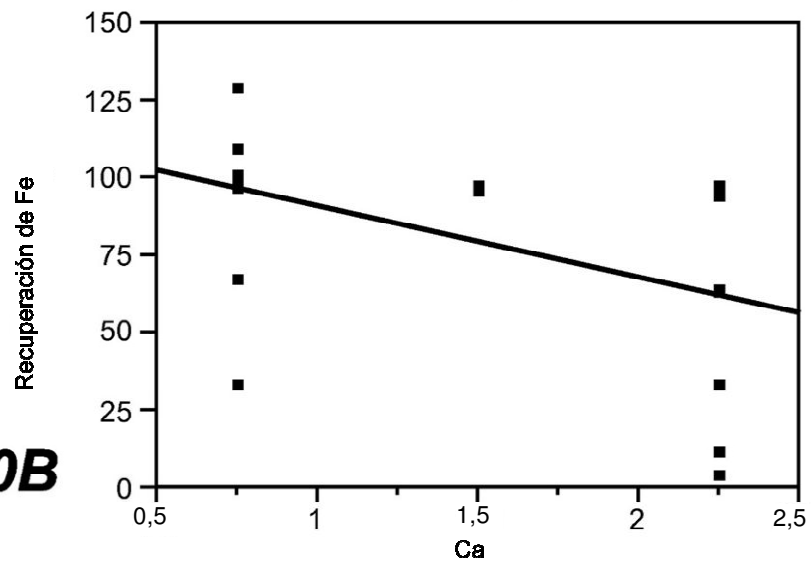


FIG. 10C

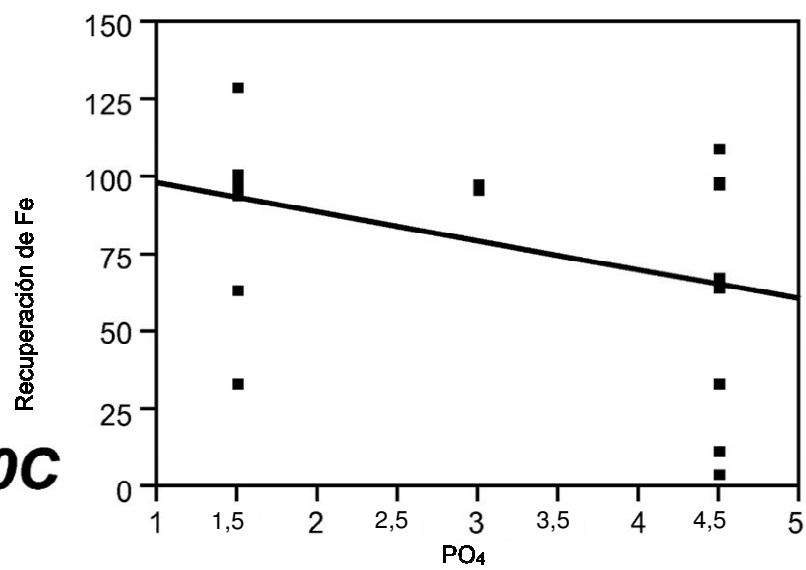


