

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 629**

51 Int. Cl.:

C12N 1/02 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2010 PCT/US2010/056924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11062926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2010 E 10782133 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2501822**

54 Título: **Métodos para la producción mejorada de proteínas**

30 Prioridad:

17.11.2009 US 261886 P

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

17.11.2017

73 Titular/es:

**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**ARUNAKUMARI, ALAHARI;
DAI, XIAO-PING;
GARCIA, JAVIER y
MARTEL, RICHARD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 642 629 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la producción mejorada de proteínas

5 **Antecedentes de la invención**

Los cultivos de células animales, particularmente los cultivos de células de mamífero, se usan habitualmente para la expresión de proteínas producidas recombinantemente con fines terapéuticos, profilácticos y diagnósticos. Aunque se prefieren los métodos de cultivo con células de mamífero con respecto a los sistemas de expresión microbianos (por ejemplo, sistemas de expresión bacterianos o de levadura), debido a que son más adecuados para expresar proteínas de alto peso molecular y proteínas con unas estructuras estéricas complejas, los niveles de expresión de las proteínas en los sistemas basados en los cultivos con células de mamífero son generalmente considerablemente menores que los de los sistemas de expresión microbianos. Aunque se han intentado numerosas estrategias para aumentar la expresión de proteínas en los cultivos con células de mamífero, estos métodos no han sido capaces de optimizar las condiciones para el crecimiento celular, mantener una elevada viabilidad celular y producir grandes volúmenes de una proteína de alta calidad, limitando así su aplicación práctica en la industria biofarmacéutica.

Como tal, existe una necesidad en la materia de desarrollar métodos mejorados de cultivo a gran escala con células animales para la producción y purificación de proteínas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, péptidos, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, interleucinas, interferones y vacunas) para conseguir una producción de proteínas fiable y rentable con unos elevados rendimientos.

Sumario de la invención

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para aumentar la producción de una proteína en un cultivo celular mediante el cultivo de las células que producen la proteína en perfusión hasta una elevada densidad de células (por ejemplo, al menos hasta por encima de aproximadamente 50×10^6 células/ml, más preferentemente por encima de aproximadamente entre 60 y 80×10^6 células/ml y lo más preferentemente alrededor de aproximadamente 100×10^6 células/ml), denominado también en el presente documento como "densidad súper elevada", cambiando después el cultivo celular a semicontinuo, de forma que las células entren en una fase de producción de proteínas elevada. La presente invención se basa, al menos en parte, en el inesperado descubrimiento de que es posible cultivar células en un cultivo hasta una densidad mucho mayor de lo que anteriormente se creía posible. Esto, a su vez, produce significativamente más proteína de la que se produce normalmente usando las técnicas de cultivo celular conocidas. Específicamente, generalmente se enseña que la densidad de células máxima conseguida mediante el uso de las técnicas de cultivo celular conocidas está limitada por la presencia de los niveles de algunos productos de desecho en particular (por ejemplo, lactato, amonio, etc.), dado que se sabe que dichos productos de desecho pueden ser tóxicos para el crecimiento celular cuando se acumulan hasta unas concentraciones críticas (véase, por ejemplo, Schumpp, B. et al., J. Cell Sci., 7 (Pt 4): 639-647 (diciembre de 1990)). Como tales, las técnicas de cultivo celular conocidas a menudo limitan la densidad máxima a la que las células se cultivan inicialmente, de forma que las células no se vean afectadas negativamente por las concentraciones de los productos de desecho en particular.

Por ejemplo, el método de cultivo celular descrito en el documento WO 2009/023562 se basa en los niveles de lactato para señalar la densidad de células máxima que puede conseguirse teóricamente antes de iniciar el cultivo celular en perfusión. Según se enseña en el documento WO 2009/023562, las células se cultivan hasta una densidad de entre aproximadamente 1 millón y 9 millones de células/ml, lo que da como resultado una concentración de lactato de entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 6 g/l. Según el documento WO 2009/023562, esto señala el punto temporal óptimo para comenzar la perfusión. Después de la perfusión, las células se cultivan a continuación hasta apenas entre 5 y 40 millones de células/ml y se mantienen en un cultivo celular semicontinuo para producir unos títulos de anticuerpo de entre 8-10 g/l (entre los días 14-17).

A diferencia de dichos métodos conocidos de cultivo celular, ningún nivel en particular de productos de desecho restringe la densidad del crecimiento celular según los métodos de la presente invención. Más bien, se descubrió que cuando las células se cultivan inicialmente únicamente en un cultivo celular en perfusión, las células son capaces de crecer hasta una densidad de células mucho mayor (por ejemplo, al menos por encima de 40×10^6 células/ml) de lo que previamente se había notificado para las técnicas de cultivo celular conocidas, independientemente de la presencia de productos de desecho. En una realización en particular, las células se cultivan hasta una densidad de al menos por encima de entre aproximadamente 50×10^6 células/ml y 60×10^6 células/ml, preferentemente por encima de entre aproximadamente 70×10^6 células/ml y 90×10^6 células/ml, más preferentemente por encima de entre aproximadamente 100×10^6 y 130×10^6 y lo más preferentemente por encima de entre aproximadamente 140×10^6 y 200×10^6 células/ml o más. A esta densidad "súper" alta de células permite, a su vez, la producción de unas cantidades significativamente mayores de proteína (por ejemplo, de 13,8 g/l el día 6) en un periodo de tiempo más corto de lo que se había notificado previamente.

La presente invención también proporciona otra ventaja inesperada más con respecto a las técnicas de cultivo celular conocidas, ya que optimiza la producción de grandes cantidades de una proteína de alta calidad. Por

ejemplo, en una realización, la proteína recogida según los métodos de la presente invención se obtiene únicamente a partir de un cultivo celular semicontinuo. Esto aumenta la frescura, la estabilidad y la calidad de la proteína, en contraste con la proteína obtenida a partir de cultivos tanto en perfusión como semicontinuos sometidos a unos periodos de cultivo más largos, que por lo tanto es más susceptible a la degradación y generalmente de una calidad peor. Sin embargo, la presente invención también contempla recoger la proteína de cultivos tanto en perfusión como semicontinuos (por ejemplo, cuando se cultivan las células en un único biorreactor).

En ciertas realizaciones, la presente invención emplea células recombinantes que expresan una proteína de interés. Por ejemplo, las células son transfectadas con al menos un ácido nucleico que codifica una proteína de interés.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para mejorar la producción de cualquier proteína de interés, incluyendo, sin limitación, enzimas, receptores, proteínas de fusión, citocinas, factores reguladores, hormonas, proteínas diagnósticas, proteínas terapéuticas y agentes de unión al antígeno. En una realización en particular, la proteína es un anticuerpo (o un fragmento de unión al antígeno del mismo). De forma análoga, puede cultivarse una gran diversidad de células según los métodos de la presente invención. En una realización en particular, las células son células animales. En una realización preferida, las células son células de mamífero, tales como las células CHO, NS0, BHK y Per C6.

Las condiciones de cultivo celular (por ejemplo, el pH, la temperatura, el medio, el recipiente en particular para el crecimiento de los cultivos, etc.) pueden ser determinadas y ajustadas por el experto habitual en la materia dependiendo de diversos factores, tales como la línea celular y la proteína que se va a producir en particular. En una realización, el cultivo celular en perfusión y el cultivo celular en modo semicontinuo se llevan a cabo en biorreactores. Esto puede incluir un único biorreactor o múltiples biorreactores (por ejemplo, de forma que el cultivo celular en perfusión y el cultivo celular en modo semicontinuo se llevan a cabo en biorreactores independientes). Por ejemplo, el cultivo celular en perfusión puede llevarse a cabo en un biorreactor y después las células pueden ser transferidas a múltiples biorreactores semicontinuos.

Además, las condiciones del cultivo celular pueden optimizarse para maximizar la producción de proteína. Por ejemplo, pueden optimizarse los parámetros del cultivo celular, tales como el pH, la DO, la temperatura, las estrategias de suministro, la composición del suministro, etc.

En el presente documento también se divulgan métodos para la clarificación de una proteína a partir de un cultivo celular. Esto se consigue ajustando el pH del cultivo celular por debajo de un pH neutro (es decir, por debajo de un pH de 7) y sedimentando el cultivo celular, de forma que el cultivo celular se separe para formar una capa de sobrenadante y una capa de lecho celular, en el que la proteína está presente (y a partir del cual puede aislarse) en la capa del sobrenadante. Aunque los métodos pueden ser aplicados a los cultivos celulares de la invención, pueden ser aplicados para clarificar una proteína a partir de cualquier cultivo celular, incluyendo cultivos celulares de alta densidad.

El método puede implicar el ajuste del pH del cultivo celular a un pH bajo (es decir, por debajo de un pH neutro de 7 tal como a un pH de 4-7). En particular, el pH puede ajustarse hasta un pH de entre aproximadamente 4,5 y 6,5. El método también puede implicar la sedimentación del cultivo celular durante al menos aproximadamente 30 minutos, de forma que se mejore la clarificación del cultivo celular antes de la recolección de la proteína. Sin embargo, el cultivo celular puede sedimentarse durante periodos de tiempo más largos a la discreción del artesano experto. En particular, el cultivo celular puede sedimentarse durante entre aproximadamente 30 y 120 minutos.

Opcionalmente pueden emplearse otras técnicas de purificación conocidas junto con el método de clarificación descrito anteriormente. Por ejemplo, el cultivo celular puede ser centrifugado antes de la sedimentación del cultivo celular. Alternativamente, el cultivo celular puede ser centrifugado después de la sedimentación del cultivo celular, o el cultivo celular puede ser centrifugado antes y después de la sedimentación del cultivo celular.

Otra etapa opcional que puede llevarse a cabo para mejorar el método de clarificación es el lavado de la capa del lecho celular que se forma como resultado del proceso de sedimentación con un tampón a pH bajo. En una realización en particular, el pH del tampón es el mismo que el pH del cultivo celular, es decir, cuando el cultivo celular se ajusta a un pH bajo (es decir, por debajo de un pH neutro de 7).

Adicionalmente, pueden usarse técnicas de filtración para clarificar adicionalmente el cultivo celular. Por ejemplo, el cultivo celular puede ser filtrado antes de la sedimentación del cultivo celular, el cultivo celular puede ser filtrado después de la sedimentación del cultivo celular, o el cultivo celular puede ser filtrado antes y después de la sedimentación del cultivo celular. La filtración puede llevarse a cabo usando cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la materia que incluyen, pero no se limitan a, una filtración profunda y una filtración de pulido.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un posible escenario para llevar a la práctica los métodos de la presente invención, es decir, en el que el proceso de cultivo celular semicontinuo de súper densidad se lleva a cabo en un único biorreactor.

La Figura 2 representa otro posible escenario para llevar a la práctica los métodos de la presente invención, es decir, en el que las células son perfundidas en un biorreactor de perfusión hasta que se consigue una densidad de células en particular y después se transfieren a múltiples reactores semicontinuos. El proceso de cultivo celular semicontinuo se lleva a cabo en un único biorreactor.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el crecimiento celular y el perfil de producción de proteína para el Experimento #1.

La Figura 4 es una gráfica que muestra el crecimiento celular y el perfil de producción de proteína para el Experimento #2.

La Figura 5 es una gráfica que muestra el perfil del biorreactor de perfusión (es decir, la densidad de células viables y el porcentaje de viabilidad) del Experimento 3.

