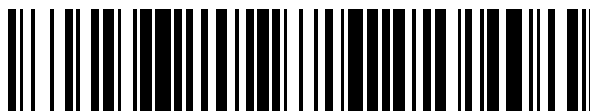


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 055**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2008 PCT/US2008/072612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09023562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08797478 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2188371**

54 Título: **Uso de perfusión para mejorar la producción de un cultivo de células alimentado por lotes en biorreactores**

30 Prioridad:

09.08.2007 US 954922 P

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

01.03.2018

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

HILLER, GREGORY, W.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 055 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

Uso de perfusión para mejorar la producción de un cultivo de células alimentado por lotes en biorreactores

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/954.922, presentada el 9 de agosto de 2007.

10 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la producción de proteínas mediante células cultivadas, por ejemplo, células animales. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento de cultivo celular en el que las células se perfunden durante un período de tiempo, de manera continua o intermitente, y posteriormente se cultivan en un cultivo alimentado por lotes. El procedimiento de la invención permite que el cultivo celular alcance una densidad celular más alta antes de que se inicie una fase de producción de proteína. Como resultado, se aumenta la cantidad de proteína producida durante la fase de producción, facilitando, por ejemplo, la producción a escala comercial de la proteína. La invención también se refiere a un aparato biorreactor de perfusión que comprende un depósito de medio nuevo conectado a un biorreactor por una bomba de alimentación, un circuito de recirculación conectado al biorreactor, donde el circuito de recirculación comprende un dispositivo de filtración, por ejemplo, ultrafiltración o microfiltración, y una bomba de permeación que conecta el dispositivo de filtración a un contenedor de recolección del permeado.

25 Técnica antecedente relacionada

Una gran proporción de productos biotecnológicos, ya estén disponibles comercialmente o en desarrollo, son terapéuticos de proteínas. Generalmente se requiere la maquinaria celular de una célula (por ejemplo, una célula animal, una célula bacteriana) para producir muchas formas de agentes terapéuticos proteicos (por ejemplo, proteínas glicosiladas, anticuerpos monoclonales producidos por hibridoma). Por consiguiente, existe una demanda grande y creciente para la producción de proteínas en cultivos celulares, por ejemplo, en cultivos de células animales, y para procedimientos mejorados relacionados con dicha producción.

35 En comparación con los cultivos de células bacterianas, los cultivos de células animales tienen velocidades de producción más bajas y típicamente generan menores rendimientos de producción. Por lo tanto, una cantidad significativa de investigación se centra en las condiciones y procedimientos de cultivo de células animales que pueden optimizar el rendimiento de polipéptidos, es decir, condiciones y procedimientos que soportan una alta densidad celular y un alto título de proteína. Por ejemplo, se ha determinado que la alimentación restringida de glucosa a cultivos de células animales en procesos alimentados por lotes controla la producción de lactato sin requerir una alimentación de glucosa a velocidad constante (véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0070013).

45 Dos procesos de cultivo celular se usan principalmente para la producción de proteínas a gran escala: el proceso alimentado por lotes y el proceso de perfusión. Los objetivos principales de estos procedimientos son la adición de nutrientes, por ejemplo, glucosa, a medida que se consumen, y la eliminación de productos de desecho metabólicos, por ejemplo, ácido láctico y amoníaco, a medida que se producen. En el proceso alimentado por lotes, las células reciben un medio de inoculación que contiene glucosa al inicio del cultivo y en uno o más puntos después de la iniciación, pero antes de la terminación, del cultivo. Por ejemplo, un procedimiento alimentado por lotes es una alimentación invariante de glucosa a velocidad constante (Ljunggren y Häggström (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 808-18; Häggström y col. (1996) *Annals NY Acad. Sci.* 782: 40-52). Aunque esta alimentación invariante a velocidad constante de glucosa en un proceso alimentado por lotes puede ayudar a controlar la producción de ácido láctico mediante células cultivadas a niveles relativamente bajos, no se alcanzan las concentraciones máximas de células, velocidades de crecimiento y niveles de viabilidad celular (porque este procedimiento de proporcionar la glucosa típicamente da como resultado la inanición de glucosa a medida que aumentan las concentraciones de células). En consecuencia, la cantidad de producto producido no es óptima.

55 En el proceso de perfusión, las células también reciben medio base de inoculación, y en el punto cuando las células alcanzan una densidad celular deseada, se inicia la perfusión celular de manera que el medio consumido se reemplaza por medio nuevo. El proceso de perfusión permite que el cultivo alcance una alta densidad celular y, por lo tanto, permite la producción de una gran cantidad de producto. Sin embargo, al menos algunas formas del proceso de perfusión requieren suministrar una gran cantidad de medio y dan lugar a que una porción del producto esté contenida en un gran volumen de medio consumido en lugar de concentrarse en una sola cosecha.

65 Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos alternativos de producción de proteína a gran escala que

maximicen la viabilidad celular, la concentración celular y la cantidad de proteína producida, así como también minimicen el volumen del medio en el que está contenido el producto proteico.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona diversos procedimientos relacionados con la mejora de la producción de proteínas en cultivos celulares, por ejemplo, cultivos de células animales, en los que el cultivo celular se perfunde durante un periodo de tiempo, de forma continua o intermitente, y posteriormente se cultiva en un cultivo alimentado por lotes. Por lo tanto, en al menos una realización, la divulgación proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido que comprende las etapas de cultivar células en un cultivo celular hasta un primer nivel crítico; perfundir el cultivo celular, en el que la perfusión comprende reemplazar el medio consumido por medio nuevo, con lo que se retiene al menos una porción de las células y se elimina al menos un producto de desecho; cultivar células en el cultivo celular hasta un segundo nivel crítico; iniciar una fase de producción de polipéptido; y mantener células en un cultivo alimentado por lotes durante al menos una porción de la fase de producción del polipéptido. En al menos algunas realizaciones de la divulgación, el cultivo celular es un cultivo de células animales, por ejemplo, un cultivo de células de mamífero, por ejemplo, un cultivo de células CHO. La invención proporciona un procedimiento de cultivo celular para la producción de un polipéptido que comprende las etapas de:

- 20 (a) cultivar células en un cultivo celular hasta un primer nivel crítico en el que se alcanza dicho primer nivel crítico a
 - una densidad celular de aproximadamente 1 millón hasta aproximadamente 9 millones de células por mililitro,
 - un nivel de concentración de lactato de aproximadamente 1 g/l hasta aproximadamente 6 g/l o,
 - en el día 1 al día 5 del cultivo celular;
- 25 (b) perfundir el cultivo celular, en el que la perfusión comprende reemplazar el medio consumido por medio nuevo, con lo que se retiene al menos una porción de las células y se elimina al menos un producto de desecho;
- (c) cultivar células en el cultivo celular hasta un segundo nivel crítico en el que dicho segundo nivel crítico se alcanza a
 - 30 - una densidad celular de aproximadamente 5 millones hasta aproximadamente 40 millones de células por mililitro, o
 - aproximadamente del día 2 al día 7 del cultivo celular;
- (d) iniciar una fase de producción de polipéptido por un cambio en la temperatura, pH u osmolaridad del cultivo celular o combinación de los mismos; y
- 35 (e) mantener las células en un cultivo alimentado por lotes durante al menos una porción de la fase de producción del polipéptido,

en el que el cultivo de células de mamífero es un cultivo de células CHO.