FIG. 10D

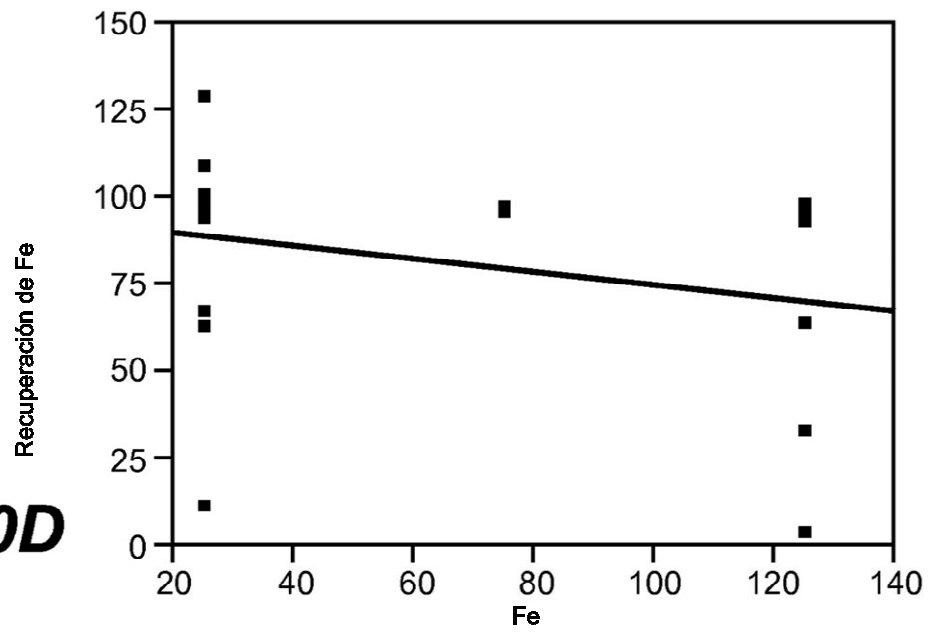
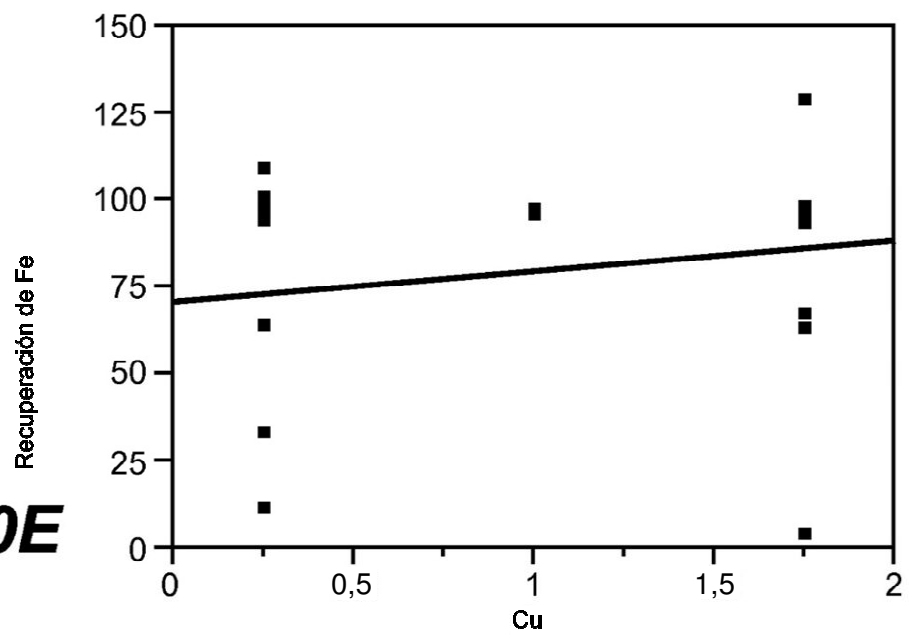