La Figura 6 es una gráfica de superposición que representa la densidad de células y los perfiles de productividad de los dos biorreactores utilizados en el Experimento 3.

La Figura 7 es una gráfica que muestra el crecimiento celular, la viabilidad celular y los perfiles de producción de proteína en el biorreactor de producción del Experimento 4.

La Figura 8 es una gráfica que resume los resultados de productividad de los cuatro Experimentos en función de la integral celular.

La Figura 9 es una gráfica que representa el efecto de la modificación de los parámetros experimentales (es decir, el pH, el coadyuvante de filtración, etc.) sobre el proceso de clarificación.

La Figura 10 es un diagrama esquemático que representa las etapas clave del proceso de clarificación, así como las técnicas opcionales para mejorar el proceso de clarificación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos mejorados para aumentar la producción de proteína en un cultivo celular mediante el cultivo de las células que producen la proteína en un cultivo celular en perfusión hasta una elevada densidad de células (es decir, al menos por encima de 40×10^6 células/ml) y cambiando después a un cultivo celular semicontinuo, de forma que las células entren en una fase de producción de la proteína. La invención también proporciona métodos para la clarificación de cultivos celulares para facilitar la recolección de la proteína a partir de los cultivos.

Con objeto de que la presente invención se comprenda con más facilidad, en primer lugar se definen ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se proporcionan definiciones adicionales.

I. Definiciones

Los términos "cultivo celular" y "cultivo" incluyen cualquier combinación de células y medio. Los métodos de la presente invención contemplan, sin limitación, dos tipos generales de cultivo celular, es decir, el cultivo celular en perfusión y el cultivo celular semicontinuo. Los principios subyacentes de estos tipos de cultivos celulares se describen a continuación.

Según se usa en el presente documento, los términos "perfundir", "perfusión" y "cultivo en perfusión" se usan de forma intercambiable para referirse a un método de cultivo de células en el que se proporciona medio fresco adicional al cultivo y el medio gastado se retira del cultivo. La perfusión se inicia después de la siembra del cultivo y puede producirse de forma continua o intermitente, según se desee, durante un periodo de tiempo. El medio fresco añadido durante la perfusión normalmente proporciona complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. La perfusión también permite la eliminación de los productos de desecho celulares y de los subproductos tóxicos del cultivo celular. La perfusión se lleva a cabo durante la fase de crecimiento de las células, pero también puede continuar después de que las células hayan sido transferidas a un cultivo celular semicontinuo (se analiza a continuación).

Según se usa en el presente documento, el término "velocidad de perfusión específica" (SPR) se refiere a la velocidad a la que se proporciona medio fresco al cultivo celular y se retira el medio gastado basándose en la densidad de células. La SPR puede calcularse usando la siguiente ecuación:

$$\text{velocidad de perfusión específica (SPR)} = (\text{volumen del reactor} / \text{día}) / (\text{densidad de células total} \times 10^6).$$

La SPR puede ser determinada y/o ajustada por el experto habitual en la materia basándose en factores que incluyen, pero no se limitan a, la naturaleza de las células hospedadoras en particular, la velocidad de crecimiento de las células y la densidad de células. Por ejemplo, la SPR típica puede variar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹. En una realización, la SPR es de 1,0, de 0,9, de 0,8, de 0,7, de 0,6, de 0,5, de 0,4, de 0,3, de 0,2, de 0,1, de 0,09, de 0,08, de 0,07, de 0,06, de 0,05, de 0,04, de 0,03, de 0,02 o de 0,01.

En una realización, la SPR varía entre 0,25 y $0,03 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹. En otra realización, la SPR varía entre 0,07 y $0,01 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹. En otra realización, la SPR varía entre 0,07 y $0,03 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹. En una realización en particular, la SPR se mantiene aproximadamente a $0,05 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹.

5 La SPR puede permanecer constante durante un periodo de tiempo, o puede alterarse (es decir, aumentarse o disminuirse) en el transcurso del periodo de perfusión. Por ejemplo, la SPR puede aumentarse de forma sostenida con el tiempo, aumentarse poco a poco con el tiempo, disminuirse de forma sostenida con el tiempo, disminuirse poco a poco con el tiempo, o cualquier combinación de los mismos. La perfusión puede ser aplicada de una forma continua o de una forma intermitente. El experto habitual en la materia puede determinar la SPR, así como la
10 cronología apropiada para el inicio y el cese del (los) periodo(s) de perfusión y de cualquier alteración en la perfusión, basándose en la monitorización de algún parámetro del cultivo celular.

Según se usa en el presente documento, el término "cultivo semicontinuo" se refiere a un método de cultivo de células en el que se complementa el cultivo celular con medio fresco, es decir, a las células se les "suministra" medio
15 nuevo, mientras que el medio gastado no se retira. Normalmente, un proceso de cultivo "semicontinuo" se lleva a cabo en un biorreactor y los componentes adicionales (por ejemplo, complementos nutricionales) son añadidos al cultivo en algún momento después del inicio del proceso de cultivo. La adición controlada de nutrientes afecta directamente a la velocidad de crecimiento del cultivo y permite evitar la formación de un sobreflujo de metabolitos (véase, por ejemplo, Wlaschin, K.F. et al., "Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding," Cell Culture Engineering, 101: 43-74 (2006) y Lee, J. et al., "Control of fed-batch fermentations," Biotechnol. Adv., 17: 29-48 (1999)). Un cultivo
20 semicontinuo normalmente se finaliza en algún punto, y las células y/o los componentes del medio se recogen, y opcionalmente se purifican.

Según se usa en el presente documento, el término "porcentaje de suministro" es el porcentaje del volumen de
25 suministro en el volumen total del cultivo celular.

Según se usa en el presente documento, el término "suministro en bolo" se refiere a una única adición de suministro.

Según se usa en el presente documento, los términos "inoculación", "inóculo" y "siembra" se refieren a la adición de
30 células al medio de partida para comenzar el cultivo.

Según se usa en el presente documento, el término "densidad de células" se refiere al número de células en un volumen de medio dado. Una elevada densidad de células es deseable ya que puede dar lugar a una mayor productividad de proteína. Como tal, la densidad de células es monitorizada de forma rutinaria en los cultivos
35 celulares. La densidad de células puede ser monitorizada mediante cualquier técnica conocida en la materia que incluye, pero no se limita a, la extracción de muestras a partir de un cultivo y el análisis de las células bajo un microscopio, usando un dispositivo contador de células disponible comercialmente o usando una sonda adecuada disponible comercialmente introducida en el propio biorreactor (o en un serpentín a través del cual se hacen pasar el medio y las células suspendidas, y después se devuelven al biorreactor).

Según se usa en el presente documento los términos "densidad de células súper alta" y "elevada densidad de células" se usan de forma intercambiable y se refieren a una densidad de células de al menos por encima de 40×10^6 células/ml. Las técnicas de cultivo celular conocidas pueden implicar el cultivo de las células hasta un "primer nivel crítico" (es decir, "un punto durante la fase de crecimiento del ciclo celular en el que la viabilidad celular puede
45 verse afectada por el aumento en la concentración de las producciones de desecho (por ejemplo, inhibidores del crecimiento celular y metabolitos tóxicos, por ejemplo, lactato, amonio, etc.)" antes de la perfusión del cultivo celular y la obtención de apenas entre 5 y 40 millones de células/ml). Por el contrario, las células cultivadas según los métodos de la presente invención no están restringidas por los productos de desecho, y por lo tanto son capaces de alcanzar una densidad de células súper alta (es decir, al menos por encima de aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80,
50 90, 100, 110, 120, 130×10^6 células/ml). Específicamente, como parte de la presente invención se descubrió que cuando las células se cultivan inicialmente en un cultivo celular en perfusión, las células crecen hasta una densidad de células mucho mayor (es decir, una densidad de células súper alta), independientemente de la presencia de productos de desecho, tales como lactato o amonio.

En la presente invención, las células cultivadas en un cultivo celular en perfusión son "conmutadas" (por ejemplo, desplazadas o transferidas) a un modo de cultivo semicontinuo una vez que las células alcanzan una elevada densidad de células. En una realización, la conmutación se produce a una elevada densidad de células de al menos por encima de aproximadamente 50×10^6 células/ml. En otra realización, la conmutación se produce a una elevada densidad de células de al menos entre aproximadamente 50×10^6 células/ml y 200×10^6 células/ml. En algunas
60 realizaciones en particular, la conmutación se produce a unas elevadas densidades celulares de aproximadamente 51×10^6 células/ml, 52×10^6 células/ml, 53×10^6 células/ml, 54×10^6 células/ml, 55×10^6 células/ml, 56×10^6 células/ml, 57×10^6 células/ml, 58×10^6 células/ml, 59×10^6 células/ml, 60×10^6 células/ml, 61×10^6 células/ml, 62×10^6 células/ml, 63×10^6 células/ml, 64×10^6 células/ml, 65×10^6 células/ml, 66×10^6 células/ml, 67×10^6 células/ml, 68×10^6 células/ml, 69×10^6 células/ml, 70×10^6 células/ml, 71×10^6 células/ml, 72×10^6 células/ml, 73×10^6 células/ml, 74×10^6 células/ml, 75×10^6 células/ml, 76×10^6 células/ml, 77×10^6 células/ml, 78×10^6 células/ml, 79×10^6 células/ml, 80×10^6 células/ml, 81×10^6 células/ml, 82×10^6 células/ml, 83×10^6 células/ml, 84×10^6
65 células/ml, 85×10^6 células/ml, 86×10^6 células/ml, 87×10^6 células/ml, 88×10^6 células/ml, 89×10^6 células/ml, 90×10^6 células/ml, 91×10^6 células/ml, 92×10^6 células/ml, 93×10^6 células/ml, 94×10^6 células/ml, 95×10^6 células/ml, 96×10^6 células/ml, 97×10^6 células/ml, 98×10^6 células/ml, 99×10^6 células/ml, 100×10^6 células/ml.

