

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 042**

51 Int. Cl.:

<b>C12M 1/12</b>	(2006.01)	<b>C12N 5/073</b>	(2010.01)
<b>C12M 3/06</b>	(2006.01)		
<b>C12P 21/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)		
<b>B01D 15/26</b>	(2006.01)		
<b>B01D 69/08</b>	(2006.01)		
<b>C07K 16/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 1/18</b>	(2006.01)		
<b>C07K 1/22</b>	(2006.01)		
<b>C07K 1/34</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2007** **E 13169693 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2634243**

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

30 Prioridad:

**14.07.2006 EP 06014671**  
**06.02.2007 EP 07002571**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.01.2018**

73 Titular/es:

**PATHEON HOLDINGS I B.V. (100.0%)**  
**Herengracht 540**  
**1017 CG Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**ZIJLSTRA, GERBEN MEILE;**  
**HOF, ROBERT PATRICK y**  
**SCHILDER, JACOB**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

**ES 2 650 042 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

Proceso mejorado para el cultivo de células.

5 Esta invención se refiere a un proceso para el cultivo de células en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular.

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

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

20 Cuando mayor sea el volumen de líquido que contiene la sustancia biológica, más laboriosa se volverá la purificación de la sustancia biológica. La concentración de la sustancia biológica obtenida no es tan alta en los procesos como se desvela en los documentos WO04/099396 y WO05/095578. Por lo tanto, el procesamiento aguas abajo de esta sustancia biológica es engorroso, ya que la sustancia biológica necesita concentrarse antes de aplicar las etapas de purificación adicionales o han de purificarse grandes volúmenes de sustancia biológica menos concentrada.

25 Además, el cultivo de células a menores densidades celulares da como resultado una menor productividad volumétrica y, por lo tanto, requiere mayores y/o más cantidad de recipientes de cultivo y, por lo tanto, mayores inversiones en equipos para un nivel de producción dado.

Por lo tanto, es el objeto de la invención proporcionar un proceso en el que el producto se obtiene a partir del cultivo  
30 celular en concentraciones más altas.

Un objeto adicional de la presente invención es permitir el cultivo de las células y la producción del material biológico durante un periodo prolongado.

35 Estos objetos se logran mediante un proceso para el cultivo de células en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular, en el que las células producen una sustancia biológica deseada seleccionada de proteínas y vacunas, que puede usarse como un principio activo en una preparación farmacéutica, en el que al menos un componente de medio de cultivo celular se alimenta al cultivo celular, y en el que el cultivo celular que comprende las células, la sustancia biológica y el medio de cultivo celular circula sobre un filtro utilizando un flujo tangencial, y en el que el  
40 filtro tiene un tamaño de poro caracterizado por un corte de peso molecular de al menos 30 kDa y a lo sumo 100 kDa, adecuado para separar la sustancia biológica deseada de sustancias que tienen un peso molecular menor que la sustancia biológica deseada, en el que el flujo de salida de líquido del filtro contiene esencialmente sólo componentes que tienen un peso molecular menor que el de la sustancia biológica deseada, y en el que la sustancia biológica deseada se retiene en o se retroalimenta al reactor.

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

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

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

55 Una ventaja adicional del proceso de la presente invención es que se puede alcanzar una mayor concentración de células viables en comparación, por ejemplo, con los procesos por lotes o por lotes alimentados. Además, el tiempo de producción - el período durante el cual las células producen la sustancia biológica - se puede ampliar en comparación con los procesos por lotes o por lotes alimentados. Además, en comparación con un proceso por lotes

o por lotes alimentado, es posible utilizar un reactor más pequeño. El uso de reactores más pequeños es ventajoso, ya que esto reduce las inversiones en equipos e instalaciones relacionadas.

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

5

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

10

El proceso de la presente invención proporciona una ventaja considerable en cuando a la densidad celular, concentración de producto en el cultivo celular y periodo de cultivo prolongado en comparación con los procesos de acuerdo con los documentos WO05/095578 y WO04/099396. Como resultado, el presente proceso da como resultado una producción mejorada del material biológica deseado.

15

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

20

25

30

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

35

40

45

50

En una realización preferida, las células en el proceso de la presente invención son células HER inmortalizadas por E1, más preferiblemente células PER.C6 (véase la Patente de Estados Unidos 5.994.128). Las células PER.C6 se ilustran por células según se depositan bajo ECACC n.º 96022940 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.994.128, documento EP 0833934 B1).

55

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

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

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

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

Como se reivindica en el presente documento los sistemas de separación se limitan a los filtros.

El término "filtro", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir todos los dispositivos con la capacidad de separar las partículas en función de su tamaño o peso molecular. En principio, en el proceso de la presente invención, se puede utilizar cualquier filtro siempre y cuando el tamaño de poro o el MWCO se elijan de tal forma que la sustancia biológica se separe de sustancias que tengan un peso molecular más bajo que la sustancia biológica. Los ejemplos de filtros adecuados para su uso en la presente invención incluyen filtros de membrana, filtros de material cerámico y filtros metálicos. El filtro puede usarse en cualquier forma; el filtro puede ser, por ejemplo, enrollado en espiral o tubular o puede utilizarse en la forma de una hoja. Preferiblemente, en el proceso de la invención, el filtro utilizado es un filtro de membrana, preferiblemente un filtro de fibra hueca. Con la expresión "fibra hueca" se refiere a una membrana tubular. El diámetro interno del tubo es de al menos 0,1 mm, más preferiblemente al menos 0,5 mm, mucho más preferiblemente al menos 0,75 mm y preferiblemente el diámetro interno del tubo es como mucho de 10 mm, más preferiblemente como mucho de 6 mm, mucho más preferiblemente como mucho de 1 mm. Los módulos de filtro que comprenden fibras huecas están disponibles en el mercado, por ejemplo, en General Electric (GE, anteriormente Amersham).