40 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que el primer nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 1 millón hasta aproximadamente 9 millones de células por mililitro, por ejemplo, aproximadamente 2 millones de células por mililitro. En al menos algunas realizaciones, el primer nivel crítico se alcanza a una concentración de lactato de aproximadamente 1 g/l hasta aproximadamente 6 g/l, por ejemplo, aproximadamente 2 g/l. En al menos algunas realizaciones, el primer nivel crítico se alcanza aproximadamente del día 1 al día 5 del cultivo celular, por ejemplo, aproximadamente el día 2 del cultivo celular. En al menos algunas realizaciones adicionales, el primer nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 1 millón hasta aproximadamente 9 millones de células por mililitro y a una concentración de lactato de aproximadamente 1 g/l hasta aproximadamente 6 g/l. En al menos algunas otras realizaciones, el primer nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 1 millón hasta aproximadamente 9 millones de células por mililitro y aproximadamente del día 1 hasta aproximadamente el día 5 del cultivo celular.

55 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que el segundo nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 5 millones hasta aproximadamente 40 millones de células por mililitro, por ejemplo, aproximadamente 10 millones de células por mililitro. En al menos algunas realizaciones, el segundo nivel crítico se alcanza aproximadamente del día 2 hasta aproximadamente el día 7 del cultivo celular, por ejemplo, aproximadamente el día 5 del cultivo celular. En al menos algunas realizaciones adicionales, el segundo nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 5 millones hasta aproximadamente 40 millones de células por mililitro, y aproximadamente del día 2 hasta aproximadamente el día 7 del cultivo celular.

60 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que al menos un producto de desecho es ácido láctico o amoníaco. En al menos algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de células a gran escala.

65 En al menos algunas realizaciones, la etapa de iniciar la fase de producción del polipéptido comprende un cambio de

temperatura en el cultivo celular. En al menos algunas realizaciones, la temperatura del cultivo celular se reduce de aproximadamente 37 °C hasta aproximadamente 31 °C.

5 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que al menos un producto de desecho se elimina pasando el medio consumido a través de un dispositivo de microfiltración. En al menos algunas realizaciones, la invención comprende adicionalmente las etapas de recoger y purificar el polipéptido del medio consumido. En al menos algunas realizaciones, al menos un producto de desecho se elimina pasando el medio consumido a través de un dispositivo de ultrafiltración.

10 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que la etapa de perfusión comprende perfusión continua. En al menos algunas realizaciones, la etapa de perfusión comprende perfusión intermitente. En al menos algunas realizaciones, la velocidad de perfusión es constante, o la velocidad de perfusión aumenta o disminuye a una velocidad constante, o la velocidad de perfusión aumenta o disminuye de forma escalonada.

15 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que la etapa de perfusión finaliza cuando el cultivo celular alcanza el segundo nivel crítico. En al menos algunas realizaciones, la etapa de perfusión se continúa durante un período de tiempo después de que el cultivo celular alcanza el segundo nivel crítico, por ejemplo, en el que el período de tiempo es de aproximadamente 2 días.

20 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que la etapa de perfusión comprende además administrar al menos una alimentación en bolo al cultivo celular. En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que la etapa de mantenimiento de las células en un cultivo alimentado por lotes se inicia cuando el cultivo celular alcanza el segundo nivel crítico. En al menos algunas realizaciones, la etapa de mantenimiento de células en un cultivo alimentado por lotes se inicia después de que ha transcurrido un período de tiempo desde que el cultivo celular alcanzó el segundo nivel crítico, por ejemplo, en el que el período de tiempo es de aproximadamente 2 días.

25 En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido que comprende, además, después de la etapa de mantenimiento de las células en un cultivo alimentado por lotes, una etapa de recogida del polipéptido producido por el cultivo de células. En al menos algunas realizaciones, la invención comprende, además, después de la etapa de recoger el polipéptido, una etapa de purificación del polipéptido. En al menos algunas realizaciones, el polipéptido producido por el cultivo celular es un anticuerpo. En al menos algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido en el que al menos una etapa tiene lugar en un biorreactor.

Breve descripción de los dibujos

30 La **FIG. 1** demuestra un ejemplo de un aparato biorreactor de perfusión de la invención, con el dispositivo de ultrafiltración (UF) o microfiltración (MF) (que contiene, por ejemplo, un cartucho de fibra hueca de UF o MF) conectado dentro del circuito de recirculación externo (accionado por una bomba de recirculación de circuito de perfusión).

35 La **FIG. 2** representa el curso de tiempo (en días) para el aumento gradual en la velocidad de perfusión para el Ejemplo 2.2. El diagrama superior representa el transcurso del tiempo para un experimento de "alta velocidad de perfusión"; el diagrama inferior representa el curso del tiempo para un experimento de "baja velocidad de perfusión". La velocidad de perfusión se midió en volumen por día (vvd); 1,0-2,0 vvd, intervalo para alta velocidad de perfusión; 0,5-1,0 vvd, intervalo para baja velocidad de perfusión. Los números (0-5) representan días de cultivo. Los días de perfusión y alimentación por lotes fueron los indicados; las líneas punteadas indican el momento del cambio de temperatura.

40 La **FIG. 3** muestra densidad de células viables (eje Y, millones de células/mL) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para una alta velocidad de perfusión seguida por cultivo alimentado por lotes (■), baja velocidad de perfusión seguida de cultivo alimentado por lotes (□), y cultivo alimentado por lotes únicamente (●) para experimentos en el Ejemplo 2.2. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

45 La **FIG. 4** demuestra el porcentaje de células viables (eje Y) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para una velocidad de perfusión alta seguida de un cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión seguida de cultivo alimentado por lotes (□), y cultivo alimentado por lotes únicamente (●) para experimentos en el Ejemplo 2.2. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

50 La **FIG. 5** demuestra la concentración de lactato (eje Y, g/l) para una alta velocidad de perfusión seguida de cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión seguida de cultivo alimentado por lotes (□), y cultivo alimentado por lotes únicamente (●) a diferentes tiempos de cultivo (eje X; días [d]) para los experimentos en el Ejemplo 2.2. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

55 La **FIG. 6** demuestra la concentración de amonio (eje Y; mM) para una alta velocidad de perfusión seguida de un cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión seguida de un cultivo alimentado por lotes (□) y un cultivo alimentado por lotes únicamente (●) a diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para los experimentos en

el Ejemplo 2.2. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C. La FIG. 7 demuestra cambios en la osmolaridad (eje Y; mOsm/kg) para una alta velocidad de perfusión seguida de un cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión seguida de un cultivo alimentado por lotes (□) y un cultivo alimentado por lotes únicamente (●) a diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para los experimentos en el Ejemplo 2.2. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 8 demuestra el título de anticuerpo monoclonal (eje Y: mg/l) para una alta velocidad de perfusión seguida de cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión seguida de cultivo alimentado por lotes (□) y un cultivo alimentado por lotes únicamente (●) a diferentes tiempos de cultivo (eje X; días [d]) para los experimentos en el Ejemplo 2.2. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 9 representa el curso de tiempo (en días) para el aumento gradual en la velocidad de perfusión para el Ejemplo 2.3. El diagrama superior representa el curso de tiempo para un experimento de alta velocidad de perfusión; el diagrama inferior representa el curso del tiempo para un experimento de baja velocidad de perfusión. La velocidad de perfusión se midió en volumen por día (vvd); 1,0-2,0 vvd, intervalo para alta velocidad de perfusión; 0,5-1,0 vvd, intervalo para baja velocidad de perfusión. Los números (0-5) representan días de cultivo. Los días de perfusión y alimentación por lotes fueron los indicados; las líneas punteadas indican el momento del cambio de temperatura.