5 células/ml, 85 x 10⁶ células/ml, 86 x 10⁶ células/ml, 87 x 10⁶ células/ml, 88 x 10⁶ células/ml, 89 x 10⁶ células/ml, 90 x 10⁶ células/ml, 91 x 10⁶ células/ml, 92 x 10⁶ células/ml, 93 x 10⁶ células/ml, 94 x 10⁶ células/ml, 95 x 10⁶ células/ml, 96 x 10⁶ células/ml, 97 x 10⁶ células/ml, 98 x 10⁶ células/ml, 99 x 10⁶ células/ml, 100 x 10⁶ células/ml, 101 x 10⁶ células/ml, 102 x 10⁶ células/ml, 103 x 10⁶ células/ml, 104 x 10⁶ células/ml, 105 x 10⁶ células/ml, 106 x 10⁶ células/ml, 107 x 10⁶ células/ml, 108 x 10⁶ células/ml, 109 x 10⁶ células/ml, 110 x 10⁶ células/ml, 111 x 10⁶ células/ml, 112 x 10⁶ células/ml, 113 x 10⁶ células/ml, 114 x 10⁶ células/ml, 115 x 10⁶ células/ml, 116 x 10⁶ células/ml, 117 x 10⁶ células/ml, 118 x 10⁶ células/ml, 119 x 10⁶ células/ml, 120 x 10⁶ células/ml, 121 x 10⁶ células/ml, 122 x 10⁶ células/ml, 123 x 10⁶ células/ml, 124 x 10⁶ células/ml, 125 x 10⁶ células/ml, 126 x 10⁶ células/ml, 127 x 10⁶ células/ml, 128 x 10⁶ células/ml, 129 x 10⁶ células/ml, 130 x 10⁶ células/ml, 131 x 10⁶ células/ml, 132 x 10⁶ células/ml, 133 x 10⁶ células/ml, 134 x 10⁶ células/ml, 135 x 10⁶ células/ml, 136 x 10⁶ células/ml, 137 x 10⁶ células/ml, 138 x 10⁶ células/ml, 139 x 10⁶ células/ml, 140 x 10⁶ células/ml, 141 x 10⁶ células/ml, 142 x 10⁶ células/ml, 143 x 10⁶ células/ml, 144 x 10⁶ células/ml, 145 x 10⁶ células/ml, 146 x 10⁶ células/ml, 147 x 10⁶ células/ml, 148 x 10⁶ células/ml, 149 x 10⁶ células/ml, 150 x 10⁶ células/ml, 151 x 10⁶ células/ml, 152 x 10⁶ células/ml, 153 x 10⁶ células/ml, 154 x 10⁶ células/ml, 155 x 10⁶ células/ml, 156 x 10⁶ células/ml, 157 x 10⁶ células/ml, 158 x 10⁶ células/ml, 159 x 10⁶ células/ml, 160 x 10⁶ células/ml, 161 x 10⁶ células/ml, 162 x 10⁶ células/ml, 163 x 10⁶ células/ml, 164 x 10⁶ células/ml, 165 x 10⁶ células/ml, 166 x 10⁶ células/ml, 167 x 10⁶ células/ml, 168 x 10⁶ células/ml, 169 x 10⁶ células/ml, 170 x 10⁶ células/ml, 171 x 10⁶ células/ml, 172 x 10⁶ células/ml, 173 x 10⁶ células/ml, 174 x 10⁶ células/ml, 175 x 10⁶ células/ml, 176 x 10⁶ células/ml, 177 x 10⁶ células/ml, 178 x 10⁶ células/ml, 179 x 10⁶ células/ml, 180 x 10⁶ células/ml, 181 x 10⁶ células/ml, 182 x 10⁶ células/ml, 183 x 10⁶ células/ml, 184 x 10⁶ células/ml, 185 x 10⁶ células/ml, 186 x 10⁶ células/ml, 187 x 10⁶ células/ml, 188 x 10⁶ células/ml, 189 x 10⁶ células/ml, 190 x 10⁶ células/ml, 191 x 10⁶ células/ml, 192 x 10⁶ células/ml, 193 x 10⁶ células/ml, 194 x 10⁶ células/ml, 195 x 10⁶ células/ml, 196 x 10⁶ células/ml, 197 x 10⁶ células/ml, 198 x 10⁶ células/ml, 199 x 10⁶ células/ml o 200 x 10⁶ células/ml, o más. En una realización preferida, la conmutación desde el cultivo en perfusión hacia el cultivo semicontinuo se produce a una densidad de células de al menos aproximadamente 50 x 10⁶ células/ml. En una realización más preferida, la conmutación se produce a una densidad de células de al menos aproximadamente 100 x 10⁶ células/ml.

30 Según se usa en el presente documento, el término "proceso semicontinuo con súper densidad", "proceso SDF" y "proceso semicontinuo de cultivo celular con súper densidad" se usan de forma intercambiable y se refieren al proceso de cultivar células en un cultivo celular en perfusión y transferir después las células a un modo de cultivo semicontinuo, una vez que las células alcanzan una elevada densidad de células (por ejemplo, al menos por encima de 50 x 10⁶ células/ml).

35 La transición desde el cultivo celular en perfusión hacia el cultivo celular semicontinuo se produce una vez que se alcanza una elevada densidad de células (como se ha analizado anteriormente). Una elevada densidad de células puede conseguirse en cualquier momento después de la inoculación del cultivo celular, dependiendo de la velocidad de crecimiento de la línea celular y de la densidad de siembra. En una realización, la densidad elevada puede alcanzarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24 o 25 días después de la inoculación. En una realización preferida, la densidad elevada se alcanza entre aproximadamente 4 y 17 días después de la inoculación.

Según se usa en el presente documento, el término "densidad de células viables" se refiere al número de células vivas presentes en un volumen dado de medio en un conjunto dado de condiciones experimentales.

45 Según se usa en el presente documento, el término "viabilidad celular" se refiere a la capacidad de las células del cultivo para sobrevivir en un conjunto dado de condiciones o de variaciones experimentales. El término, según se usa en el presente documento, se refiere también a aquella porción de células que está viva en un momento en particular con respecto al número total de células (por ejemplo, vivas y muertas) en el cultivo en ese momento.

50 Según se usa en el presente documento, "la fase de crecimiento" de un cultivo celular se refiere a la fase durante la cual la densidad de células viables en cualquier punto temporal es mayor que en cualquier punto temporal previo.

Según se usa en el presente documento, la "fase de producción" de un cultivo celular se refiere a la fase durante la cual las células producen unas cantidades significativas de proteína, que se acumula para el futuro procesado.

55 Según se usa en el presente documento, el término "integral celular" se refiere a la cantidad global de células viables durante el transcurso de un perfil de crecimiento celular.

60 Según se usa en el presente documento, el término "título" se refiere a la cantidad total de proteína producida por un cultivo celular, dividida por una cantidad dada de volumen de medio. En esencia, el término "título" se refiere a una concentración, y normalmente se expresa en unidades de miligramos de polipéptido por litro de medio. Los métodos de la presente invención tienen el efecto de aumentar sustancialmente el título del producto de polipéptido, en comparación con el título del producto de polipéptido producido a partir de otros métodos de cultivo celular conocidos en la materia.

65 Según se usa en el presente documento, los términos "medios", "medios de cultivo celular" y "medios de cultivo",

incluyendo las variaciones gramaticales de los mismos, se usan de forma intercambiable y se refieren a la solución nutritiva en la que se cultivan las células (preferentemente células animales o de mamífero) de un cultivo. El medio de cultivo celular es el entorno fisicoquímico, nutricional y hormonal de las células, y normalmente incluye al menos uno o más componentes entre los siguientes: una fuente de energía (por ejemplo, en forma de un carbohidrato tal como glucosa); aminoácidos esenciales, incluyendo los 20 aminoácidos básicos más cisteína; vitaminas y/u otros compuestos orgánicos que normalmente son necesarios a unas concentraciones bajas; lípidos o ácidos grasos libres (por ejemplo, ácido linoleico); y oligoelementos (por ejemplo, compuestos inorgánicos o elementos naturales que normalmente son necesarios a unas concentraciones muy bajas, habitualmente en el intervalo micromolar). El medio puede ser sólido, gelatinoso, líquido, gaseoso o una mezcla de fases y materiales.

Las células utilizadas en los métodos de la presente invención pueden cultivarse y mantenerse en cualquiera de los diversos medios de cultivo celular que se conocen en la materia o están disponibles en el mercado. El experto habitual en la materia puede optar por usar uno o más medios de cultivo celular conocidos que se seleccionan para maximizar el crecimiento celular, la viabilidad celular y/o la producción de proteína en una célula hospedadora cultivada en particular. Algunos ejemplos de medio de cultivo celular incluyen cualquier medio adecuado para el cultivo de células que puedan expresar una proteína de interés, incluyendo, pero no se limitan a, un medio exento de componentes animales, tal como medio EX-CELL® TiterHigh (SAFC) y un medio definido químicamente, tal como medio CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) y CD OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)

Adicionalmente, el medio de cultivo celular puede complementarse opcionalmente para que incluya uno o más componentes adicionales en las concentraciones o cantidades apropiadas, según sea necesario o se desee, y como conocerán y llevarán a la práctica los expertos habituales en la materia. Algunos ejemplos de complementos incluyen, pero no se limitan a, agentes químicos de selección génica, hormonas y otros factores de crecimiento, (por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, suero, somatotropina, extracto de pituitaria, aprotinina); sales (por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato) y tampones (por ejemplo, HEPES (ácido 4-[2-hidroxitil]-1-piperazinetsulfónico)); nucleósidos y bases (por ejemplo, adenosina, timidina, hipoxantina); proteína e hidrolizados; antibióticos (por ejemplo, gentamicina); agentes protectores celulares (por ejemplo, un poliol Pluronic (PLURONIC® F68)) y proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina). Los complementos que ayudan al crecimiento y mantenimiento de algunos cultivos celulares en particular son susceptibles de ser fácilmente determinados por los expertos habituales en la materia, tal como se describe, por ejemplo, en Barnes et al. (Cell, 22: 649 (1980)); en Mammalian Cell Culture, Mather, J. P., ed., Plenum Press, NY (1984); y en la Patente de EE.UU. nº 5.721.121.

Según se usa en el presente documento, el término "biorreactor" se refiere a cualquier aparato, contenedor o recipiente cerrado (por ejemplo, una cámara de fermentación) que se usa para el crecimiento de los cultivos celulares. Los biorreactores permiten el control de varios parámetros durante el proceso de cultivo celular, que incluyen, pero no se limitan a, el flujo del bucle de circulación, el pH, la temperatura, la sobrepresión y/o la velocidad de perfusión del medio. Algunos biorreactores incluyen biorreactores disponibles comercialmente, fermentadores clásicos y sistemas de cultivos celulares en perfusión, así como biorreactores desechables.

El biorreactor puede tener cualquier tamaño que sea útil para el cultivo de células a una escala deseable según un método de la invención. Por ejemplo, un biorreactor empleado en los métodos de la presente invención puede tener un volumen de al menos 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000 litros o más, o cualquier volumen intermedio.

Los métodos de la presente invención pueden emplear uno o más biorreactores. Por ejemplo, en una realización, el cultivo celular en perfusión y el cultivo celular semicontinuo pueden llevarse a cabo en el mismo biorreactor. En otra realización, el cultivo celular en perfusión puede llevarse a cabo en biorreactores independientes. En otra realización, las células del cultivo celular en perfusión pueden ser transferidas a múltiples biorreactores semicontinuos.

Un biorreactor adecuado puede estar formado (es decir, construido con) cualquier material que sea adecuado para contener cultivos celulares en las condiciones de cultivo de la presente invención y que sea favorable para el crecimiento y la viabilidad de las células. Por ejemplo, un biorreactor empleado en los métodos de la presente invención puede estar hecho de vidrio, de plástico o de metal. Sin embargo, los materiales que comprenden el biorreactor no deben interferir en la expresión ni en la estabilidad del producto de polipéptido. Los biorreactores adecuados son conocidos en la materia y están disponibles comercialmente.

Un biorreactor de perfusión usado en los métodos de la presente invención puede ser un biorreactor de perfusión desechable o cualquier otro biorreactor de perfusión tradicional. El biorreactor puede estar opcionalmente equipado con cualquier dispositivo de retención celular interno o externo que incluye, pero no se limita a, filtros rotatorios, filtros de membrana de flujo tangencial, membranas dinámicas, separadores ultrasónicos, sedimentadores por

gravedad, un dispositivo centrífugo continuo o de retención acústica de células, dispositivos de microfiltración, dispositivos de ultrafiltración, etc. En una realización en particular, el biorreactor es un biorreactor desechable equipado con una membrana de microfiltración que tiene un tamaño de poro de entre 1,2 y 10 µm.