FIG. 10E



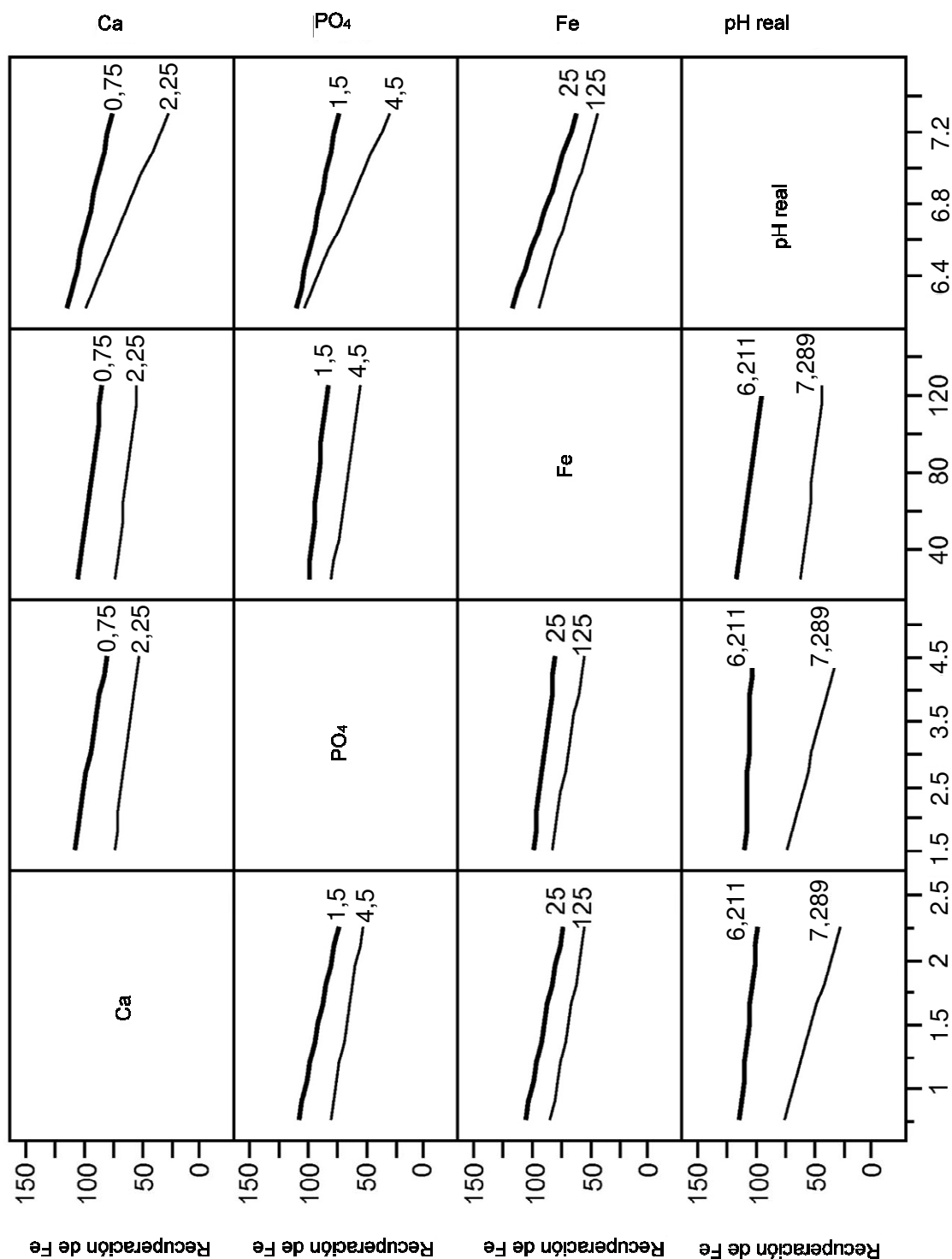


FIG. 11

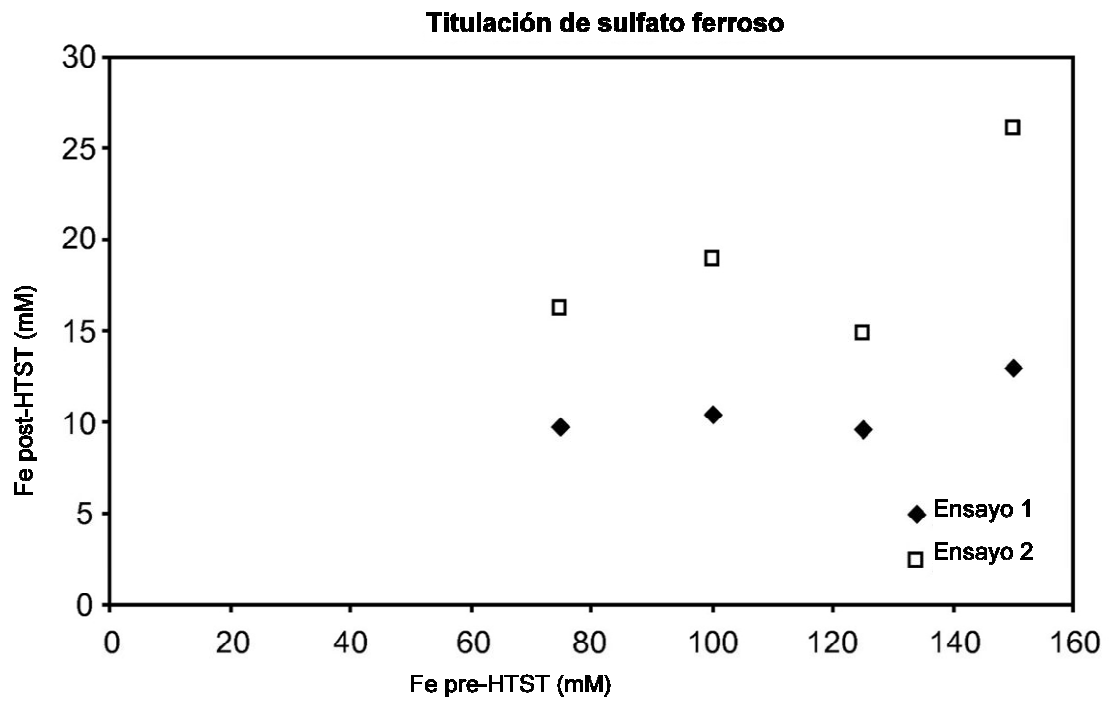