La FIG. 10 demuestra densidad de células viables (eje Y; millones de células/mL) en diferentes tiempos de cultivo (eje X; días [d]) para una alta velocidad de perfusión con MF seguido de cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión con MF seguido de un cultivo alimentado por lotes (□), y una alta velocidad de perfusión con UF seguido de un cultivo alimentado por lotes (○) para los experimentos en el Ejemplo 2.3. La temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C aproximadamente el día 4.

La FIG. 11 demuestra el porcentaje de células viables (eje Y) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para una alta velocidad de perfusión con MF seguido de cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión con MF seguido de cultivo alimentado por lotes (□), y una alta velocidad de perfusión con UF seguido de un cultivo alimentado por lotes (○) para los experimentos en el Ejemplo 2.3. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 12 demuestra el título de anticuerpo monoclonal (eje Y; mg/l) en diferentes tiempos de cultivo (eje X; días [d]) para una alta velocidad de perfusión con MF seguido de cultivo alimentado por lotes (■), una baja velocidad de perfusión con MF seguida de cultivo alimentado por lotes (□), y una alta velocidad de perfusión con UF seguido de cultivo alimentado por lotes (○) para los experimentos en el Ejemplo 2.3. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 13 representa un curso de tiempo (en días) para los cambios por etapas en la velocidad de perfusión ("velocidad de perfusión moderada") para los experimentos de perfusión "continua" (la perfusión se continuó durante un día adicional en comparación con experimentos previos) del Ejemplo 2.4. La velocidad de perfusión se midió en volumen por día (vvd). Los números (0-6) representan días de cultivo. Los días de perfusión y alimentación por lotes fueron los indicados; la línea punteada indica el momento del cambio de temperatura.

La FIG. 14 demuestra densidad celular viable (eje Y, millones de células/mL) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para un cultivo de perfusión moderada con MF y medio normal (R1; ■), un cultivo de velocidad de perfusión moderada con UF y medio concentrado (R2; ●); un matraz de agitación que contiene una muestra de R1 (SF1; □); y un matraz de agitación que contiene una muestra de R2 (SF2; ○) para experimentos en el Ejemplo 2.4. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 15 demuestra el porcentaje de células viables (eje Y) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para un cultivo de velocidad de perfusión moderada con MF y medio normal (R1; ■), un cultivo de velocidad de perfusión moderada con UF y medio concentrado (R2; ●); un matraz de agitación que contiene una muestra de R1 (SF1; □); y un matraz de agitación que contiene una muestra de R2 (SF2; ○) para experimentos en el Ejemplo 2.4. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 16 demuestra la concentración de lactato (eje Y; g/l) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para un cultivo de velocidad de perfusión moderada con MF y medio normal (R1; ■), un cultivo de velocidad de perfusión moderada con UF y medio concentrado (R2; ●); un matraz de agitación que contiene una muestra de R1 (SF1; □); y un matraz de agitación que contiene una muestra de R2 (SF2; ○) para experimentos en el Ejemplo 2.4. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 17 demuestra la concentración de amonio (eje Y; mM) en diferentes tiempos de cultivo (eje X, días [d]) para un cultivo de velocidad de perfusión moderada con MF y medio normal (R1; ■), un cultivo de velocidad de perfusión moderada con UF y medio concentrado (R2; ●); un matraz de agitación que contiene una muestra de R1 (SF1; □); y un matraz de agitación que contiene una muestra de R2 (SF2; ○) para experimentos en el Ejemplo 2.4. La línea vertical en el gráfico indica el momento en que la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C.

La FIG. 18 demuestra el título de anticuerpo monoclonal (eje Y, mg/l) para un cultivo de velocidad de perfusión moderada con MF y medio normal (R1; ■), un cultivo de velocidad de perfusión moderada con UF y medio concentrado (R2; ●); un matraz de agitación que contiene una muestra de R1 (SF1; □); y un matraz de agitación que contiene una muestra de R2 (SF2; ○) para experimentos en el Ejemplo 2.4.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es un procedimiento modificado de cultivo celular alimentado por lotes para la producción de polipéptidos. Proporciona un procedimiento de protección de polipéptidos, por ejemplo, producción de polipéptidos a gran escala, con una mayor viabilidad celular y una mayor cantidad del producto polipeptídico. La presente descripción también se refiere a un aparato biorreactor de perfusión que puede usarse en los procedimientos de cultivo celular divulgados.

El procedimiento de cultivo de células alimentado por lotes combina tanto un procedimiento de cultivo de células alimentado por lotes como un procedimiento de perfusión. Los términos "cultivo" y "cultivo celular" tal como se usan en la presente memoria se refieren a una población celular que está suspendida en un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como se usa en el presente documento, estos términos pueden referirse a la combinación que comprende la población celular (por ejemplo, el cultivo de células animales) y el medio en el que se suspende la población.

El término "cultivo por lotes" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que todos los componentes que finalmente se usarán para cultivar las células, incluyendo el medio, así como las células mismas, se proporcionan al comienzo del proceso de cultivo. Un cultivo por lotes típicamente se detiene en algún punto y las células y/o componentes en el medio se recolectan y opcionalmente se purifican.

El término "cultivo alimentado por lotes" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en algún momento posterior al comienzo del proceso de cultivo. Los componentes provistos típicamente comprenden complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Un cultivo alimentado por lotes se detiene típicamente en algún punto y las células y/o componentes en el medio se recogen y opcionalmente se purifican.

El término "cultivo de perfusión" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporciona medio nuevo adicional, ya sea de forma continua durante un período de tiempo o intermitentemente durante un período de tiempo, al cultivo (posterior al comienzo del proceso de cultivo), y simultáneamente se retira el medio usado. El medio nuevo generalmente proporciona complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. El producto polipeptídico, que puede estar presente en el medio consumido, se purifica opcionalmente. La perfusión también permite la eliminación de los productos de desecho celular (enjuague) del cultivo celular que crece en el biorreactor.

El término "biorreactor" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier recipiente utilizado para el crecimiento de un cultivo de células procariotas o eucariotas, por ejemplo, un cultivo de células animales (por ejemplo, un cultivo de células de mamífero). El biorreactor puede ser de cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células, por ejemplo, células de mamífero. Típicamente, el biorreactor será al menos de 30 ml y puede ser de al menos 1, 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.0000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor, que incluyen, pero no se limitan al pH y la temperatura, son típicamente controladas durante el período de cultivo. El término "biorreactor de producción" como se usa en el presente documento se refiere al biorreactor final utilizado en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen de un biorreactor de producción de cultivo celular a gran escala generalmente es superior a aproximadamente 100 ml, típicamente al menos aproximadamente 10 litros, y puede ser de 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.0000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Un biorreactor o biorreactor de producción adecuado puede estar compuesto (es decir, construido de) cualquier material que sea adecuado para contener cultivos celulares suspendidos en medios en las condiciones de cultivo de la presente invención y es propicio para el crecimiento y la viabilidad celular, incluyendo vidrio, plástico o metal; el(los) material(es) no deberán interferir con la expresión o estabilidad del producto producido, por ejemplo, un producto polipeptídico. Un experto en la técnica conocerá, y podrá elegir, biorreactores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención.