- 5 Según se usa en el presente documento, el término "antiespumante" se refiere a un agente que puede ser añadido a un cultivo celular para impedir la formación de un exceso de espuma. Algunos ejemplos de agentes antiespumantes incluyen, pero no se limitan a, simeticona al 3 % elaborada por Invitrogen and HyClone. Los antiespumantes están disponibles en el mercado y pueden usarse a la discreción del experto habitual en la materia.
- 10 Los cultivos celulares englobados por los métodos de la presente invención pueden cultivarse a cualquier temperatura apropiada para el tipo celular y las condiciones de cultivo. En una realización, es deseable el uso de una temperatura de entre aproximadamente 30 °C y 38 °C, para mejorar la producción de proteína. En otra realización, la temperatura es de al menos aproximadamente 25 °C, 26 °C, 27 °, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C o 41 °C. También puede ser deseable usar diferentes temperaturas en diferentes momentos durante el cultivo.

A. Cultivo celular

- 20 Según se usa en el presente documento, el término "célula", se refiere a células animales, a células de mamífero, a cultivos de células, a células hospedadoras, a células recombinantes y a células hospedadoras recombinantes. Dichas células son generalmente líneas celulares obtenidas o derivadas de tejidos de mamífero que son capaces de crecer y de sobrevivir cuando se colocan en un medio que contiene los nutrientes y/o los factores de crecimiento apropiados. Las células utilizadas en los métodos de la presente invención son generalmente células animales o de mamífero que pueden expresar y secretar, o que pueden ser modificadas molecularmente para que expresen y secreten, grandes cantidades de una proteína en particular en el medio de cultivo. En una realización, la proteína producida por la célula puede ser endógena u homóloga de la célula. Alternativamente, la proteína es heteróloga, es decir, foránea, a la célula.

- 30 Cualquier célula que sea capaz de expresar la proteína de interés puede ser cultivada según los métodos de la presente invención. Hay disponibles numerosas líneas celulares en fuentes comerciales, que incluyen, pero no se limitan a, la Colección americana de cultivos tipo (ATCC). En una realización de la invención, el cultivo celular emplea células de hibridoma. La construcción de células de hibridoma productoras de anticuerpos es bien conocida en la materia. En otra realización de la invención, el cultivo celular emplea células CHO.

- 35 Algunas células representativas que pueden usarse en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, Per C6, HEK, COS, VERO076, BRL-3A, HepG2, MRC 5, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, células L, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, Mix, mielomas murinos (por ejemplo, SP2/0 y NSO) y células C2C12, DG44 (Chasin et al., Som. Cell Molec. Genet., 12: 555-556 (1986); y Kolkekar et al., Biochemistry, 36: 10901-10909 (1997)), la línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), las CHO denominadas ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), el clon CHO 13 (GEIMG, Génova, IT), el clon CHO B (GEIMG, Génova, IT), las CHO-K1/SF denominadas ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), las RR-CHOK1 denominadas ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), células CHO negativas para la reductasa de dihidrofolato (CHO-DHFR, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77: 4216 (1980)) y células dp12.CHO (Patente de EE.UU. n° 5.721.121);
- 45 células de riñón de mono CV1 transformadas con SV40 (células COS, COS-7, ATCC® CRL-1651); células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293 o células 293 subclonadas para su cultivo en un cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)); células de riñón de cachorro de hámster (BHK, ATCC® CCL-10); células de riñón de mono (CV1, ATCC® CCL-70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC® CRL-1587; VERO, ATCC® CCL-81); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC® CCL-2); células de riñón canino (MDCK, ATCC® CCL-34); células de pulmón humano (W138, ATCC® CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC® CCL-51); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL-1442); células TRI (Mather, Annals NY Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); células MCR 5; células FS4, así como líneas celulares de primate transformadas, hibridomas, células diploides normales y cepas de células
- 55 derivadas de cultivos *in vitro* de tejido primario y de explantes primarios.

- Las células adecuadas para su cultivo en los métodos de la presente invención pueden contener introducidos (por ejemplo, a través de una transformación, de una transfección, de una infección o de una inyección) vectores de expresión (construcciones), tales como plásmidos y similares, que portan secuencias codificantes (o porciones de las mismas), que codifican una proteína deseada. Dichos vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada, y generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señalización, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

- 65 Los métodos y las técnicas para la construcción de vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas producidas, así como los elementos apropiados de control de la transcripción y de la traducción, son

bien conocidos en la materia. Dichos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y de recombinación genética *in vivo* (véase, por ejemplo, Sambrook J. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989) y Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1989)).

5 Las construcciones de expresión pueden ser introducidas en las células a través de una gran diversidad de métodos rutinarios de transferencia génica conocidos en la materia. Por ejemplo, dichos métodos pueden incluir, pero no se limitan a, los métodos convencionales de transfección génica, tales como una coprecipitación con fosfato de calcio, una transfección liposomal, una microinyección, una electroporación y una infección o una transducción vírica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.399.216, 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)).

15 Cualquiera de los diversos vectores de expresión conocidos puede ser adecuado para las células hospedadoras eucariotas cultivadas según los métodos de la invención, incluyendo, pero no se limitan a, vectores para células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene), vectores retrovíricos (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pcDNA-3 (Invitrogen), vectores adenovíricos; vectores víricos adenoasociados, vectores de baculovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)) o formas modificadas de cualquiera de los anteriores. Los vectores también pueden contener secuencias potenciadoras secuencia arriba o secuencia abajo de las secuencias de la región promotora, para la optimización de la expresión génica.

25 Los elementos de control (por ejemplo, las secuencias reguladoras) son aquellas regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores y regiones no traducidas en 5' y en 3', que interactúan con las proteínas celulares del hospedador para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos varían en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y de la célula hospedadora en particular, puede usarse cualquiera de los diversos elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. En los sistemas de células de mamífero se prefieren los promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Las construcciones para su uso en los sistemas de expresión de proteínas están diseñadas para contener al menos un promotor, una secuencia potenciadora (opcional, para los sistemas de expresión de mamífero) y otras secuencias según sea necesario o se requiera para una apropiada transcripción y regulación de la expresión génica (por ejemplo, secuencias de inicio y de terminación de la transcripción, sitios de origen de replicación, secuencias de poliadenilación). La selección del vector apropiado para una apropiada transcripción, expresión y aislamiento de las proteínas producidas en sistemas de expresión eucariotas (por ejemplo, de mamífero) es conocida y está en la pericia habitual de la materia.

40 Las secuencias de control eucariotas usadas habitualmente para su uso en vectores de expresión de mamífero incluyen secuencias promotoras y de control compatibles con las células de mamífero, tales como, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus (CMV) (vector CDM8) y el virus del sarcoma aviar (ASV). Otros promotores usados habitualmente incluyen los promotores tempranos y tardíos del virus de simio 40 (SV40) (Fiers et al., *Nature*, 273: 113 (1973)) u otros promotores víricos tales como los obtenidos a partir de polioma, Adenovirus 2 y el virus del papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin et al., *Nature*, 299: 797-802 (1982)).

45 B. Producción de proteínas

Según se usa en el presente documento, los términos "polipéptido", "producto polipeptídico", "proteína" y "producto proteico" se usan de forma intercambiable y, como se sabe en la materia, se refieren a una molécula que consiste en dos o más aminoácidos, por ejemplo, al menos una cadena de aminoácidos unida a través de enlaces peptídicos secuenciales. En una realización, una "proteína de interés" o un "polipéptido de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógena que ha sido transformada en una célula hospedadora, en la que el ADN exógeno determina la secuencia de aminoácidos. En otra realización, una "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es endógena a la célula hospedadora.

55 Pueden producirse numerosos polipéptidos mediante los métodos de la presente invención. Algunos ejemplos de polipéptidos incluyen productos cárnicos, proteínas naturales, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores. Los polipéptidos también pueden incluir una o más modificaciones, tales como, por ejemplo, una fracción lipídica, un fosfato, una fracción de azúcar, etc. Algunos polipéptidos en particular que pueden ser deseables para su expresión en un método de la invención incluyen, pero no se limitan a, citocinas, receptores de citocinas, factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER-2), factor de crecimiento de fibroblastos alfa (FGF- α), factor de crecimiento de fibroblastos beta (FGF- β), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF-2), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento nervioso beta (NGF- β)); receptores de factores de crecimiento, incluyendo proteínas de fusión o quiméricas, hormonas de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento humana, hormona de

crecimiento bovina); insulina (por ejemplo, cadena A de la insulina y cadena B de la insulina), proinsulina; eritropoyetina (EPO); factores estimulantes de colonias (por ejemplo, factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF)); interleucinas (por ejemplo, desde la IL-1 hasta la IL-12); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGF-R); interferones (por ejemplo, IFN- α , β , o γ) y sus receptores; factor de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF- α y TNF- β) y sus receptores, TNFR-1 y TNFR-2; trombopoyetina (TPO); trombina; péptido natriurético cerebral (BNP); factores de coagulación (por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, factor de von Willebrand, y similares); factores anticoagulantes; activador tisular del plasminógeno (TPA), por ejemplo, urocinasa o TPA de orina humana o de tipo tisular; hormona foliculoestimulante (FSH); hormona luteinizante (LH); calcitonina; proteínas CD (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD28, CD19, etc.); proteínas CTLA (por ejemplo, CTLA4); proteínas del receptor de los linfocitos T y de los linfocitos B; proteínas morfogenéticas óseas (BMP, por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, etc.); factores neurotróficos, por ejemplo, factor neurotrófico óseo (BDNF); neurotrofinas, por ejemplo, 3-6; renina; factor reumatoide; RANTES (expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación); albúmina; relaxina; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorrelinaxina; proteína inhibidora de los macrófagos (por ejemplo, MIP-1, MIP-2); proteínas o antígenos víricos; proteínas de la superficie de la membrana; proteínas de canales iónicos; enzimas; proteínas reguladoras; anticuerpos; proteínas inmunomoduladoras, (por ejemplo, HLA, MHC, la familia B7); receptores de migración dirigida; proteínas de transporte; dismutasa de superóxido (SOD); proteínas de receptores acoplados a proteínas G (GPCR); proteínas neuromoduladoras; proteínas y péptidos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, (por ejemplo, A- β), hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; glucagón; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; bombesina; factor de crecimiento hemopoyético; encefalinasa; una albúmina sérica (por ejemplo, albúmina sérica humana); hormona antimülleriana; péptido asociado a las gonadotropinas; DNasa; inhibina; activina; receptores de hormonas o de factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; PD-1 y PD-L1 (B7-H1 y ligando); y B7-H4, factores osteoinductores; inmunotoxinas; factor acelerador de la desintegración; y otros, como se sabe en la materia, proteínas y polipéptidos de fusión, proteínas y polipéptidos quiméricos y fragmentos o porciones, o mutantes, variantes o análogos de cualquiera de las proteínas y de los polipéptidos mencionados anteriormente.

En algunas formas de realización adicionales, pueden usarse los métodos de la presente invención para la producción de inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), de moléculas que contienen un dominio de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, moléculas que contienen un dominio de ancirina o fibronectina) y proteínas de fusión Fc. Se entiende que el término "proteína de fusión Fc", según se usa en el presente documento, engloba proteínas terapéuticas que comprenden una fracción derivada de una inmunoglobulina (es decir, una fracción Fc) y una fracción derivada de una segunda proteína que no es una inmunoglobulina.

En una realización en particular de la invención, el polipéptido producido mediante los métodos de la presente invención es un anticuerpo. El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio para cubrir cualquier tipo de anticuerpo conocido, incluyendo, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos multi-específicos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), inmuno-adhesinas, quimeras de anticuerpo-inmuno-adhesina, anticuerpos humanizados, humanos, quiméricos, de cadena única, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados o generados *in vitro*. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de un anticuerpo. El anticuerpo puede seleccionarse entre cualquiera de los isotipos de anticuerpos conocidos, por ejemplo, IgA, IgG, IgD, IgE, IgM. El anticuerpo puede ser un monómero, un dímero o un multímero (por ejemplo, un trímero o un pentámero).