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

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

Con el corte del peso molecular (MWCO) se refiere al peso molecular por encima del cual al menos el 90 % de las partículas quedan retenidas por el sistema de separación.

- Haciendo circular el cultivo celular por un sistema de separación, por ejemplo un filtro, significa que el cultivo celular se hace pasar a través de un sistema de separación, por ejemplo un filtro que da como resultado un flujo de salida de líquido y un flujo, cuyo contenido se mantiene en o se retroalimenta al reactor. El flujo, cuyo contenido se mantiene en o se retroalimenta al reactor, contendrá normalmente en esencia sólo componentes que tienen un peso molecular al menos igual al de la sustancia biológica o superior y, por lo tanto, dicho flujo comprenderá más sustancia biológica que el flujo de salida de líquido.
- En principio, no es crítico cuando se inicie la circulación del cultivo celular por el sistema de separación durante el proceso de la invención. La circulación del cultivo celular puede iniciarse, por ejemplo, directamente desde el inicio del proceso o cuando la densidad de células viables de las células ha alcanzado un cierto nivel.
- La circulación del cultivo celular por un filtro puede ser un flujo sustancialmente perpendicular con respecto a la superficie del filtro, también conocido como flujo de extremo muerto, o un flujo sustancialmente paralelo a la superficie del filtro, también conocido como flujo tangencial, por ejemplo flujo tangencial unidireccional (TFF) o flujo transversal. Un ejemplo preferido de flujo transversal es un flujo tangencial alterno (ATF), ya que con un ATF se encontró que no se produce (rápidamente) la obstrucción del filtro, incluso a densidades celulares muy altas. Es de conocimiento general común que en la filtración de profundidad, el filtro final de poros pequeños necesita ser protegido de la obstrucción por prefiltros gruesos. Esta práctica se basa en el conocimiento general común de que filtros con poros más pequeños o con un MWCO menor se obstruyen más fácilmente, limitando así el tiempo de producción. Si se utiliza un ATF, el uso de un prefiltro se convierte en superfluo.
- El flujo puede ser dirigido moviendo el cultivo celular, moviendo el filtro, o ambos. El filtro puede moverse, por ejemplo, por rotación (filtro rotatorio) o vibración (filtro vibratorio). Como alternativa, si el flujo se dirige moviendo el cultivo celular solamente, el filtro es estático y el cultivo celular puede moverse, por ejemplo, por medio de bombas o presión.
- Con "flujo tangencial alterno" se refiere a que existe un flujo en la misma dirección que (es decir, tangencial a) la o las superficies del filtro, flujo que va hacia atrás y adelante, y que existe otro flujo en una dirección sustancialmente perpendicular a dicha superficie de filtro. El flujo tangencial alterno se puede lograr de acuerdo con métodos conocidos por el experto en la técnica (por ejemplo como se describe en el documento US 6.544.424).
- Durante el cultivo de las células, al menos un componente del medio de cultivo celular, por ejemplo, uno o más nutrientes y/o medio de cultivo celular se puede suministrar a las células. En el procedimiento de acuerdo con la invención, es ventajoso complementar en parte, o preferiblemente en su totalidad, al menos uno de los nutrientes agotados por medio de una alimentación de este nutriente o estos nutrientes al reactor. Por ejemplo, se puede alimentar al reactor medio de cultivo celular completo, lo cual es ventajoso ya que entonces no se necesita preparar por separado una alimentación separada. El medio de cultivo celular también se puede, por ejemplo, alimentar a las células en una forma más concentrada; esto es ventajoso, ya que volúmenes más pequeños son más fáciles de manejar. También uno o más nutrientes pueden ser alimentados al reactor. Por ejemplo, hidratos de carbono, por ejemplo, glucosa o fructosa; aminoácidos, tales como glutamina y/o péptidos, pueden ser ventajosamente alimentados al reactor.
- En una realización preferida de la invención, las condiciones del cultivo celular se eligen de tal forma que no esté limitada la tasa de crecimiento celular y/o la productividad específica de las células, y más preferiblemente, de tal forma que la concentración de al menos uno de los componentes del medio de cultivo celular siga siendo esencialmente constante. Los ejemplos de condiciones de cultivo celular limitantes son limitaciones de nutrientes y la formación de metabolitos inhibidores tales como amoníaco, dióxido de carbono y lactato. Por ejemplo, las condiciones de cultivo celular tales como la alimentación, se pueden elegir de tal forma que la tasa de crecimiento celular no esté limitada, por ejemplo, mediante el suministro de nutrientes suficientes como para compensar el agotamiento y/o para evitar la producción de metabolitos inhibidores tales como lactato o amoníaco. Por ejemplo, las condiciones de aireación pueden elegirse de tal forma que la formación de dióxido de carbono no limite la tasa de crecimiento celular. El cultivo de la célula en condiciones no limitantes es muy ventajoso desde un punto de vista de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), ya que 1) esto puede dar un entorno de cultivo celular constante que en muchos casos también da una calidad del producto constante y buena y, 2) esto puede conducir a una viabilidad celular alta, en algunos casos a una viabilidad celular de más del 98 %. La viabilidad celular alta reduce la liberación de contaminantes celulares relacionados, tales como proteínas de la célula huésped, lo que facilita la purificación del

producto. Además, el cultivo de las células a una tasa de crecimiento celular ilimitada y/o una productividad específica ilimitada tiene la ventaja comercial de que es posible producir más sustancia biológica en un tiempo incluso más corto dado que se alcanzará antes una mayor densidad celular en el proceso.