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

El término "viabilidad celular" como se usa en la presente memoria se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir bajo un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término como se usa en el presente documento también se refiere a la porción de células que están vivas en un momento particular en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

Como se usa en el presente documento, las frases "polipéptido" o "producto polipeptídico" son sinónimos de los términos "proteína" y "producto proteico", respectivamente, y, como se entiende generalmente en la técnica, se refieren a al menos una cadena de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos secuenciales. En ciertas realizaciones, una "proteína de interés" o un "polipéptido de interés" o similar es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógeno que se ha transformado en una célula huésped. En ciertas realizaciones, en las que un ADN exógeno con el que se ha transformado la célula huésped codifica la "proteína de interés", la secuencia

de ácido nucleico del ADN exógeno determina la secuencia de aminoácidos. En ciertas realizaciones, una "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es endógena a la célula huésped. En ciertas realizaciones, la expresión de dicha proteína de interés endógena se altera transfectando una célula huésped con una molécula de ácido nucleico exógeno que puede, por ejemplo, contener una o más secuencias reguladoras y/o codificar una proteína que potencia la expresión de la proteína de interés.

El término "título", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad total de polipéptido de interés producido por un cultivo celular (por ejemplo, un cultivo de células animales), dividido por una cantidad dada de volumen de medio; por lo tanto, "título" se refiere a una concentración. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de polipéptido por litro de medio. El cultivo alimentado por lotes modificado de la presente invención tiene un efecto de aumentar el título de producto polipeptídico en comparación con otros procedimientos de cultivo celular conocidos en la técnica.

El procedimiento modificado de cultivo de células alimentadas por lotes de la presente invención comprende dos fases, una fase de crecimiento celular y una fase de producción de proteína. Durante la fase de crecimiento celular, las células se mezclan primero (es decir, se inoculan) con un medio (es decir, medio de inoculación) para formar un cultivo celular. Los términos "medio", "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" como se usan en la presente memoria se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren células animales en crecimiento, por ejemplo, células de mamífero, y también pueden referirse a un medio en combinación con células. El término "medio de inoculación" se refiere al medio que se usa para formar un cultivo celular. El medio de inoculación puede o no diferir en la composición del medio utilizado durante el resto de la fase de crecimiento celular. Típicamente, las soluciones de medio proporcionan, sin limitación, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y elementos traza requeridos por la célula para al menos un crecimiento y/o supervivencia mínimos. La solución también puede contener componentes que mejoran el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluidas las hormonas y los factores de crecimiento. La solución se formula preferiblemente a un pH y concentración de sal óptimos para la supervivencia y proliferación celular. En al menos una realización, el medio es un medio definido. Los medios definidos son medios en los que todos los componentes tienen una estructura química conocida. En otras realizaciones de la invención, el medio puede contener un aminoácido o aminoácidos derivados de cualquier fuente o procedimiento conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, uno o unos aminoácidos derivados de una única adición de aminoácidos o a partir de una adición o adiciones de hidrolizado de peptona o proteína (incluyendo una fuente o fuentes de origen animal o vegetal). En aún otras realizaciones de la invención, el medio usado durante la fase de crecimiento celular puede contener medio concentrado, es decir, medio que contiene una concentración de nutrientes más alta que la normalmente necesaria y normalmente proporcionada a un cultivo en crecimiento. Un experto en la técnica reconocerá qué medio celular, medio de inoculación, etc., es apropiado para cultivar una célula particular, por ejemplo, una célula animal (por ejemplo, células CHO) y la cantidad de glucosa y otros nutrientes (por ejemplo, glutamina, hierro, elementos D en trazas) o agentes diseñados para controlar otras variables de cultivo (por ejemplo, la cantidad de espuma, osmolaridad) que debe contener el medio (véase, por ejemplo, Mather, JP, y col., (1999) "Culture media, animal cells, large scale production", Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2: 777-85; Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2006/0121568). La presente invención también contempla variantes de dichos medios conocidos, que incluyen, por ejemplo, variantes enriquecidas en nutrientes de dichos medios.

Un experto en la materia reconocerá a qué temperatura y/o concentración debe cultivarse una línea celular particular. Por ejemplo, la mayoría de las células de mamífero, por ejemplo, células CHO, crecen bien dentro del intervalo de aproximadamente 35 °C a 39 °C, preferiblemente a 37 °C, mientras que las células de insecto típicamente se cultivan a 27 °C.

La presente divulgación puede usar células huésped recombinantes, por ejemplo, células huésped procariontas o eucariotas, es decir, células transfectadas con un constructo de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés. La frase "células animales" abarca vertebrados no mamíferos invertebrados (por ejemplo, aves, reptiles y anfibios) y células de mamíferos. Los ejemplos no limitantes de células de invertebrados incluyen las siguientes células de insectos: *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de seda/polilla de seda).

Una serie de líneas celulares de mamífero son células huésped adecuadas para la expresión recombinante de polipéptidos de interés. Las líneas de células huésped de mamíferos incluyen, por ejemplo, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, células L, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, mielomas murinos (por ejemplo, SP2/0 y NS0) y células C2C12, así como líneas celulares de primate transformadas, hibridomas, células diploides normales y cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Cualquier célula eucariota que sea capaz de expresar el polipéptido de interés se puede usar en los procedimientos de cultivo celular divulgados. Numerosas líneas celulares están disponibles de fuentes comerciales, como la American Type Culture Collection (ATCC). En una realización de la divulgación, el cultivo celular, por ejemplo, el cultivo celular a gran escala, emplea células de hibridoma. La construcción de células de hibridoma que producen anticuerpos es bien conocida en la técnica. En una realización de la invención, el cultivo celular, por ejemplo, el cultivo celular a gran escala, emplea células CHO.