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina," según se usan de forma intercambiable en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes de disulfuro. Cada cadena pesada está formada por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está formada por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está formada por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está formada por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones en marco (FR). Cada V_H y V_L está formada por tres CDR y cuatro FR, y dispuestas desde el amino terminal hacia el carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con los tejidos o los factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complemento clásico.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser

- llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo completo. Algunos ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un dAb que incluye los dominios V_H y V_L ; (vi) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989)), que consiste en un dominio V_H ; (vii) un dAb que consiste en un dominio V_H o V_L ; y (viii) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR) o (ix) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un conector sintético. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes distintos, pueden ser unidos mediante el uso de métodos recombinantes con un conector sintético que les permite ser creados en forma de una cadena proteica única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85: 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos de cadena única también pretenden estar englobados en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos son cribados para evaluar su utilidad de la misma forma que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno pueden ser producidas mediante técnicas de ADN recombinante o mediante una escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.
- El término "anticuerpo monoclonal", según 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 comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueda haber presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, al contrario que las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando la tecnología convencional de hibridoma descrita en primer lugar por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden ser elaborados usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden ser aislados a partir de colecciones de anticuerpos de fagos, por ejemplo, usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); en Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); y en las Patentes de EE.UU. nº 5.223.409; 5.403.484; 5.571.698; 5.427.908 5.580.717; 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915; y 6.593.081.
- Un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos pueden ser producidos mediante diversos métodos que incluyen la fusión de hibridomas por la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992).
- Un "anticuerpo aislado", según se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen unas especificidades antigénicas diferentes. Además, un anticuerpo aislado normalmente está sustancialmente exento de otro material celular y/o de sustancias químicas. En una realización de la invención, se combinan en una composición bien definida múltiples anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen unas especificidades de unión diferentes.
- Según se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada. En una realización, un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo es de un isotipo seleccionado entre los isotipos de anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.
- Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" y "humanizados" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga de las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de una especie en particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo de las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851-6855 (1984)). Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor están sustituidos por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o un primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región en marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el

anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, 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). Los anticuerpos quiméricos o humanizados pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas puede ser obtenido a partir del hibridoma murino de interés y modificado para que contenga secuencias de inmunoglobulinas no murinas (por ejemplo, humanas) usando las técnicas de biología molecular habituales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico pueden unirse las regiones variables murinas a las regiones constantes humanas usando los métodos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.816.567 a favor de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado pueden insertarse las regiones CDR murinas en un marco humano usando métodos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5.225.539 a favor de Winter y las Patentes de EE.UU. nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 a favor de Queen et al.).

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento también incluyen anticuerpos "humanos", que pueden ser aislados a partir de diversas fuentes que incluyen, por ejemplo, a partir de la sangre de un paciente humano, o prepararse recombinantemente usando animales transgénicos. Algunos ejemplos de dichos animales transgénicos incluyen KM-MOUSE® (Medarex, Inc., Princeton, NJ) que tiene un transgen de una cadena pesada humana y un transcromosoma de una cadena ligera humana (véase el documento WO 02/43478), XENOMOUSE® (Abgenix, Inc., Fremont CA; descrito, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 a favor de Kucherlapati et al.) y HUMAB-MOUSE® (Medarex, Inc.; descrito, por ejemplo, en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research*, 20: 6287-6295 (1992); Chen, J. et al., *International Immunology*, 5: 647-656 (1993); Tuailon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 3720-3724 (1993); Choi et al., *Nature Genetics*, 4: 117-123 (1993); Chen, J. et al., *EMBO J.*, 12: 821-830 (1993); Tuailon et al., *J. Immunol.*, 152: 2912-2920 (1994); Taylor, L. et al., *International Immunology*, 6: 579-591 (1994); y Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); las Patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; 5.545.807; y las Publicaciones PCT nº WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, WO 01/14424 a favor de Korman et al.). Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de forma que pueda generarse la respuesta de un anticuerpo humano tras una inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. nº 5.476.996 y 5.698.767 a favor de Wilson et al.

Otro ejemplo del tipo de proteína que puede producirse usando los métodos de la presente invención es una proteína de fusión. Una proteína de fusión es una proteína, o un dominio de una proteína (por ejemplo, un dominio extracelular soluble) fusionado con una proteína o un péptido heterólogo. Algunas proteínas de fusión representativas incluyen, pero no se limitan a, las proteínas expresadas en forma de una fusión con una porción de una molécula de una inmunoglobulina, las proteínas expresadas en forma de proteínas de fusión con una fracción de cremallera y nuevas proteínas polifuncionales, tales como una proteína de fusión de una citocina y un factor de crecimiento. El documento WO 93/08207 y el documento WO 96/40918 describen la preparación de varias formas oligoméricas solubles de una molécula denominada CD40L, que incluye una proteína de fusión de inmunoglobulina y una proteína de fusión de cremallera, respectivamente. Las técnicas descritas en el documento WO 93/08207 y en el documento WO 96/40918 son aplicables a otras proteínas. Hablando de forma general, cualquier molécula puede ser expresada en una proteína de fusión, incluyendo, pero no se limita a, el dominio extracelular de una molécula de un receptor celular, una enzima, una hormona, una citocina, una porción de una molécula de inmunoglobulina, un dominio de cremallera y un epítipo.

C. Clarificación y purificación del cultivo celular

La presente memoria descriptiva desvela métodos mejorados para la clarificación de un cultivo celular, por ejemplo, de forma que se facilite la recolección de la proteína expresada. Específicamente, la presente memoria descriptiva desvela un método para la clarificación de una proteína a partir de un cultivo celular ajustando el pH del cultivo celular hasta por debajo de un pH neutro (es decir, por debajo de un pH de 7) y sedimentando el cultivo celular, de forma que el cultivo celular se separe de la capa de sobrenadante y de la capa de lecho de células, en la que la proteína está presente y puede ser aislada a partir de la capa de sobrenadante. Los métodos divulgados en la presente memoria descriptiva pueden comprender etapas para mejorar el proceso de clarificación. Por ejemplo, después del aislamiento de la proteína a partir de la capa de sobrenadante, los métodos pueden comprender adicionalmente el lavado del lecho de células con el mismo tampón de pH, una sedimentación adicional y una filtración adicional de forma que pueda obtenerse un mayor rendimiento de proteína a partir del cultivo celular. Los métodos de clarificación descritos en el presente documento pueden usarse junto con el método de cultivo celular descrito anteriormente o con cualquier otro método de cultivo celular.

Según se usa en el presente documento, el término "capa de sobrenadante del cultivo celular" se refiere a la fracción líquida del cultivo celular, que incluye la fase líquida del lecho de células.

5 Según se usa en el presente documento, el término "capa de lecho de células" se refiere a la capa de biomasa del cultivo celular.

Según se usa en el presente documento, el término "sedimentación" se refiere al proceso para permitir que el cultivo celular repose sin alteraciones durante un periodo de tiempo, de forma que se facilite la separación del sobrenadante del lecho de células. El cultivo celular puede sedimentar durante cualquier periodo de tiempo, que incluye, pero no se limita a, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 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, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144 y 145 minutos. En una realización, el cultivo celular puede sedimentar durante entre aproximadamente 30-120 minutos. En otra realización, el cultivo celular puede sedimentar durante entre aproximadamente 30-60, 60-90 o 90-120 minutos.

20 Los cultivos celulares pueden ser clarificados usando los métodos descritos en el presente documento, tanto solos como junto con otras técnicas conocidas de clarificación y purificación. Dichos procesos conocidos incluyen, pero no se limitan a, filtración, centrifugación, precipitación (por ejemplo, precipitación con etanol o precipitación con sulfato de amonio), separación de fases, purificación por afinidad, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrófobas (HIC; usando resinas tales como fenil éter, butil éter o propil éter), HPLC, o fraccionamiento por inmutafinidad o columnas de intercambio iónico, SDS-PAGE inversa, o cualquier combinación de estas técnicas. También puede ser útil un inhibidor de la proteasa tal como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), para inhibir la degradación proteolítica durante la clarificación.

30 El experto en la materia apreciará que los métodos de clarificación adecuados para la proteína de interés pueden requerir una modificación para tener en cuenta los cambios en el carácter de la proteína tras la expresión en un cultivo celular recombinante. Adicionalmente, el grado de clarificación deseado dependerá de la proteína en particular y del uso previsto de la proteína. Las proteínas aisladas finalmente usando los métodos descritos en el presente documento pueden ser adecuadas para usos terapéuticos y diagnósticos.

35 Según se usa en el presente documento, el término "filtración profunda" se refiere a un tipo de filtración que se lleva a cabo usando un filtro de profundidad. Un filtro de profundidad tiene habitualmente múltiples capas de medio de filtración, cada una con un tamaño y una densidad variables, que se hacen progresivamente más finas y densas en la capa inferior. Un filtro de profundidad atrapa partículas en su estructura, no solo en la superficie.

40 Según se usa en el presente documento, el término "filtración de pulido" se refiere a un grado máximo de filtración profunda y de filtración con membrana.

La presente invención está ilustrada adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deberían ser interpretados como adicionalmente limitantes.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: proceso de cultivo celular semicontinuo con súper densidad

50 A. Métodos experimentales

Se expandieron células CHO recombinantes (es decir, células CHOK1SV productoras de anticuerpos) en matraces de cultivo celular antes de la inoculación del biorreactor de perfusión Wave. El biorreactor de perfusión se utilizó con el mismo medio basal que se usa en el proceso de expansión celular. La velocidad de perfusión se ajustó para mantener un cultivo sano con unas elevadas viabilidades celulares. En algunos experimentos, las células se concentraron hasta una densidad de células mayor, según fuera apropiado, mediante el ajuste del medio en los caudales de entrada y salida. Una vez alcanzada la densidad de células viables mayor de 50×10^6 células/ml, se inició el proceso de producción semicontinuo. Al cultivo se le suministró una combinación de modos de suministro en bolo y continuo, de forma que se controlara la osmolalidad y el nivel de glucosa. Después el cultivo celular se recogió cuando la viabilidad celular disminuyó hasta aproximadamente un 60-10 %.

60 B. Experimento 1

Las células fueron inoculadas en un BIOSTAT Cultibag (Sartorius) a aproximadamente $0,84 \times 10^6$ células/ml. La velocidad de perfusión específica (SPR) variaba entre 0,25 y $0,03 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹. Las células se concentraron aproximadamente 2,6 veces cuando se alcanzó una densidad de células viables de $12,6 \times 10^6$ células/ml. Después de una concentración, las células se cultivaron hasta $108,8 \times 10^6$ células/ml. Una vez que las

células alcanzaron $108,8 \times 10^6$ células/ml, se detuvo la perfusión y se inició inmediatamente el proceso semicontinuo. Durante el proceso semicontinuo, se realizaron uno o dos suministros en bolo a entre el 3 y el 10 % (es decir, el porcentaje entre el suministro y el volumen posterior al suministro) cada día para mantener la viabilidad celular. También se complementó con un suministro de glucosa en bolo para mantener un nivel suficiente. La densidad de células alcanzó las $124,66 \times 10^6$ células/ml con una viabilidad del 98 % el segundo día después del inicio del proceso semicontinuo. El porcentaje de suministro total fue de aproximadamente el 40 %. Como se muestra en el perfil de crecimiento y producción representado en la Figura 3, se consiguió una productividad final de 8,8 g/l en el proceso semicontinuo después de 6 días, con una viabilidad del 39 %.