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

La tasa de adición de al menos un componente del medio de cultivo celular, por ejemplo, nutrientes y/o medio de cultivo celular al cultivo celular (la tasa de entrada o tasa de perfusión), influye sobre la viabilidad y la densidad de  
10 las células. En el proceso de la invención, el componente o componentes del medio de cultivo celular, tales como nutrientes y/o medio de cultivo celular, pueden ser alimentados, por ejemplo, en un flujo continuo, un flujo semi-continuo, por ejemplo de flujo por etapas o flujo escalonado. Preferiblemente, el componente o componentes del medio de cultivo celular, por ejemplo, nutrientes y/o medio de cultivo celular, se añaden en un flujo continuo.

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

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

25 
$$\text{Tasa de alimentación} = \text{SFR} \times (\text{volumen total de cultivo celular}) \times (\text{densidad de células viables}) \quad (1)$$

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

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

En una realización especial de la invención, el cultivo celular (que comprende células, sustancia biológica y medio de cultivo celular) se retira al menos una vez del reactor y el líquido, por ejemplo, el medio de cultivo celular o una  
45 alimentación de nutrientes se añade al reactor para compensar la retirada del cultivo celular. La retirada de cultivo celular puede conducir a tiempos de proceso más largos a altas densidades celulares en combinación con altas viabilidades celulares lo que da como resultado una mayor productividad. El cultivo celular se puede eliminar de forma continua o por etapas.

En una realización preferida de la invención, el cultivo celular (que comprende células, medio de cultivo celular y  
50 sustancia biológica) se retira del reactor tan pronto como se alcance la densidad celular deseada, por ejemplo, una densidad celular de al menos  $10 \cdot 10^6$  células viables/ml, preferiblemente de al menos  $20 \cdot 10^6$  células viables/ml, más preferiblemente de al menos  $30 \cdot 10^6$  células viables/ml, por ejemplo una densidad celular de a lo sumo  $200 \cdot 10^6$  células viables/ml, y se añade líquido, por ejemplo, medio de cultivo celular o alimentación de nutrientes, al reactor para compensar la retirada de cultivo celular. Preferiblemente, el cultivo celular se retira a tal velocidad que la  
55 densidad celular se mantiene en el intervalo de densidades celulares deseado. Esta realización de la invención es muy ventajosa en comparación con un proceso por lotes o por lotes alimentado convencional, ya que combina las ventajas del proceso de la invención con alta viabilidad que se puede mantener más tiempo, haciendo posible realizar una aún mayor productividad volumétrica global. Con "productividad volumétrica" se refiere a la cantidad de sustancia biológica producida por unidad de volumen de reactor por unidad de tiempo y habitualmente se expresa en

g.l<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>. En comparación con un proceso de perfusión convencional, esta realización de la invención también es muy ventajosa, ya que combina las ventajas del proceso de la invención con una corriente de eliminación de cultivo celular que tiene una alta concentración de sustancia biológica. La alta concentración de sustancia biológica en la corriente de eliminación de cultivo celular hace que sea comercialmente interesante para recolectar la sustancia biológica de la misma. En un proceso de perfusión convencional, en el que se elimina cultivo celular, la corriente de eliminación de cultivo celular no contiene suficiente sustancia biológica como para hacerla comercialmente interesante para recolectar la sustancia biológica, y la corriente de separación de cultivo celular se considera, por lo tanto, habitualmente como un desecho. Por lo tanto, en esta realización de la invención, en teoría toda sustancia biológica producida se puede recolectar de una manera directa, económicamente viable y sencilla.

10

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

15

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

20

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

25

30

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

35

40

En el marco de la presente invención, con preparación farmacéutica se refiere a cualquier preparación, que puede ser utilizada como un medicamento, en particular, como un medicamento en seres humanos. Un medicamento de este tipo, por ejemplo, puede ser utilizado para el diagnóstico, o para el propósito profiláctico, tal como, por ejemplo, una vacuna, y/o para fines terapéuticos, tal como, por ejemplo, una enzima o proteína para la cual un paciente es deficiente, o un anticuerpo para matar células indeseadas. Una preparación farmacéutica puede contener además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, cuyos ejemplos se conocen bien por el experto en la técnica.

45

50

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

55

Los ejemplos de proteínas que se pueden utilizar como un principio activo en preparaciones farmacéuticas (con el nombre de la marca entre paréntesis) incluyen tenecteplasa (TN Kase™), factor antihemofílico (recombinante)

(ReFacto™), interferón linfoblastoide  $\alpha$ -n1 (Wellferon™), factor de coagulación (recombinante) (NovoSeven™), etanercept, (Enbrel™), trastuzumab (Herceptin™), infliximab (Remicade™), palivizumab (Synagis™), basiliximab (Simulect™), daclizumab (Zenapaz™), rituximab (Rituxan™), factor de coagulación (recombinante) IX (Benefix™) e interferón  $\beta$ -1a (Avonex™).