FIG. 12

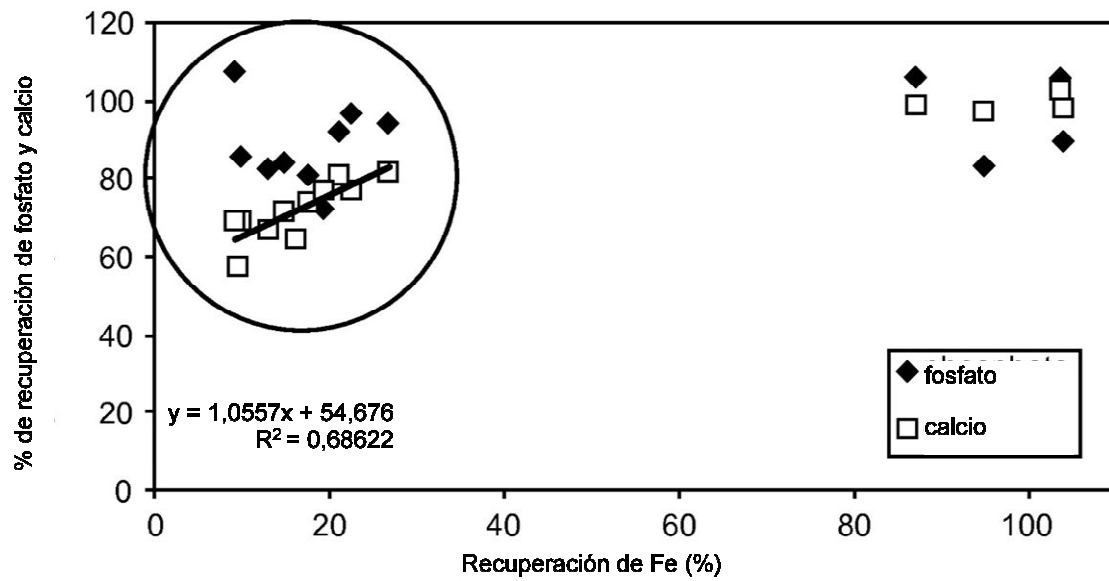


FIG. 14

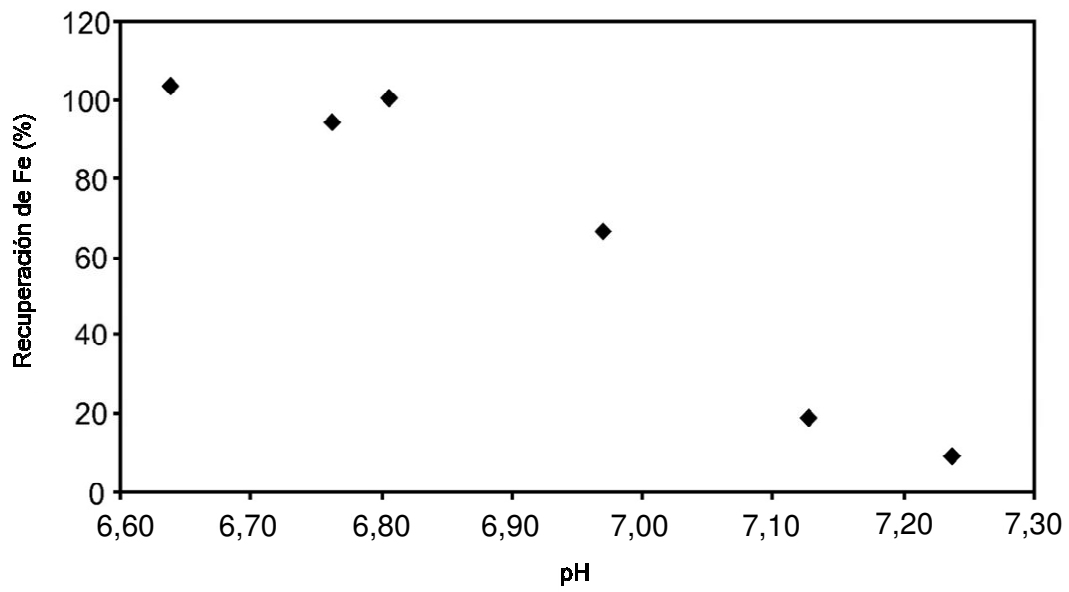