10 C. Experimento 2

Las células fueron inoculadas en el WAVE BIOREACTOR® (GE Healthcare, Fairfield, CT) a aproximadamente $0,81 \times 10^6$ células/ml. La velocidad de perfusión específica (SPR) variaba entre 0,07 y $0,01 \times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹ y variaba en diferentes puntos temporales. Las células se concentraron aproximadamente 1,5 veces durante una noche entre los días 15 y 16. El día 16, la densidad de células alcanzó hasta $136,5 \times 10^6$ células/ml. En este punto temporal, se detuvo el proceso de perfusión y se inició el proceso semicontinuo. Se llevaron a cabo uno o dos suministros en bolo a entre el 1 y el 6 % en los dos primeros días para mantener la viabilidad celular. El suministro continuo de glucosa y/o de otros nutrientes se inició el primer día del proceso semicontinuo para mantener el nivel de glucosa, así como para favorecer una tendencia creciente a una osmolalidad favorable, mientras se proporcionaban suficientes nutrientes.

Las células crecieron hasta $142,0 \times 10^6$ células/ml aproximadamente 7 horas después del inicio del proceso semicontinuo, y el porcentaje de suministro total fue de aproximadamente el 28 %. Como se muestra en el perfil de crecimiento y producción representado en la Figura 4, se consiguió una productividad final de 13,8 g/l después de 6 días con una viabilidad del 61 % a partir de la fase de producción semicontinua.

Durante este experimento se apreció con los componentes del suministro se caían desde la solución en las tuberías de la bomba durante el proceso de suministro continuo, posiblemente debido a un caudal lento. Como tal, en un estudio posterior se realizaron algunas modificaciones en los suministros (véase el Experimento # 5, a continuación) para prevenir la precipitación de los componentes del suministro en las tuberías de la bomba.

15 D. Experimento 3

Las células fueron inoculadas en el WAVE BIOREACTOR® (GE Healthcare, Fairfield, CT) a aproximadamente $1,20 \times 10^6$ células/ml. La velocidad de perfusión específica (SPR) variaba entre 0,07 y 0,03 (por ejemplo, 0,05) $\times 10^{-6}$ ml célula⁻¹ día⁻¹ y variaba en diferentes puntos temporales. Como se muestra en la Figura 5, las células fueron transferidas parcialmente el día 13 y el día 18 a dos biorreactores individuales con tanques de agitación de 5 litros a una densidad de células de aproximadamente 50×10^6 células/ml. También se añadió un antiespumante para evitar la espumación en los biorreactores. Como se muestra en el perfil de crecimiento y producción representado en la Figura 5, se consiguió una productividad final de 6,3 g/l a una viabilidad de aproximadamente el 40 % a partir de las células en semicontinuo transferidas el día 13 (es decir, las 2391AB) (véase la Figura 6). Se consiguió una productividad final de 7,1 g/l a una viabilidad de aproximadamente el 38 % a partir de las células en semicontinuo transferidas el día (es decir, las 2391BB) (véase la Figura 6).

20 E. Experimento 4

Se llevó a cabo un análisis de perfusión adicional para repetir el proceso de cultivo celular de los ejemplos anteriores en un único biorreactor de perfusión (es decir, de forma que tanto la perfusión como el semicontinuo se produjeran en el mismo biorreactor). Mediante la optimización del proceso de perfusión (por ejemplo, la velocidad de perfusión específica (SPR)), la densidad de células alcanzó más de 100×10^6 células/ml el día 8. La SPR se mantuvo en un intervalo de entre aproximadamente 0,15 y 0,05, para mantener las células en un estado estable y sano. Esto dio lugar a un aumento de más del 100 % en la velocidad de crecimiento de las células, en comparación con los análisis de perfusión iniciales (Experimentos # 1 y 2). La densidad de células aumentó en aproximadamente un 70 % por día.

Una vez que la densidad de células alcanzó más de 100×10^6 células/ml, se inició inmediatamente el proceso semicontinuo y se detuvo la perfusión de medio. Cada día se realizaron entre dos y tres suministros en bolo a entre el 2 y el 6 % durante tres días. El segundo día después del inicio del proceso semicontinuo, la densidad de células alcanzó las $119,5 \times 10^6$ células/ml y se consiguió una viabilidad del 98 %. Se llevó a cabo el suministro continuo de glucosa y/o de otros nutrientes a lo largo del proceso semicontinuo para mantener el nivel de glucosa y controlar la velocidad de aumento de la osmolalidad. El porcentaje en volumen del suministro total era de aproximadamente el 60 %.

La optimización de las concentraciones y de las proporciones en los componentes del suministro dio lugar a una solución transparente en las tuberías de las bombas durante el proceso de suministro continuo. No se observó ninguna precipitación visible. Sin embargo, el volumen de suministro aumentó significativamente en comparación con el experimento #2, lo que dio como resultado una concentración del producto más diluida. Como se muestra en

la Figura 7, la productividad volumétrica final fue de 8,9 g/l.

F. Resumen de los Experimentos 1-4

- 5 La Figura 8 resume la productividad y la integral celular de los Experimentos # 1-3 (es decir, en los que el proceso semicontinuo comenzó con más de 100×10^6 células/ml) y del Experimento # 4 (es decir, en el que el proceso semicontinuo comenzó con aproximadamente 50×10^6 células/ml). La productividad está representada en términos del título final real observado, así como del título normalizado (por ejemplo, normalizado según el volumen de partida y densidad de células en la perfusión final por 100 millones de células/ml). Por ejemplo, el título normalizado puede calcularse como sigue:

$$\text{título normalizado} = \text{título observado} / (\text{volumen de cultivo de partida} \times \text{densidad de células en la perfusión final en } 10^6 \text{ células/ml}) \times 100$$

15 G. Optimización de las condiciones de cultivo celular

Varios parámetros experimentales pueden ser ajustados para optimizar las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, el medio basal puede ser optimizado concentrando los nutrientes, de forma que se reduzca potencialmente el volumen de perfusión. Alternativamente o adicionalmente, el componente tamponante del pH del medio basal puede ser optimizado para manejar unas condiciones de pH bajo, típicas de los biorreactores con tanque de agitación tradicionales. Además, la composición del suministro y/o la estrategia del suministro pueden ser utilizadas para favorecer la productividad y la eficacia, manteniendo una buena solubilidad.

25 **Ejemplo 2: clarificación del proceso de cultivo celular semicontinuo con súper densidad**

Debido a las densidades celulares súper altas producidas en los métodos de cultivo descritos anteriormente, el cultivo resultante tiene un elevado porcentaje de volumen de sólidos en el lecho celular (por ejemplo, un 20 % de volumen del lecho celular para los cultivos cuando la densidad de células es mayor de 100×10^6 células/ml mediante una sedimentación natural o una centrifugación), y un sobrenadante muy turbio. Como tal, la recolección de la proteína puede ser un reto. Consecuentemente, se probaron varios métodos experimentales diferentes para mejorar la eficacia del proceso de recolección, es decir, sedimentación de las células, coadyuvante de filtración, adición de CaCl_2 , disminución del pH hasta 5,5 antes de la sedimentación de las células, así como varias combinaciones de estas técnicas.

35 Específicamente, se probaron varias condiciones usando el análisis 1201-09-29311AB del Experimento #3 (descrito anteriormente). Como se muestra en la Figura 9, el pH se redujo hasta 4,5 o 5,5, con o sin la adición de coadyuvante de filtración, antes de la sedimentación del cultivo celular durante 90 minutos. Todas las condiciones probadas redujeron significativamente la turbidez (representada en forma de barras en la Figura 9) después de la sedimentación de las células. En comparación con el título del biorreactor de control, un pH de 4,5 junto con un coadyuvante de filtración dio lugar a una cierta pérdida de producto mediante un ensayo de HPLC de la proteína A (representado como símbolos de rombos en la Figura 9).

45 Adicionalmente, la disminución en el pH o la adición de sales de calcio y/o de un coadyuvante de filtración antes de la sedimentación, el volumen del lecho celular aumentó hasta aproximadamente un 40-50 % y produjo un sobrenadante de células mucho más claro. Este proceso de clarificación mejorado también se probó con otras proteínas y se obtuvieron unos resultados similares. En resumen, una estrategia de sedimentación a pH bajo aumentó significativamente la capacidad de filtración y también aumentó la calidad del filtrado.

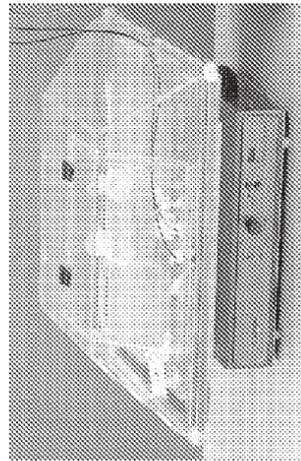
50 Pueden llevarse a cabo finalmente etapas adicionales, tales como un lavado del lecho con un producto tampón compatible o PBS diluido en las mismas condiciones de pH que las usadas para la sedimentación de las células, una sedimentación adicional y una filtración adicional, para mejorar el proceso de clarificación, como se muestra en la Figura 10. Sin embargo, debe apreciarse que la Figura 10 no pretende ser limitante y que las etapas opcionales adicionales (por ejemplo, filtración, centrifugación, lavado, etc.) pueden producirse en un orden diferente al representado en la Figura 10. Por ejemplo, la centrifugación puede llevarse a cabo opcionalmente antes o después del proceso de sedimentación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la producción de una proteína en un cultivo celular, que comprende:
- 5 a) cultivar las células que producen la proteína en un cultivo celular en perfusión hasta una densidad de células de al menos aproximadamente por encima de 50×10^6 células/ml; y
b) transferir las células a un cultivo celular semicontinuo, de forma que las células entren en una fase de producción;
- 10 en el que las células son células animales.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células se cultivan en el cultivo celular en perfusión hasta una densidad de células de entre aproximadamente 50×10^6 células/ml y 150×10^6 células/ml.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células se cultivan en el cultivo celular en perfusión hasta una densidad de células de al menos por encima de aproximadamente 100×10^6 células/ml.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína se selecciona entre el grupo que consiste en enzimas, receptores, proteínas de fusión, citocinas, factores reguladores, hormonas, agentes de unión al antígeno, proteínas terapéuticas y proteínas diagnósticas.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo celular en perfusión y el cultivo celular semicontinuo se realizan en un único biorreactor.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que en el que el cultivo celular en perfusión y el cultivo celular semicontinuo se realizan en biorreactores diferentes.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7, en el que el cultivo celular semicontinuo se realiza en múltiples biorreactores.
9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende adicionalmente la recolección de la proteína a partir del cultivo celular semicontinuo, y no del cultivo celular en perfusión.
- 35 10. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente la recolección de la proteína tanto a partir del cultivo en perfusión como del cultivo celular semicontinuo.