5

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

10

El pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo celular son, en principio, no críticos y dependen del tipo de célula elegida. Preferiblemente, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad se eligen de tal forma que sean óptimos para el crecimiento y la productividad de las células. El experto en la técnica sabe cómo encontrar el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad óptimos para el cultivo (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/099396). Preferiblemente, para el proceso de la invención cuando se utilizan células HER inmortalizadas por E1, el pH se elige entre 6,6 y 7,6, y/o la temperatura se elige entre 30 y 39 °C, y/o la osmolaridad se elige entre 260 y 400 mOsm/kg. Para mantener condiciones del proceso óptimas se desea la automatización para controlar las condiciones del proceso. Con el fin de optimizar las condiciones del proceso, por ejemplo, para obtener la detención del crecimiento para una productividad celular aumentada, durante el cultivo se puede aplicar un cambio en las condiciones de cultivo. Esto se puede establecer, por ejemplo, mediante un cambio de temperatura (tal como, de 37 a 32 °C), un cambio del pH o un cambio de la osmolaridad.

15

El proceso de la presente invención puede realizarse, en principio, en cualquier tipo de medio de cultivo celular adecuado para el cultivo de células. Las directrices para la elección de un medio de cultivo celular y condiciones del cultivo celular se conocen bien y se proporcionan, por ejemplo, en los Capítulos 8 y 9 de Freshney, R. I. Culture of animal cells (a manual of basic techniques), 4ª edición 2000, Wiley-Liss y en Doyle, A., Griffiths, J. B., Newell, D. G. Cell & Tissue culture: Laboratory Procedures 1993, John Wiley & Sons.

20

Por ejemplo, el medio de cultivo celular puede comprender, por ejemplo, como un componente del medio de cultivo celular, una fuente de hidratos de carbono, sales y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o lípidos y/o detergentes y/o tampones y/o factores de crecimiento y/u hormonas y/o citocinas y/u oligoelementos. Los ejemplos de fuentes de hidratos de carbono incluyen glucosa, fructosa, galactosa y piruvato. Los ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $MgSO_4$  y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , sales de hierro, por ejemplo,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , sales potásicas, por ejemplo,  $KH_2PO_4$ , KCl; sales sódicas, por ejemplo  $NaH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ , y sales cálcicas, por ejemplo,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Los ejemplos de aminoácidos incluyen todos los aminoácidos proteinogénicos conocidos, por ejemplo histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Los ejemplos de vitaminas incluyen: ascorbato, biotina, colina, Cl, mio-inositol, D-pantotenato, riboflavina. Los ejemplos de lípidos incluyen: ácidos grasos, por ejemplo, ácido linoleico y ácido oleico; los ejemplos de detergentes incluyen Tween® 80 y Pluronic® F68. Los ejemplos de tampones incluyen HEPES y  $Na_2CO_3$ . Los ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citocinas incluyen IGF (factor de crecimiento de tipo insulina), hidrocortisona e insulina (recombinante). Los ejemplos de elementos traza se conocen por el experto en la técnica e incluyen Zn, Mg y Se. El medio de cultivo celular puede comprender, por ejemplo, también otros componentes del medio de cultivo celular, por ejemplo, peptona de soja o etanol amina.

25

30

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

35

40

45

50

55

En realizaciones preferidas, la sustancia biológica producida en el proceso de la presente invención se recolecta a partir del flujo cuyo contenido se mantiene en o preferiblemente se retroalimenta al reactor, o a partir del cultivo de células que se retira del reactor o de ambos. La sustancia o sustancias biológicas producidas en el proceso de la presente invención se pueden cosechar adicionalmente del cultivo celular en el denominado procesamiento aguas abajo, utilizando métodos que dependen de la sustancia biológica, métodos que, como tales, se conocen bien por el experto. El procesamiento aguas abajo comprende habitualmente varias etapas de purificación en combinaciones y orden variables. Los ejemplos de etapas de purificación en el procesamiento de aguas abajo son etapas de separación (por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico y/o extracción mediante sistemas acuosos bifásicos y/o precipitación mediante, por ejemplo, sulfato de amonio), etapas para la concentración de la sustancia biológica (por ejemplo, mediante ultrafiltración o diafiltración), etapas para intercambiar tampones y/o etapas para eliminar o inactivar virus (por ejemplo, mediante la filtración de virus, cambio del pH o tratamiento con detergente disolvente).

En un aspecto, la invención se refiere a un cultivo celular que comprende células de mamífero, preferiblemente células HER inmortalizadas por E1, más preferiblemente células PER.C6, con una densidad de células viables de al menos  $50 \cdot 10^6$  células/ml, preferiblemente al menos  $60 \cdot 10^6$  células/ml, en particular al menos  $90 \cdot 10^6$  células/ml y una concentración de sustancia biológica de al menos 5 g/l, más preferiblemente al menos 10 g/l, en particular al menos 11 g/l. En principio, la concentración de la sustancia biológica puede ser tan alta como lo permita la solubilidad de la sustancia biológica. La concentración de células viables es típicamente no mayor de  $200 \cdot 10^6$  células/ml, y preferiblemente dentro del intervalo de 80-150  $\cdot 10^6$  células/ml.

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

Con cultivo celular se refiere al líquido que comprende medio de cultivo celular, células y sustancia biológica, cuyo líquido es el resultado de un proceso para el cultivo de células en un reactor en un medio de cultivo celular, en el que las células producen la sustancia biológica.

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

#### Descripción de las figuras

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

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Comparación entre un proceso por lotes, un proceso por lotes alimentado y el proceso de acuerdo con la

invención

En este ejemplo, el rendimiento del proceso de acuerdo con la presente invención se comparó con los procesos por lotes y por lotes alimentado.

5

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

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

10

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

15

Proceso por lotes A

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

20

Proceso por lotes alimentado B

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

25

Proceso de la invención C1

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

30

El proceso de la invención dio como resultado un aumento de las densidades de células viables y un aumento de las concentraciones de productos en comparación con los modos de cultivo mencionados en menos tiempo, como puede verse en la figura 1 y la figura 2 a continuación.