FIG. 13A

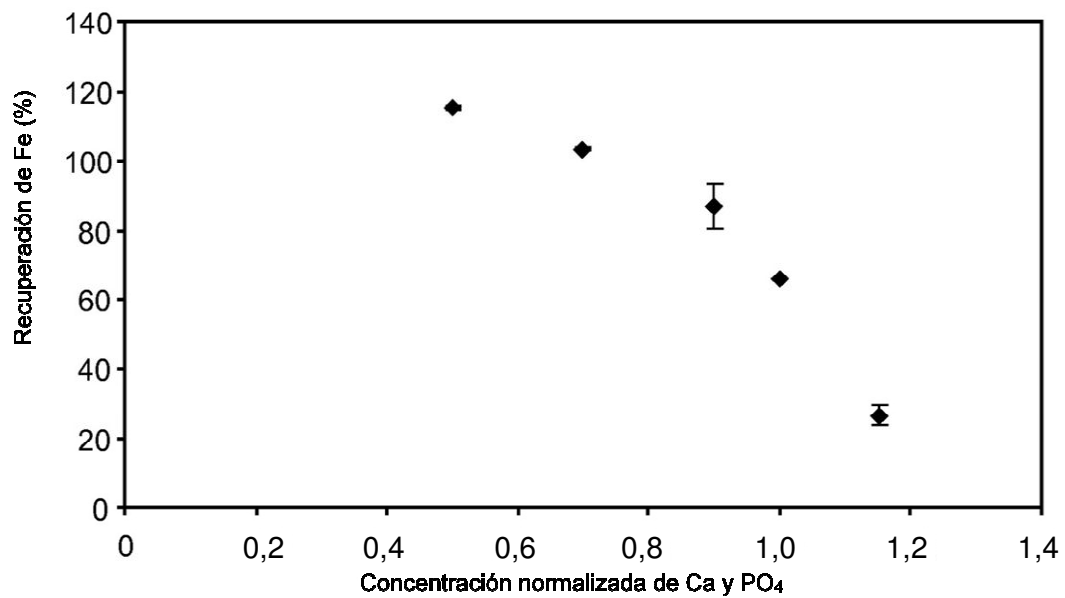


FIG. 13B

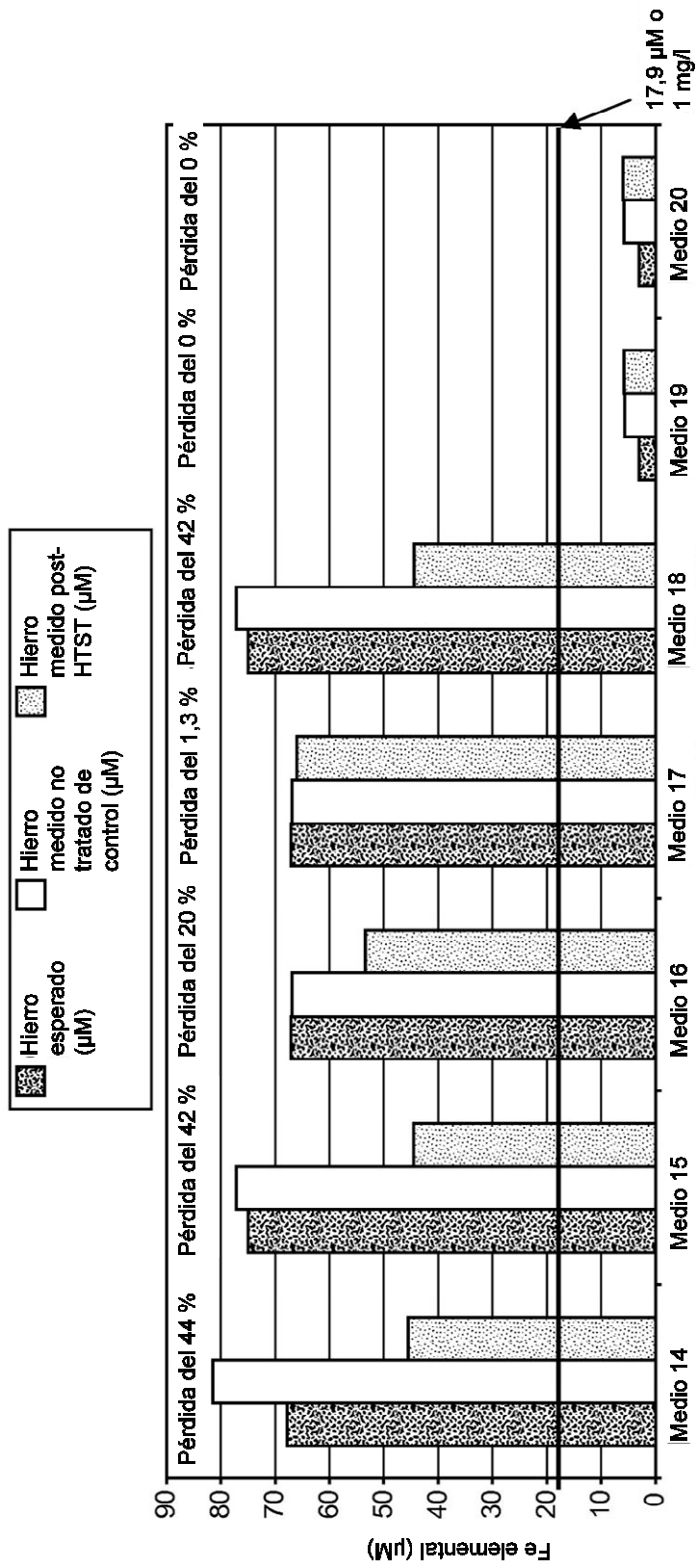


FIG. 15

En este proceso se volvió a añadir Fe post-HTST debido a los bajos niveles iniciales de Fe