FIG. 1

Cultivo y producción en un único biorreactor



Biorreactor de perfusión y producción

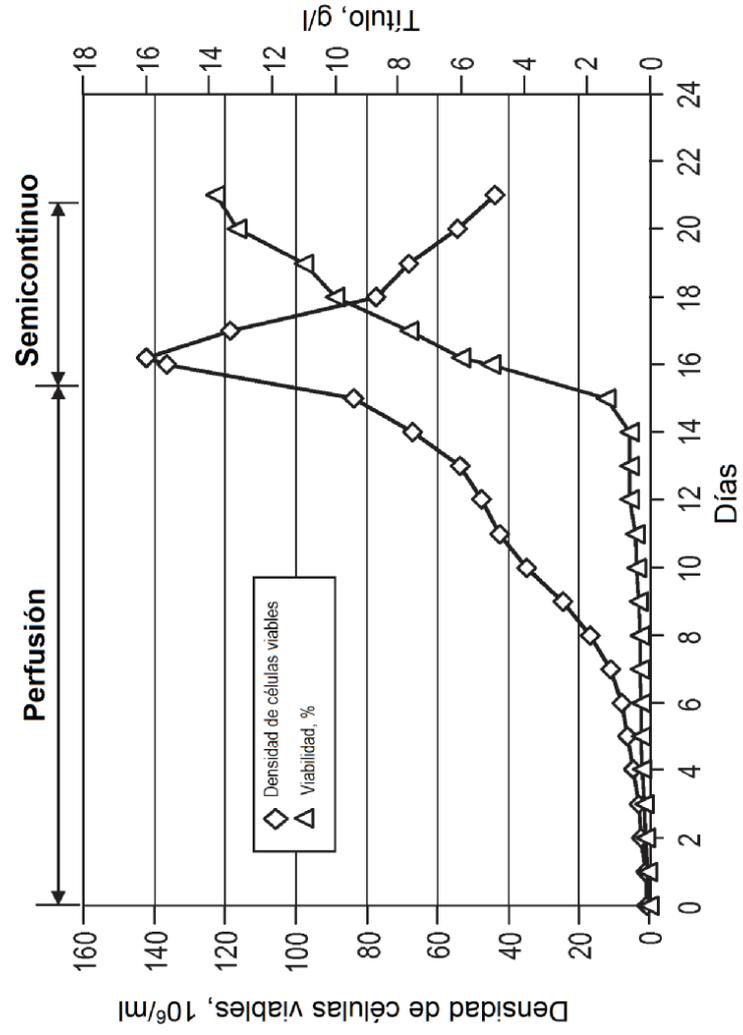
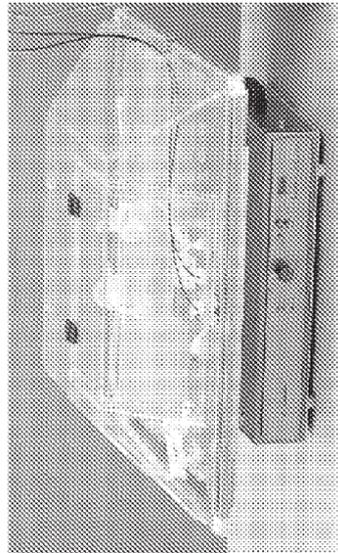


FIG. 2

Biorreactor de perfusión de siembra única hacia múltiples biorreactores



Biorreactor de perfusión

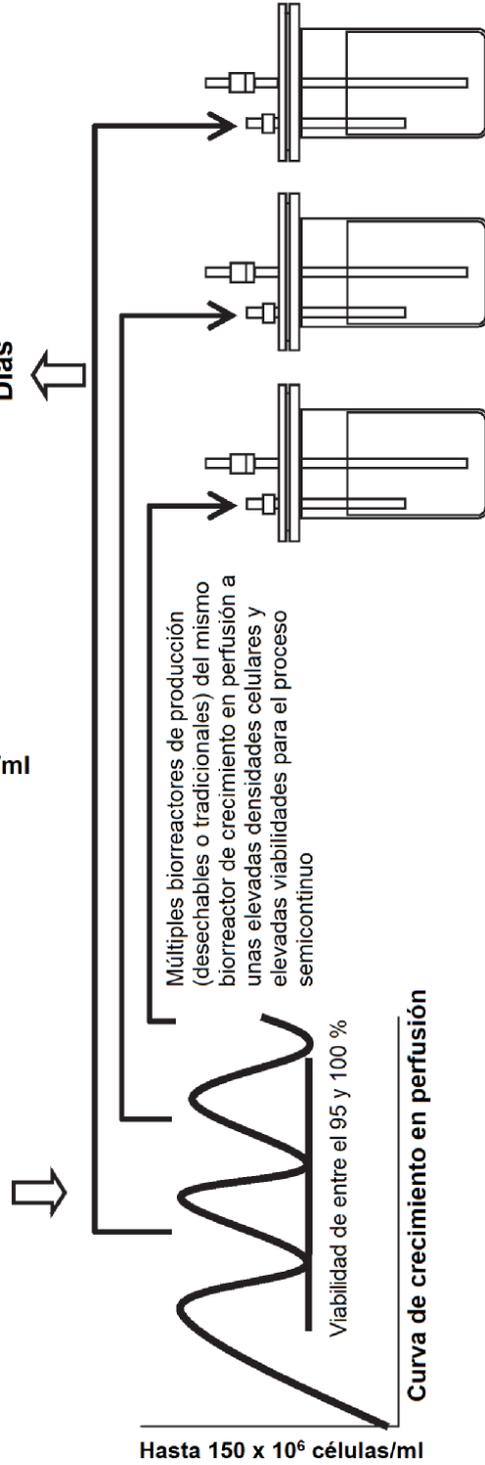
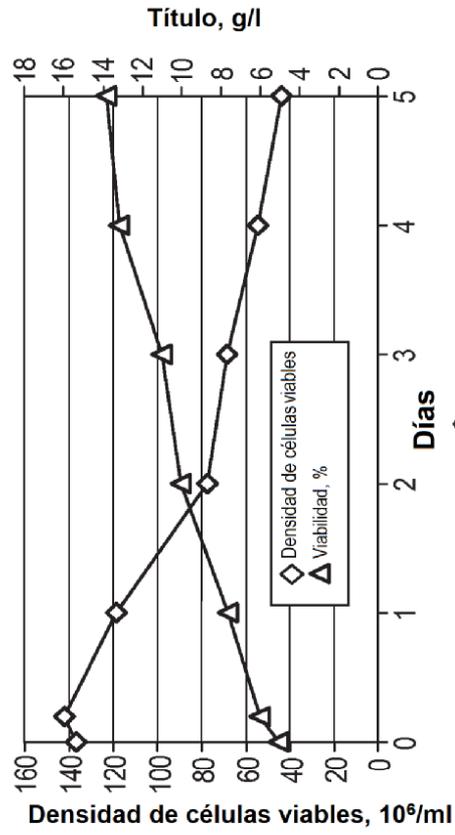