Ejemplo 2: Comparación entre un proceso por lotes, un proceso por lotes alimentado y el proceso de acuerdo con la invención

En este ejemplo, el proceso de acuerdo con la presente invención se compara de nuevo con los procesos por lotes y por lotes alimentado; en el proceso C2 se controla la presión de  $\text{CO}_2$  y se utilizó un sistema de separación de 50 kDa.

50

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

La figura 4/9 muestra la concentración de IgG en el reactor Z (% en comparación con la concentración de IgG en el proceso A) frente al tiempo de proceso  $X$  (días) para el proceso A (por lotes), B (por lotes alimentado) y C2 (proceso de la invención).

55

Todas las fermentaciones se realizaron utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a

36,5 °C, el pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación del aire del 50 % y a 200 rpm. Se utilizó en todos los experimentos la misma línea células PER.C6 productora de IgG (de aproximadamente 150 kDa) (véase el documento WO 2004/099396).

5 Proceso por lotes A

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

10

Proceso por lotes alimentado B

El proceso por lotes alimentado se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 l en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \times 10^5$  células.ml<sup>-1</sup> en medio VPRO (SAFC) complementado con L-glutamina 6 mM.

15 Durante el cultivo se añadieron glucosa y glutamina para mantener la concentración por encima de, respectivamente, 15 mM y 1 mM. Los aminoácidos y péptidos se añadieron a partir del día 5 para reponer los aminoácidos consumidos.

Proceso de la invención C2

20

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

25

Resultado

30 Como puede verse en la figura 3/9 y en la figura 4/9, el proceso de acuerdo con la invención da como resultado densidades de células viables significativamente aumentadas y concentraciones de producto aumentadas (2415 % x rendimiento por lotes; 690 % x rendimiento por lotes alimentado) en tiempo igual o inferior (tiempo por lotes al 100 %; tiempo por lotes alimentado al 81 %).

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

40 Ejemplo 3: Comparación entre un proceso por lotes, un proceso por lotes alimentado y el proceso de acuerdo con la invención

En este ejemplo, el rendimiento del proceso de acuerdo con la presente invención con eliminación del cultivo celular se compara de nuevo con los procesos por lotes y por lotes alimentado; en el proceso C3 se ha eliminado el cultivo celular.

45

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

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

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

55

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

Proceso por lotes A

El proceso por lotes se ejecutó a un volumen de trabajo de 4 l en un recipiente Sartorius B5. Las células se inocularon a razón de  $3 \times 10^5$  células. $\text{ml}^{-1}$  en medio VPRO (SAFC) complementado con L-glutamina 6 mM y posteriormente se cultivaron durante 17 días.

Proceso por lotes alimentado B

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

15

Proceso de la invención C3

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

Resultado

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

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

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

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

Ejemplo 4: Cultivo de y producción con células CHO.

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

La figura 8/9 muestra el número de células Y ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) representado gráficamente frente el tiempo de proceso X (días) para C4 (proceso de la invención).

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

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

#### Proceso de la invención C4

10

El proceso de la invención se realizó en un recipiente Applikon de 2 l. El dispositivo de retención de células y producto es una membrana de fibra hueca (General Electric) con un corte de peso molecular (MWCO) de 50 kD operada en modo de flujo ATF con un sistema ATF-2 (Refine Technology). El cultivo se inició con  $5 \cdot 10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$  en medio de cultivo MTCM-49 (Hyclone). El medio se perfundió a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,1 y 0,4  $\text{nl.célula}^{-1}.\text{día}^{-1}$ . La presión de  $\text{CO}_2$  se controló por debajo del 15 %.

#### Resultado

- 20 Los datos muestran que el proceso de la invención también funciona cuando se utiliza una línea celular CHO productora de proteínas. La densidad celular lograda y las concentraciones de los productos están aumentadas en comparación con el cultivo por lotes. Los datos también demuestran que en el proceso de acuerdo con la presente invención se puede detener el crecimiento celular (por ejemplo, mediante una caída de la temperatura), mientras que continúa la acumulación de producto en el sistema de cultivo.

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

- 30 El proceso de acuerdo con la presente invención también puede aplicarse a líneas celulares de mieloma. Para este fin, la fermentación se realiza utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5 °C, el pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación del aire del 40 % y a 100 rpm. El cultivo de las células comienza con la inoculación de las células de mieloma a razón de  $3 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo SFM4Mab (Hyclone) en un recipiente Sartorius de 5 l. El dispositivo de retención de células y producto es una membrana de fibra hueca (General Electric) con un corte de peso molecular (MWCO) de 30 kD operada en modo de flujo ATF con un sistema ATF-4 (Refine Technology). El medio de cultivo SFM4Mab (Hyclone) se perfunde a través del cultivo celular en suspensión utilizando una SFR entre 0,1 y 0,4  $\text{nl.célula}^{-1}.\text{día}^{-1}$ . La presión de  $\text{CO}_2$  se controló por debajo del 15 %.

#### 35 Ejemplo 6: Proceso de la invención realizado con una línea celular MDCK.

- 40 El procedimiento de acuerdo con la presente invención también puede aplicarse a líneas celulares MDCK. Para este fin, la fermentación se realiza utilizando un controlador Sartorius Biostat B para controlar la temperatura a 36,5 °C, el pH entre 7,2 y 6,8 y la DO a una saturación del aire del 40 % y a 100 rpm. El cultivo de las células comienza con la inoculación de las células MDCK transformadas a razón de  $3 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo VP-SFM (Invitrogen) en un recipiente Sartorius de 5 l. El dispositivo de retención de células y producto es una membrana de fibra hueca (General Electric) con un corte de peso molecular (MWCO) de 30 kD operada en modo de flujo ATF con un sistema ATF-4 (Refine Technology). El medio de cultivo VP-SFM (Invitrogen) se perfunde a través del cultivo celular en suspensión usando una SPR de entre 0,1 y 0,4  $\text{nl.célula}^{-1}.\text{día}^{-1}$ . La presión de  $\text{CO}_2$  se controló por debajo del 15 %.