- 5 Aunque en ciertas realizaciones el cultivo celular comprende células de mamífero, un experto en la técnica entenderá que es posible producir de manera recombinante polipéptidos de interés en eucariotas inferiores tales como levadura, o en procariotas tales como bacterias. Un experto en la técnica sabrá que las condiciones de cultivo para levaduras y cultivos de células bacterianas diferirán de las condiciones de cultivo de las células de animales, y comprenderá cómo estas condiciones deberán ajustarse para optimizar el crecimiento celular y/o la producción de proteínas. Un experto en la técnica también sabrá que el cultivo de células bacterianas o de levadura puede producir productos de desecho distintos de los productos de desecho de mamíferos, por ejemplo, etanol, acetato, etc.
- 10 Las cepas de levadura adecuadas para la producción de polipéptidos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar el polipéptido de interés. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar el polipéptido de interés. La expresión en bacterias puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante.
- 15 Por lo tanto, puede ser necesario plegar la proteína recombinante para producir material activo o más activo. En la técnica se conocen varios procedimientos para obtener proteínas heterólogas plegadas correctamente a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos procedimientos generalmente implican solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión y luego desnaturalizar completamente la proteína usando un agente caotrópico. Cuando los residuos de cisteína están presentes en la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína, a menudo es necesario realizar el plegamiento en un entorno que permita la formación correcta de enlaces disulfuro (un sistema redox). Los procedimientos generales de plegamiento se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185: 187-95, EP 0433225, y la Patente de Estados Unidos N° 5.399.677.
- 20 Después de la formación del cultivo celular inicial, las células crecen hasta un primer nivel crítico. El término "primer nivel crítico" se refiere a un punto durante la fase de crecimiento celular cuando la viabilidad celular puede verse afectada por la mayor concentración de productos de desecho (por ejemplo, inhibidores del crecimiento celular y metabolitos tóxicos, por ejemplo, lactato, amonio, etc.). En una realización de la invención, en un cultivo de células animales, por ejemplo, un cultivo de células de mamífero, el primer nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 1 millón hasta aproximadamente 9 millones de células por mililitro, por ejemplo, aproximadamente 2 millones de células por mililitro. En otra realización de la invención, el primer nivel crítico se alcanza aproximadamente del día 1 al día 5 del cultivo celular, por ejemplo, aproximadamente el día 2 del cultivo celular. En otra realización más de la invención, el primer nivel crítico se alcanza a una concentración de lactato de aproximadamente 1 g/l hasta aproximadamente 6 g/l, por ejemplo, aproximadamente 2 g/l. Un experto en la materia sabrá que los niveles apropiados para tales diversos criterios pueden diferir para otros tipos de cultivos celulares, por ejemplo, cultivos bacterianos o de levadura.
- 25 Cuando las células alcanzan el primer nivel crítico, se inicia el proceso de perfusión. La perfusión de un cultivo celular comprende reemplazar medio consumido (es decir, pobre en nutrientes, libre de células (o casi libre de células) y medio que contiene productos de desecho celular) con medio nuevo (medio rico en nutrientes libre de producto(s) de desecho celular), por lo que las células se retienen con el uso de un dispositivo de retención celular y los productos de desecho se eliminan. En una realización de la invención, los productos de desecho se eliminan haciendo pasar el medio a través de un dispositivo de microfiltración (MF). En otra realización de la invención, los productos de desecho se eliminan haciendo pasar el medio a través de un dispositivo de ultrafiltración (UF). O bien un dispositivo MF o UF, o similar, está conectado al biorreactor, por ejemplo, dentro de un circuito de recirculación externo que actúa en paralelo al biorreactor (véase, por ejemplo, la **Figura 1** y el Ejemplo 1). Los dispositivos MF y UF pueden ser, por ejemplo, filtros de cartucho de fibra (membranas) que permiten que ciertas sustancias pasen, mientras que retienen otras. En general, los dispositivos MF comprenden membranas con tamaños de poro que varían, por ejemplo, de 0,1 a 10 µm; los dispositivos de UF comprenden una gama de tamaños de poro más pequeños, por ejemplo, el límite de peso molecular de la membrana para una proteína globular puede estar entre 1.000 y 750.000 daltons. Pueden usarse diversas configuraciones de dispositivo de filtración, por ejemplo, filtro de fibra hueca conectado en línea, dispositivo de filtración de flujo tangencial, etc. Tales configuraciones de dispositivo de filtración son conocidas por un experto en la técnica, al igual que otras formas de dispositivos de retención celular que pueden usarse con la presente invención, por ejemplo, en el circuito de recirculación o interno al biorreactor
- 30 (véase, por ejemplo, Woodside y col., (1998) Cytotechnol., 28: 163-75).
- 35 Como resultado de la filtración, pueden desecharse sustancias (por ejemplo, productos de desecho, desechos celulares, etc.) que son lo suficientemente pequeñas para pasar a través de la membrana del filtro (por ejemplo, dispositivo MF o UF), es decir, el permeado. Las sustancias que son demasiado grandes para pasar a través del filtro (por ejemplo, células, proteínas de un cierto tamaño, etc.), es decir, material retenido, se retendrán y, opcionalmente, se devolverán al biorreactor.
- 40 Dependiendo del procedimiento, por ejemplo, un procedimiento que permita que sustancias de bajo y alto peso molecular pasen al permeado, por ejemplo, el procedimiento que utiliza un dispositivo de microfiltración, el permeado puede contener producto, por ejemplo, un producto polipeptídico (posiblemente en baja concentración) que puede capturarse para purificación. En tales realizaciones, el permeado no se descarta, sino que se retiene y el producto
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

polipeptídico del mismo se purifica, o al menos se purifica parcialmente. Alternativamente, el procedimiento que utiliza el dispositivo de ultrafiltración simultáneamente concentra y retiene el producto polipeptídico en el biorreactor, de modo que puede recogerse posteriormente en una sola cosecha, posiblemente simplificando la purificación del producto polipeptídico.

5 El tamaño de poro del filtro determina qué sustancias pasarán al permeado y qué sustancias se retendrán. En una realización de la invención, el dispositivo MF tiene un tamaño de poro de 0,2 micras. En otra realización de la invención, el dispositivo UF tiene un tamaño de poro que permite que solo las proteínas menores de 50.000 Dalton pasen al permeado. Por lo tanto, un experto en la técnica reconocerá que el uso de un dispositivo UF con un tamaño de poro de 50.000 Dalton retendrá el 100 % o casi el 100 % del producto polipeptídico en un cultivo celular a gran escala diseñado para la producción de anticuerpos (porque el peso molecular de un anticuerpo es típicamente de aproximadamente 150.000 daltons). Un experto en la técnica también reconocerá que el tamaño de poro del filtro puede variarse dependiendo del tamaño del producto polipeptídico final (por ejemplo, para retener la cantidad óptima del producto polipeptídico final) o del tamaño del producto de desecho a ser eliminado.

15 Por ejemplo, puede haber una ventaja adicional para mantener la viabilidad celular, retener proteínas producidas celularmente distintas del producto polipeptídico, por ejemplo, proteínas protectoras contra el cizallamiento, factores de crecimiento autocrino, etc. También puede ser necesario eliminar otras proteínas, por ejemplo, proteasas producidas por células que se han acumulado en el cultivo. Por lo tanto, un experto en la técnica puede ajustar el tamaño de poro del filtro de acuerdo con las necesidades experimentales o de producción.

20 En una realización de la invención, el medio nuevo, que reemplaza el medio consumido durante la perfusión, es el mismo medio que el medio de inoculación. En otra realización de la invención, el medio nuevo puede diferir del medio de inoculación, por ejemplo, el medio nuevo puede contener una mayor concentración de nutrientes.

25 La velocidad de perfusión en la presente invención puede ser cualquier velocidad apropiada para el cultivo celular. Por ejemplo, la velocidad de perfusión puede variar de aproximadamente 0,1 vvd hasta aproximadamente 20 vvd, o más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 vvd hasta aproximadamente 10 vvd, o lo más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 vvd hasta aproximadamente 2,5 vvd. La velocidad de perfusión puede permanecer constante durante un período de tiempo, o puede alterarse (es decir, aumentarse o reducirse) en el transcurso de un período de perfusión, o cualquier combinación de los mismos. Además, se puede aplicar un aumento o disminución en la velocidad de perfusión de cualquier manera conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, una alteración constante en el tiempo, por ejemplo, un aumento constante durante un período de perfusión, o una serie de alteraciones a lo largo del tiempo, por ejemplo, una serie de alteraciones estables, una serie de alteraciones escalonadas (por ejemplo, la velocidad de perfusión podría aumentarse o disminuirse de forma escalonada), o cualquier combinación de los mismos. La perfusión se puede aplicar de manera continua o de manera intermitente, como se indicó anteriormente. El momento del inicio y el cese de un período o períodos de perfusión, y de cualquier alteración de la perfusión, puede predeterminarse, por ejemplo, en un tiempo(s) o intervalo(s) determinados, o en función del control de algún parámetro o criterio.