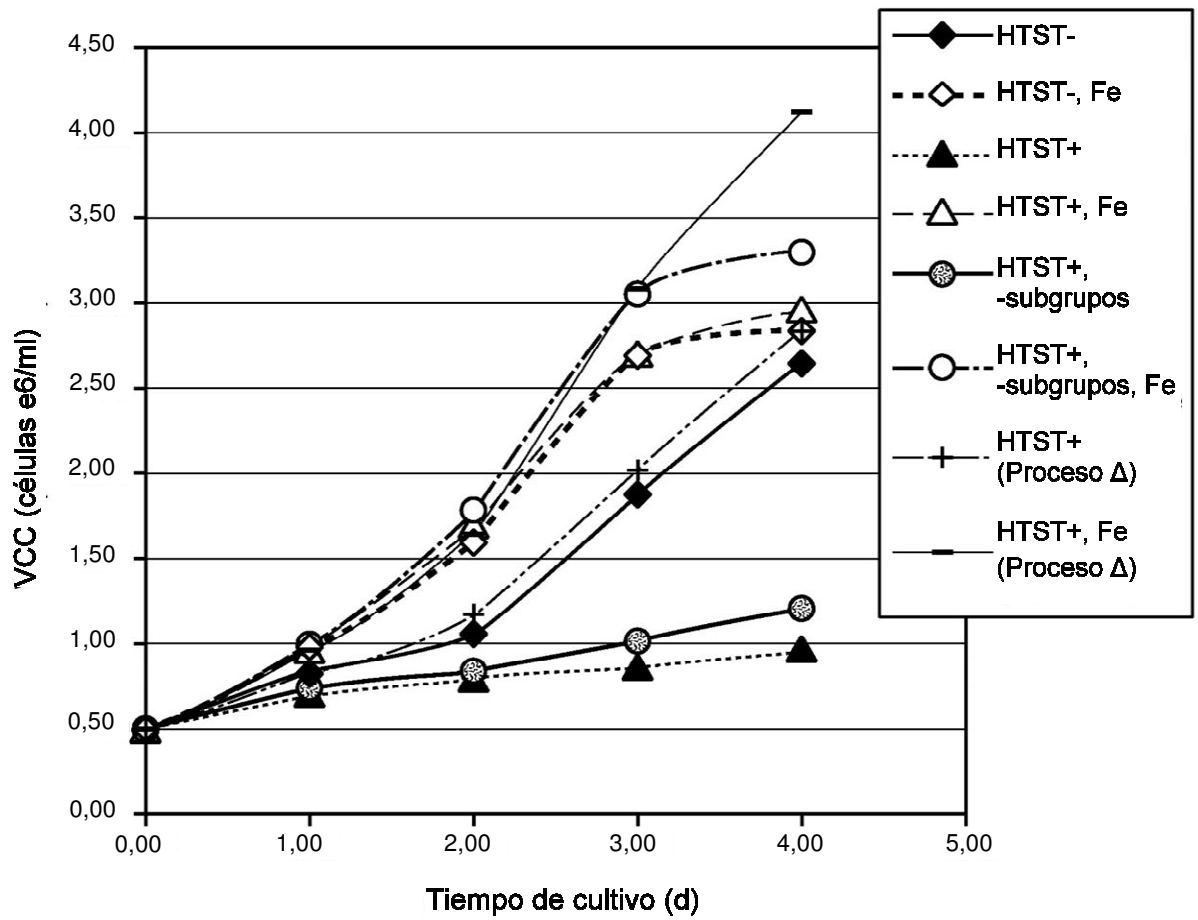


FIG. 16