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para el cultivo de células eucariotas en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular,  
5 en el que las células producen una sustancia biológica deseada seleccionada de proteínas y vacunas, que puede usarse como principio activo en una preparación farmacéutica,  
en el que al menos un componente del medio de cultivo celular se alimenta al cultivo celular y  
en el que el cultivo celular que comprende las células, la sustancia biológica deseada y el medio de cultivo celular  
circula sobre un filtro usando un flujo tangencial, y en el que el filtro tiene un tamaño de poro **caracterizado por** un  
10 corte de peso molecular de al menos 30 kDa y como máximo 100 kDa, adecuado para separar la sustancia biológica  
deseada de sustancias que tienen un peso molecular menor que la sustancia biológica deseada,  
en el que el flujo de salida de líquido del filtro esencialmente solamente contiene componentes que tienen un peso  
molecular inferior al de la sustancia biológica deseada, y en el que la sustancia biológica deseada se retiene o  
retroalimenta al reactor.  
15
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustancia biológica deseada está codificada  
por al menos un gen transfectado en las células.
3. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en el que la sustancia biológica  
20 deseada es una IgG.
4. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las células eucariotas son  
células de mamífero.
- 25 5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las células de mamífero son células CHO,  
hibridomas, células BHK, células de mieloma, células humanas o células de ratón.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células humanas son células HEK-  
293, células linfoblastoides humanas o células HER inmortalizadas en E1.  
30
7. Proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células de ratón son células NS0.
8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células de mamífero son células CHO.
- 35 9. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que las células tienen una  
viabilidad celular de al menos el 98 %.
10. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que la sustancia biológica se  
recoge de las células y/o del cultivo celular.  
40