40 Los experimentos realizados en este documento (Ejemplos) utilizaron perfusión continua durante la etapa de perfusión. En la perfusión continua, las bombas agregan medio nuevo y retiran continuamente el medio consumido del biorreactor (sin un cambio significativo en el volumen del biorreactor), proporcionando así nutrientes adicionales y manteniendo baja la concentración o concentraciones de la sustancia o sustancias inhibitoras. Una alternativa a la perfusión continua (denominada aquí "perfusión intermitente") puede ser útil; por ejemplo, si se pueden lograr velocidades suficientemente altas de adición/eliminación de medio, es posible realizar casi el mismo grado de (1) adición de nutrientes y (2) eliminación de inhibidor(es) como se logra por perfusión continua en un periodo de tiempo más corto, por ejemplo, perfundiendo el biorreactor durante solo una fracción de un día (por ejemplo, cuatro, seis, ocho o diez horas de perfusión por día (es decir, perfusión intermitente) en lugar de 24 horas por día (continuo)). Dicha perfusión intermitente puede hacerse posible, por ejemplo, mediante un sobredimensionamiento del aparato de filtración/retención celular en comparación con el tamaño del biorreactor. Además, pueden usarse tecnologías alternativas que incluyen, pero no se limitan a hidrociclones (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.878.545) para hacer posibles velocidades muy altas de perfusión a gran escala (usando perfusión continua o intermitente como se describe en la presente memoria). La capacidad de perfundir, por ejemplo, varios volúmenes de reactor por día en el lapso de varias horas (es decir, perfusión intermitente) puede proporcionar varias ventajas. Una ventaja es una reducción en el riesgo de contaminación, en virtud del hecho de que la operación de perfusión no ocurriría durante todos los turnos de una operación de fabricación. Menos daño por estrés de cizallamiento a las células debido a un número reducido de pasos a través del dispositivo de retención celular, y la reducción o eliminación de la necesidad de un tanque de retención estéril para el medio de perfusión, son otras dos ventajas potenciales de una operación de perfusión intermitente.

60 La reducción del volumen de un biorreactor antes de una perfusión intermitente es otro procedimiento para aumentar potencialmente la eficacia de la perfusión. Por ejemplo, antes de la perfusión intermitente, el volumen del biorreactor puede reducirse, por ejemplo, en un 50 % mediante la eliminación del medio consumido (por ejemplo, medio consumido sin células) sin la adición de medio nuevo. La perfusión puede entonces realizarse (con ningún cambio adicional en el volumen del biorreactor durante esta fase), y luego se puede agregar medio adicional al biorreactor

para devolverlo al volumen original. Si un experto en la técnica utiliza el mismo volumen de medio para toda la operación para cada uno de los dos casos (es decir, perfusión realizada con reducción previa del volumen del reactor, en comparación con la perfusión realizada sin reducción previa del volumen del reactor), y suponiendo un sistema bien mezclado, los cálculos matemáticos básicos dictan que la concentración de cualquiera de los compuestos inhibidor se reduciría en un 50 % adicional en el caso del biorreactor con reducción previa del volumen. Cálculos similares pueden ser realizados por un experto en la técnica para determinar el valor de cualquier grado particular de reducción del volumen antes de la perfusión.

En algunas realizaciones de la invención, puede ser necesario administrar al menos una alimentación en bolo al cultivo celular durante la perfusión. La alimentación en bolo es una alimentación de nutrientes concentrada, en la que la alimentación se administra de una sola vez. En general, tal alimentación en bolo evita el agotamiento de nutrientes sin requerir una modificación o ajuste de la composición del medio de perfusión. Un experto en la técnica sabría en qué punto durante el cultivo celular administrar tal alimentación o alimentaciones en bolo, por ejemplo, controlando los niveles de nutrientes en el cultivo celular.

La etapa de perfusión del cultivo celular continúa hasta que el cultivo celular alcanza, por ejemplo, un segundo nivel crítico. El "segundo nivel crítico" es un punto en la fase de crecimiento en el que la densidad celular del cultivo celular es alta, pero la factibilidad de eliminar inhibidores del crecimiento celular y metabolitos tóxicos, por ejemplo, productos de desecho, por ejemplo, lactato y amoníaco, continuando la perfusión se vuelve limitada de tal forma que los inhibidores del crecimiento y los metabolitos tóxicos comenzarán a afectar la viabilidad y/o productividad de las células. En una realización de la invención, en un cultivo de células animales, por ejemplo, un cultivo de células de mamífero, el segundo nivel crítico se alcanza a una densidad celular de aproximadamente 5 millones hasta aproximadamente 40 millones de células por mililitro, por ejemplo, aproximadamente 10 millones de células por mililitro. En otra realización de la invención, el segundo nivel crítico se alcanza aproximadamente del día 2 al día 7 del cultivo celular, por ejemplo, aproximadamente el día 5 del cultivo celular. Un experto en la materia sabrá que los niveles apropiados para tales diversos criterios pueden diferir para otros tipos de cultivos celulares, por ejemplo, cultivos bacterianos o de levadura.

En esta etapa, la perfusión puede terminarse abruptamente o reducirse lentamente y continuarse durante un cierto período de tiempo, de modo que los productos de desecho pueden seguir siendo eliminados. Como resultado de la perfusión del cultivo celular, se eliminan los componentes tóxicos del cultivo y se extiende el período de crecimiento celular, aumentando el número máximo y sostenido de células viables disponibles para la producción de proteínas.

Cuando el cultivo celular alcanza el segundo nivel crítico, se inicia la fase de producción de proteína. La fase de producción es la fase durante el cultivo celular, por ejemplo, cultivo celular a gran escala, cuando se produce y recoge la mayoría del producto polipeptídico (aunque puede haberse producido algún producto polipeptídico antes del inicio de la fase de producción). La fase de producción se inicia, por ejemplo, mediante un cambio, por ejemplo, en temperatura (es decir, un cambio de temperatura), pH, osmolaridad, o un nivel de inductor químico o bioquímico del cultivo celular, o combinaciones de los mismos. La lista anterior es meramente de naturaleza ejemplar y no pretende ser una mención limitante. Los parámetros característicos de dicho cambio, que a veces se denomina cambio metabólico, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un cambio de temperatura de un cultivo de células CHO de 37 °C a 31 °C ralentiza el crecimiento del cultivo celular y puede tener un efecto de disminución de las cantidades de ácido láctico y amoníaco producidas por el cultivo celular. Las enseñanzas con respecto a diversos cambios en los cultivos celulares (que pueden producir un cambio metabólico (por ejemplo, un cambio de temperatura)) se pueden encontrar en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 2006/0121568).