FIG. 3

Perfil del biorreactor para el experimento # 1

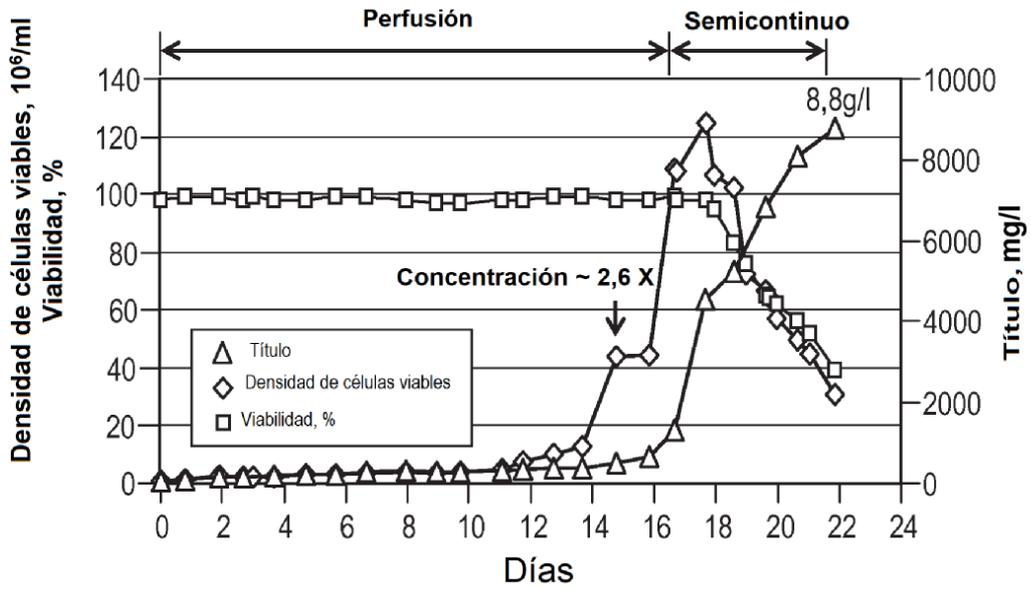


FIG. 4

Perfil del biorreactor para el experimento # 2

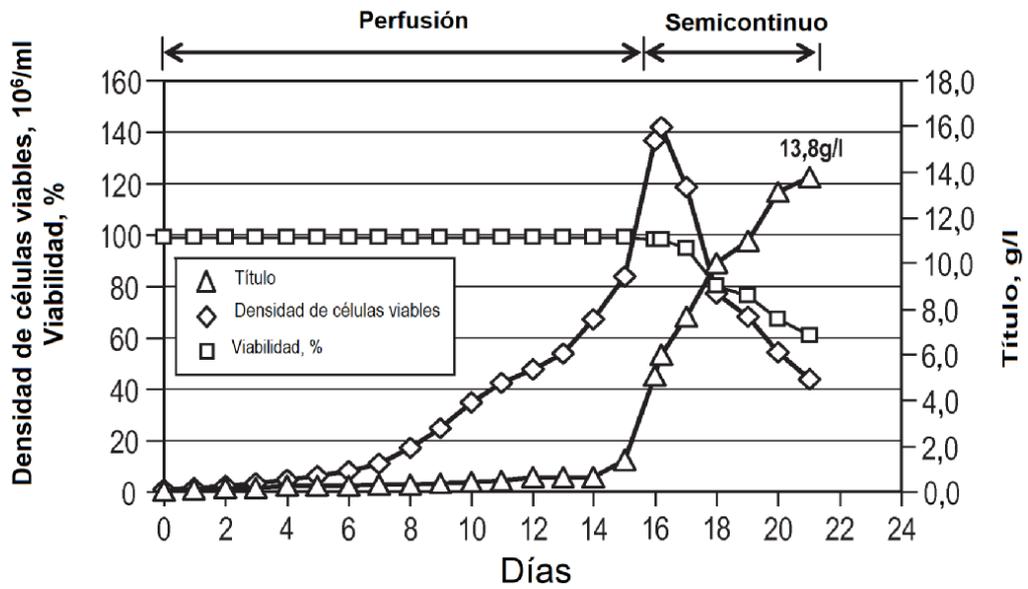


FIG. 5

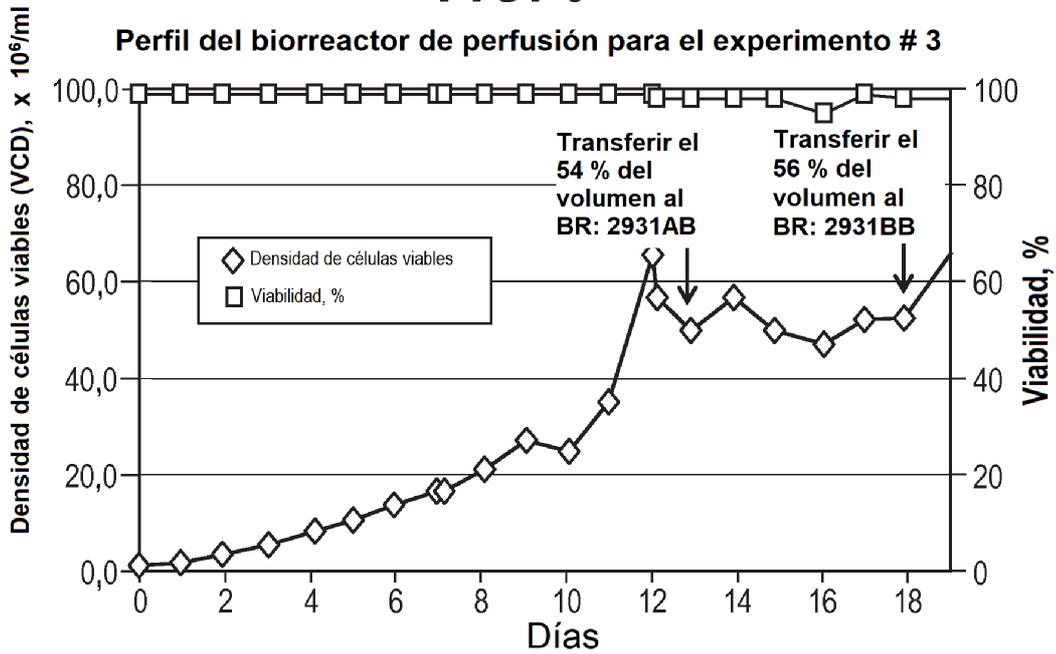


FIG. 6

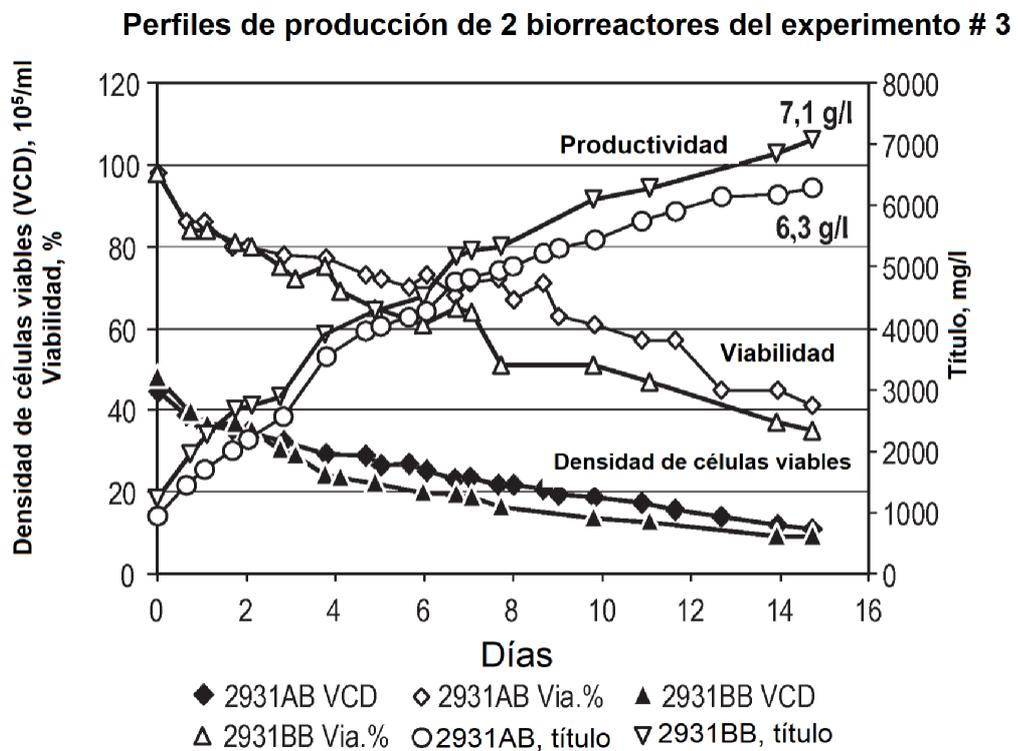


FIG. 7

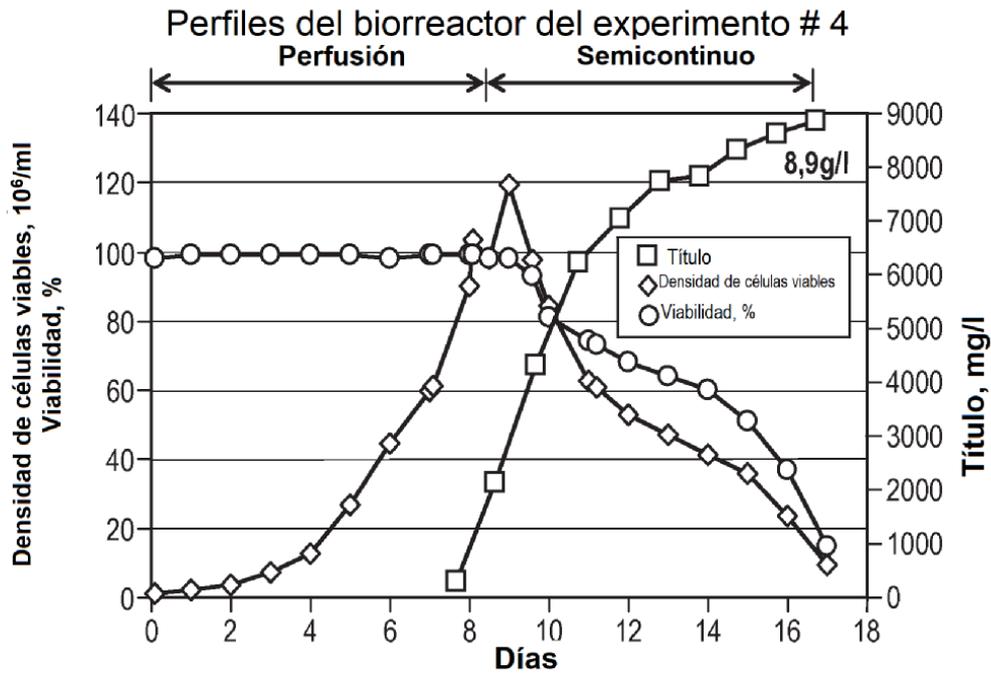


FIG. 8

Resumen de la productividad en función de la integral celular

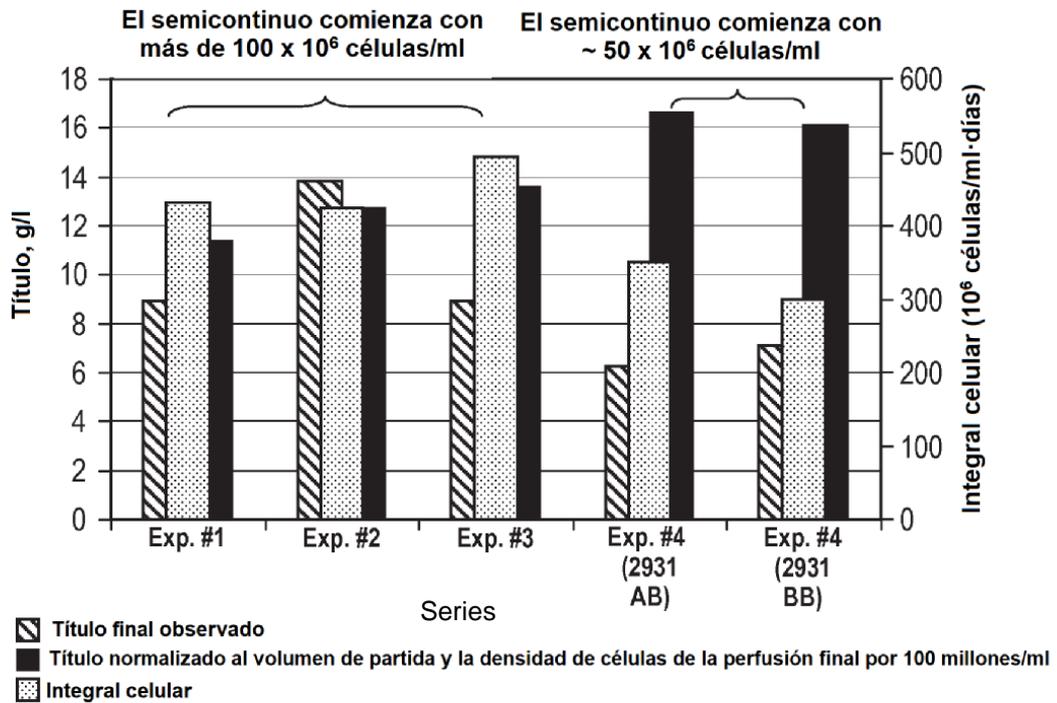


FIG. 9

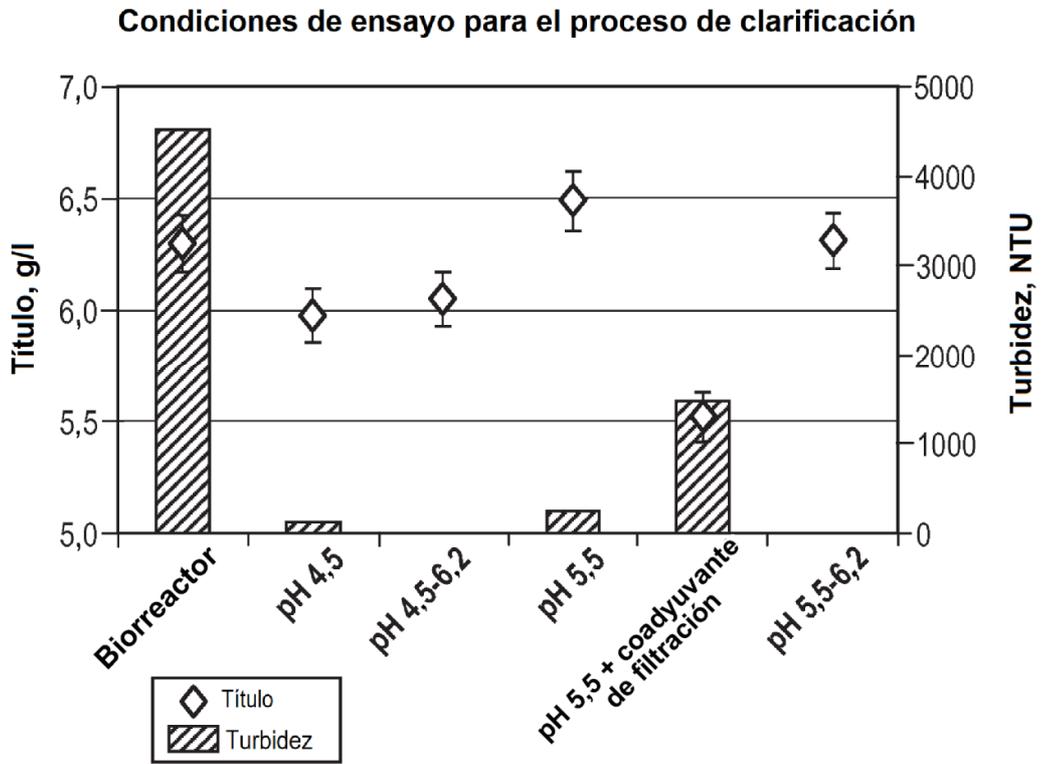


FIG. 10

Proceso de clarificación de un cultivo celular de alta densidad