Fig.1/9

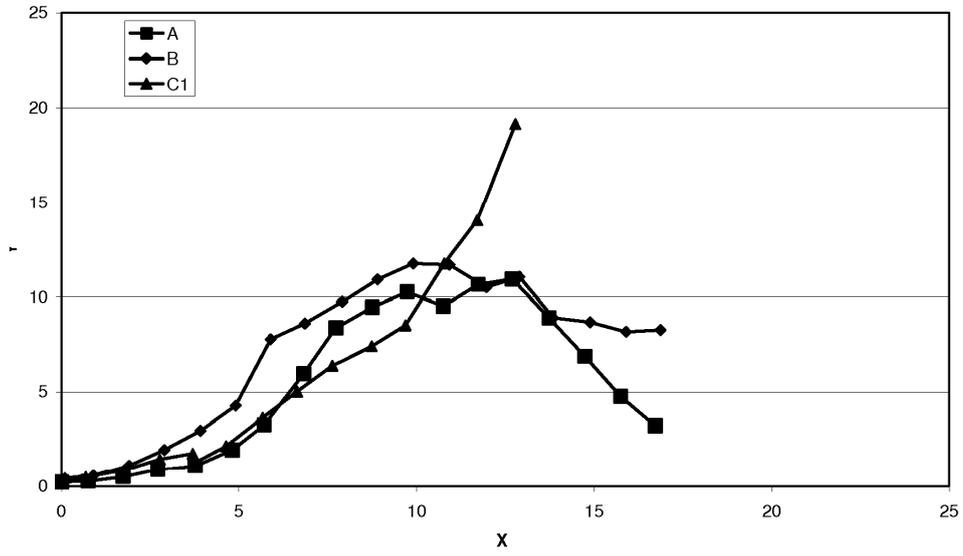


Fig.2/9

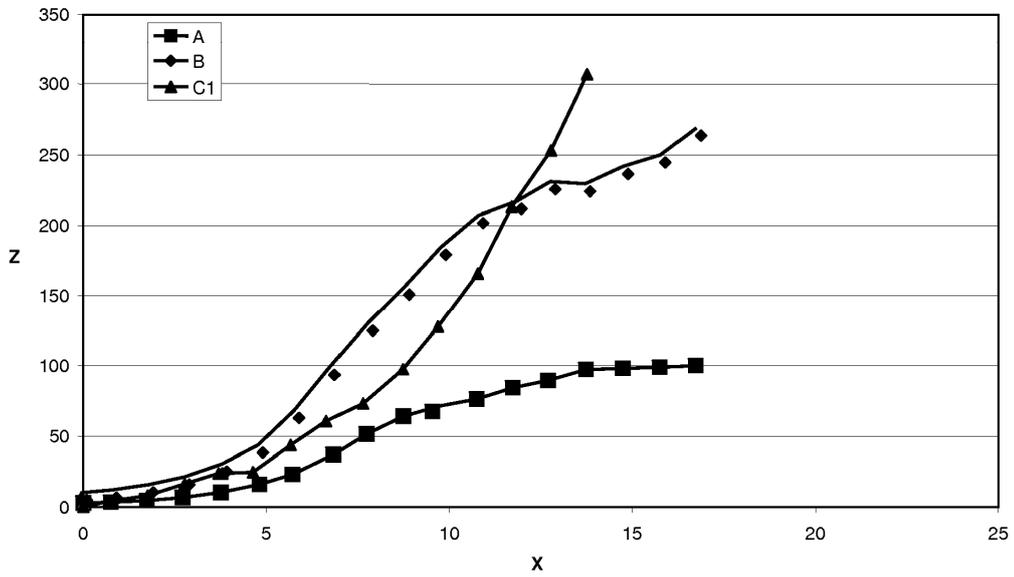


Fig 3/9

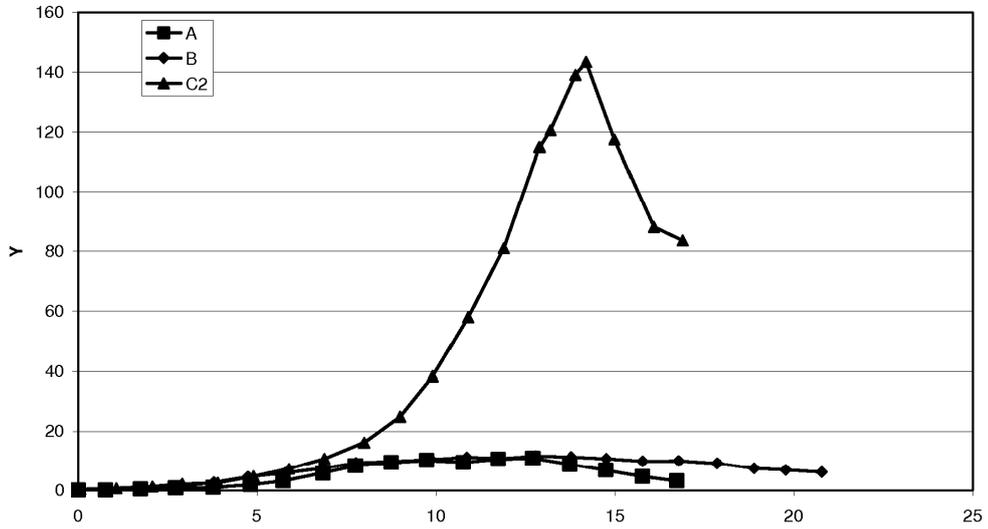


Fig. 4/9

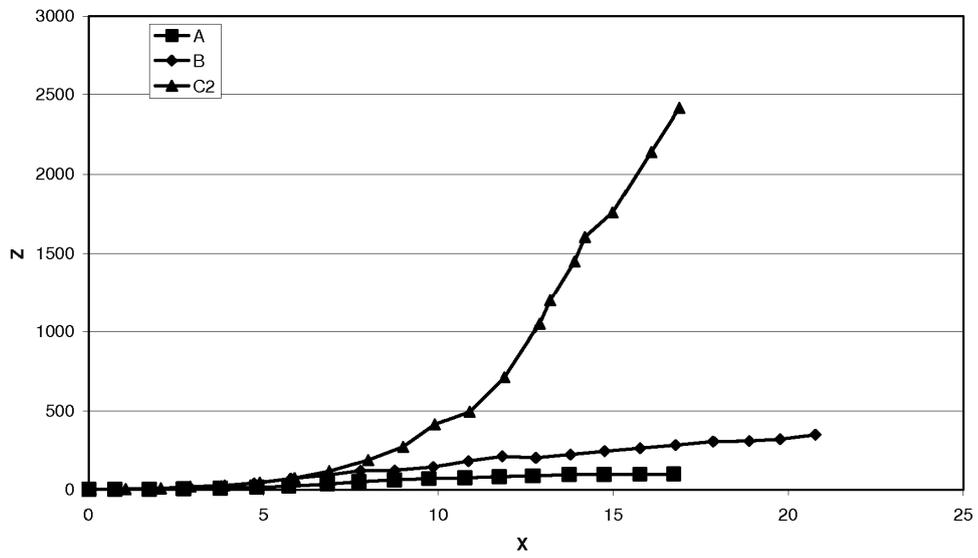


Fig. 5/9