Un cambio de temperatura puede conducir al cese, o casi cesación, de la producción de amoníaco y ácido láctico. En algunos casos, tarde en el cultivo celular, el ácido láctico y el amoníaco también pueden ser consumidos por el cultivo celular. El cese de la producción de ácido láctico y amoníaco o el consumo de ácido láctico y amoníaco promueven la viabilidad celular, la productividad celular y tienen el efecto de aumentar el título del polipéptido del producto.

En la presente invención, un cultivo de células alimentado por lotes sigue un período o períodos de perfusión. Además, la fase de producción del polipéptido sigue un desplazamiento metabólico, por ejemplo, un cambio de temperatura. Como se demuestra en los Ejemplos, el período de perfusión del cultivo celular puede continuar más allá de un cambio de temperatura. Un experto en la técnica podría determinar el valor de continuar la perfusión más allá del cambio de temperatura, o cualquier cambio en el cultivo celular que pueda producir, por ejemplo, un cambio metabólico. Por lo tanto, un período de cultivo de células alimentadas por lotes puede comenzar en algún período de tiempo después, por ejemplo, de un cambio de temperatura. En algún momento durante la fase de producción del polipéptido, las células se mantienen en un cultivo de células alimentadas por lotes, por ejemplo, una vez o más de una vez recibiendo alimentaciones de nutrientes. Un experto en la materia reconocerá que la presente invención se puede aplicar a cualquier procedimiento que incorpore un cultivo de células alimentadas por lotes, es decir, que incluya el uso de cualquier medio apropiado para dicho cultivo celular, y que incluya la producción de cualquier proteína mediante dicho cultivo celular. Un experto en la técnica también comprenderá que, en algunas realizaciones de la invención, las células mantenidas en un cultivo alimentado por lotes pueden seguir creciendo y la densidad

celular puede continuar aumentando. En otras realizaciones, el mantenimiento de las células en un cultivo alimentado por lotes puede reducir significativamente la velocidad de crecimiento de las células de modo que la densidad celular se estabilice.

5 Se conocen en la técnica diversos procesos de cultivo alimentado por lotes y se pueden usar en los procedimientos de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de procesos alimentados por lotes que se usarán con los procedimientos de la presente invención incluyen: alimentación invariante a velocidad constante de glucosa en un proceso alimentado por lotes (Ljunggren y Häggström (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 808-18; Häggström y col. (1996) *Annals NY Acad. Sci.* 782: 40-52); un proceso alimentado por lotes en el que la administración de glucosa depende del muestreo de glucosa (por ejemplo, a través del análisis de inyección de flujo, como el de Male y col., (1997) *Biotechnol. Bioeng.*, 55: 497-504; Siegwart y col. (1999) *Biotechnol. Prog.* 15: 608-16, o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), como el de Kurokawa y col. (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, 44: 95-103); un proceso alimentado por lotes con medios diseñados racionalmente (Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2008/0108553); y un proceso alimentado por lotes que usa alimentación de glucosa restringida (Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2005/0070013).

En ciertas realizaciones de la presente invención, el especialista puede considerar que es beneficioso o necesario controlar periódicamente las condiciones particulares del cultivo celular en crecimiento. Monitorear las condiciones de cultivo celular permite al especialista determinar si el cultivo celular está produciendo el polipéptido recombinante de interés en niveles subóptimos o si el cultivo está a punto de entrar en una fase de producción subóptima. El control de las condiciones de cultivo celular también permite al especialista determinar si el cultivo celular requiere, por ejemplo, una alimentación adicional. Para controlar ciertas condiciones de cultivo celular, puede ser necesario eliminar pequeñas alícuotas del cultivo para su análisis. Un experto en la materia entenderá que tal eliminación puede potencialmente introducir contaminación en el cultivo celular, y tomará las precauciones adecuadas para minimizar el riesgo de dicha contaminación.

Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario controlar, por ejemplo, la temperatura, el pH, la densidad celular, la viabilidad celular, la densidad celular viable integrada, los niveles de lactato, los niveles de amonio, la osmolaridad o el título del polipéptido expresado. Numerosas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica para medir tales condiciones/criterios. Por ejemplo, la densidad celular se puede medir usando un hemocitómetro, un dispositivo automático de conteo de células (por ejemplo, un contador Coulter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA), o un examen de densidad celular (por ejemplo, CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA). La densidad celular viable se puede determinar mediante la tinción de una muestra de cultivo con azul de tripano. Los niveles de lactato y amonio pueden medirse, por ejemplo, con el Analizador Químico BioProfile 400 (Nova Biomedical, Waltham, MA), que toma mediciones en línea, en tiempo real, de nutrientes, metabolitos y gases clave en medios de cultivo celular. La osmolaridad del cultivo celular puede medirse, por ejemplo, mediante un osmómetro de punto de congelación. La HPLC puede usarse para determinar, por ejemplo, los niveles de lactato, amonio o el polipéptido o proteína expresado. En una realización de la invención, los niveles de polipéptido expresado se pueden determinar usando, por ejemplo, HPLC de proteína A. Alternativamente, el nivel del polipéptido o proteína expresado puede determinarse mediante técnicas estándar tales como tinción de Coomassie de geles de SDS-PAGE, transferencia de Western, ensayos de Bradford, ensayos de Lowry, ensayos de Biuret y absorbancia de UV. También puede ser beneficioso o necesario controlar las modificaciones postraduccionales del polipéptido o proteína expresado, que incluyen la fosforilación y la glicosilación.

Al final de la fase de producción, las células se recogen y el polipéptido de interés se recoge y se purifica. Las formas solubles del polipéptido se pueden purificar a partir de medios acondicionados. Las formas unidas a la membrana del polipéptido se pueden purificar preparando una fracción total de membrana a partir de las células que expresan y extrayendo las membranas con un detergente no iónico tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Las proteínas citosólicas o nucleares pueden prepararse mediante la lisis de las células huésped (mediante fuerza mecánica, bomba Parr, sonicación, detergente, etc.), eliminando la fracción de la membrana celular mediante centrifugación y reteniendo el sobrenadante.

El polipéptido se puede purificar usando otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido producido por los procedimientos descritos puede concentrarse usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON® o PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación tal como un medio de filtración en gel. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico (por ejemplo, una columna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); dicha resina contiene una matriz o sustrato que tiene grupos sobresalientes de dietilaminoetil (DEAE) o polietilenimina (PEI). Las matrices utilizadas para la purificación pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede usarse una etapa de intercambio catiónico para la purificación de proteínas. Intercambiadores de cationes adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo (por ejemplo, columnas S-SEPHAROSE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

La purificación del polipéptido del sobrenadante de cultivo también puede incluir una o más etapas de columna sobre resinas de afinidad, tales como concanavalina A-agarosa, AF-HEPARIN650, heparina-TOYOPEARL® o azul

Cibacron 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); columnas de cromatografía de interacción hidrófoba que usan resinas tales como fenil éter, butil éter o propil éter; o columnas de inmunoafinidad que usan anticuerpos para la proteína marcada. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de HPLC que emplean medios de HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo sobresalientes u otros grupos alifáticos (por ejemplo, columnas de Ni-NTA), para purificar adicionalmente la proteína. Alternativamente, los polipéptidos pueden expresarse en forma recombinante en una forma que facilita la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse como una fusión con proteínas tales como proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX); los kits para la expresión y purificación de tales proteínas de fusión están disponibles comercialmente a través de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ) e Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente. Las proteínas también se pueden marcar con un pequeño epítipo (por ejemplo, etiquetas His, myc o Flag) y posteriormente identificar o purificar usando un anticuerpo específico para el epítipo elegido. Los anticuerpos para epítopos comunes están disponibles a partir de numerosas fuentes comerciales. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores en diversas combinaciones o con otros procedimientos conocidos, se pueden emplear para purificar un polipéptido de interés producido por los procedimientos y medios de cultivo de células animales a gran escala descritos en este documento.