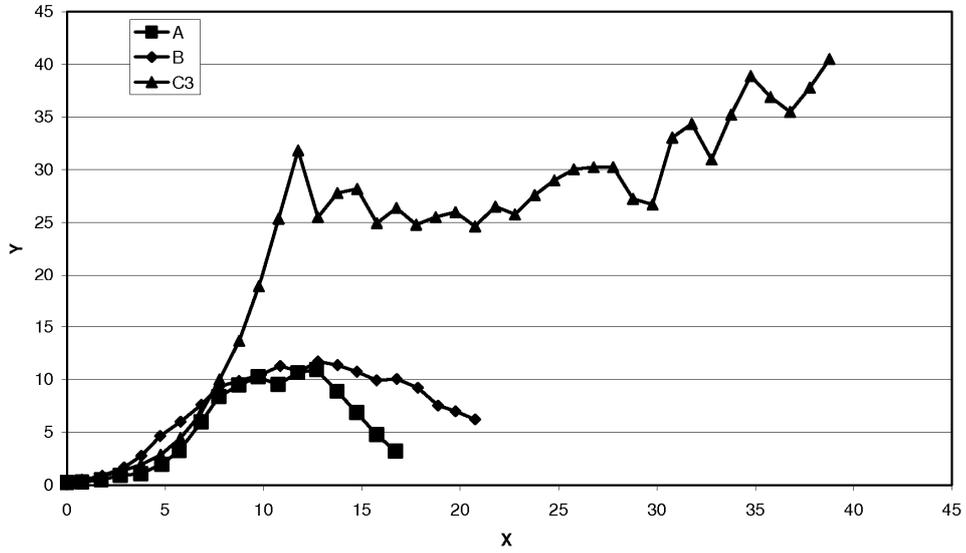


Fig. 6/9

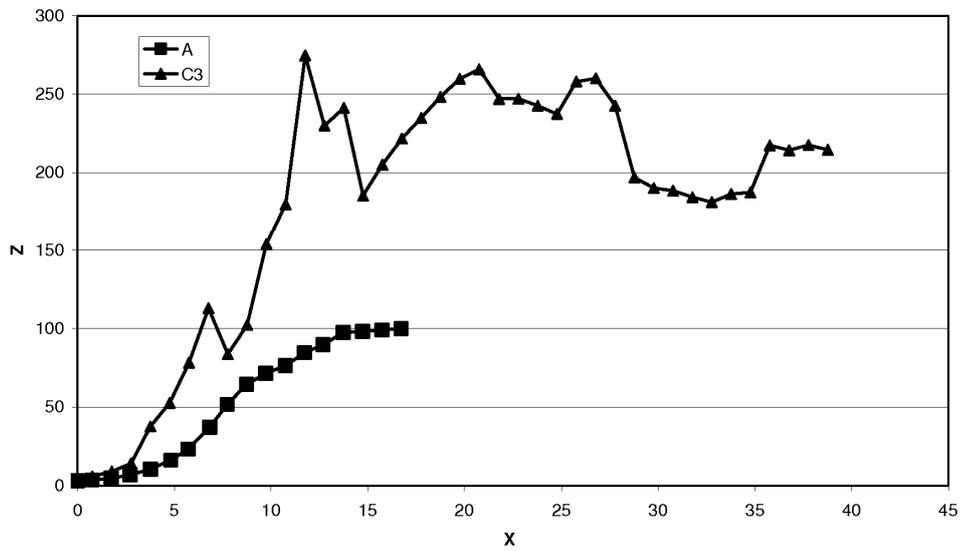


Fig. 7/9

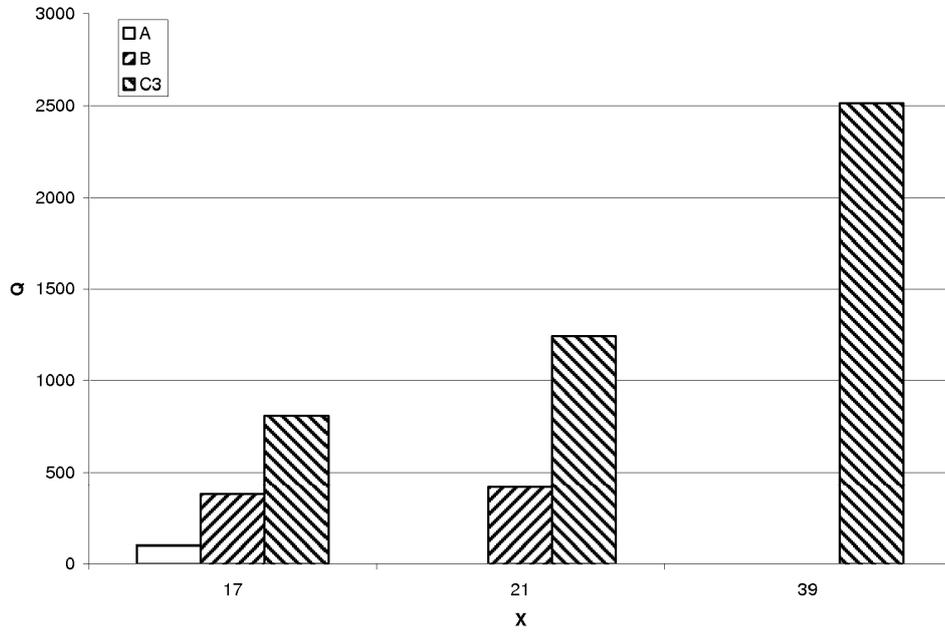


Fig. 8/9

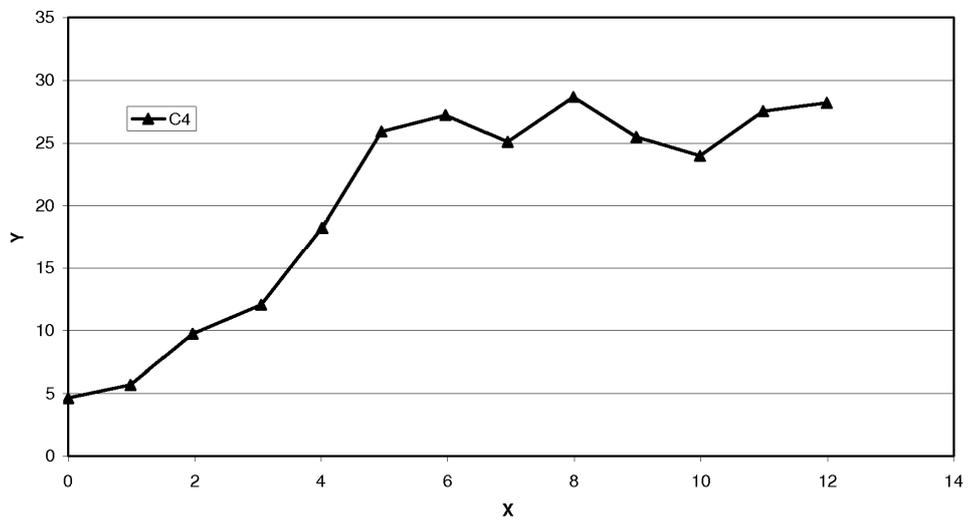


Fig. 9/9