Los procedimientos y composiciones de la presente invención se pueden usar para producir cualquier proteína de interés incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas que tienen propiedades farmacéuticas, de diagnóstico, agrícolas y/o cualquiera de una variedad de otras que son útiles en aplicaciones comerciales, experimentales y/u otras aplicaciones. Además, una proteína de interés puede ser una proteína terapéutica. A saber, una proteína terapéutica es una proteína que tiene un efecto biológico en una región del cuerpo en la que actúa o en una región del cuerpo en la que actúa remotamente a través de productos intermedios. En ciertas realizaciones, las proteínas producidas usando procedimientos y/o composiciones de la presente invención pueden procesarse y/o modificarse. Por ejemplo, una proteína a producir de acuerdo con la presente invención puede estar glicosilada.

La presente invención se puede usar para cultivar células para la producción ventajosa de cualquier proteína terapéutica, tal como enzimas, receptores, fusiones de receptores, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales), fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, proteínas de fusión de Fc, citoquinas, hormonas, factores reguladores, factores de crecimiento, factores de coagulación/aglutinación o agentes de unión a antígeno farmacéutica o comercialmente relevantes. La lista anterior de proteínas es meramente de naturaleza ejemplar, y no pretende ser una mención limitante. Un experto en la materia conocerá otras proteínas que se pueden producir de acuerdo con la presente invención, y podrá usar los procedimientos descritos en la presente memoria para producir tales proteínas.

En una realización de la invención, la proteína se produce usando el procedimiento de la invención en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende al menos uno, y típicamente dos, dominios VH o porciones de los mismos, y/o al menos uno, y típicamente dos, dominios VL o porciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera están interconectadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro. Los anticuerpos, o una porción de los mismos, pueden obtenerse de cualquier origen, incluyendo, pero sin limitarse a, roedores, primates (por ejemplo, primates humanos y no humanos), camélidos, tiburones, etc., o pueden producirse de forma recombinante, por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o generados *in vitro*, por ejemplo, por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen, pero sin limitarse a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un Fv monocatenario (scFv, ver a continuación); (vii) un camélido o un dominio variable de cadena pesada camelizado (VHH, véase a continuación); (viii) un anticuerpo biespecífico (véase a continuación); y (ix) uno o más fragmentos de una molécula de inmunoglobulina fusionados a una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarias (scFv)); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242: 423-26; Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879-83). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan por su función para determinar de la misma manera que los anticuerpos intactos.

En algunas realizaciones, el término "fragmento de unión a antígeno" abarca anticuerpos de dominio único. Los anticuerpos de dominio único pueden incluir anticuerpos cuyas CDR son parte de un polipéptido de dominio único. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos convencionales de cuatro cadenas,

anticuerpos modificados genéticamente y estructuras de dominio único distintas de las derivadas de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica, o cualquier anticuerpo de dominio único futuro. Los anticuerpos de dominio único pueden derivarse de cualquier especie que incluye, pero no se limita a, ratón, humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino y tiburón. De acuerdo con al menos un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio único como se usa en este documento es un anticuerpo de dominio único natural que se conoce como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. Tales anticuerpos de dominio único se describen, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud Internacional N° WO 94/04678. Este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovisto de cadena ligera se conoce aquí como VHH o nanocuerpo, para distinguirlo de la VH convencional de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Tal molécula de VHH puede derivarse de anticuerpos producidos en especies *Camelidae*, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de *Camelidae* pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadena ligera; tales moléculas de VHH están dentro del ámbito de la invención.

El "fragmento de unión a antígeno" puede, opcionalmente, incluir adicionalmente un residuo que potencia uno o más de, por ejemplo, la estabilidad, la función de la célula efectora o la fijación del complemento. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede incluir adicionalmente un residuo pegilado, albúmina o una región constante de cadena ligera y/o pesada.

Aparte de los anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadena pesada/cadena ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de procedimientos que incluyen la fusión de hibridomas o el enlazamiento de fragmentos Fab'; véase, por ejemplo, Songvilai y Lachmann (1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 315-21; Kostelny y col. (1992) J. Immunol. 148: 1547-53. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno anteriormente mencionados se pueden producir usando los procedimientos de la presente invención.

Además, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para producir fármacos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP^{MR}) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). Los SMIP son polipéptidos monocatenarios compuestos por un dominio de unión para una estructura afín tal como un antígeno, un contrarreceptor o similar, un polipéptido de región bisagra que tiene uno o ningún residuo de cisteína, y dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina (véase también www.trubion.com). Los SMIP y sus usos y aplicaciones se describen, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 y 2005/0238646, y miembros de la familia de patentes relacionados de los mismos.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no se pretende que limiten el ámbito de la invención de ninguna manera, y no deben interpretarse como tal. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, por ejemplo, clonación, transfección y aspectos básicos de procedimientos para sobreexpresión de proteínas en líneas celulares. Tales procedimientos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 1

Configuración de un aparato biorreactor de perfusión

Un ejemplo de aparato biorreactor de la invención se ilustra en la FIG. 1. Un biorreactor de tanque agitado tiene un circuito de recirculación externo instalado con un filtro de cartucho de fibra hueca MF o UF conectado en línea. La bomba de recirculación de circuito de perfusión extrae continuamente el medio que contiene células del biorreactor, lo bombea a través del lado del tubo del dispositivo de fibra hueca y devuelve el medio con células ligeramente concentradas al biorreactor. Una bomba de alimentación suministra medio nuevo al biorreactor y una bomba de permeado elimina el permeado libre de células del lado de la carcasa del filtro de cartucho de fibra hueca, manteniendo el volumen del biorreactor a un nivel aproximadamente constante. Dependiendo del proceso, el permeado puede contener producto que podría capturarse para purificación. El caudal a través del circuito de recirculación es muchas veces el de la velocidad a la que la bomba de permeado extrae el medio.

Ejemplo 2

Proceso alimentado por lotes modificado

Ejemplo 2.1: Materiales y procedimientos

Se usó una línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1), que produce un anticuerpo monoclonal anti-IL-22 humanizado, en los experimentos de cultivo. Se usó medio basado en al menos una formulación incluida en la

Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0121568 como medio de perfusión en los Ejemplos 2.2 y 2.3 ("medio normal" o similar). En el Ejemplo 2.4, se utilizó el medio de los Ejemplos 2.2 y 2.3 para un biorreactor, mientras que un biorreactor adicional utilizó una variante enriquecida en nutrientes del mismo, es decir, medio que estaba más altamente enriquecido en aminoácidos y vitaminas ("medio más concentrado" o similar). Las porciones de cultivo alimentado por lotes de los experimentos del biorreactor también usaron tales medios y/o variantes de los mismos. Se equiparon biorreactores Applikon (Foster City, CA) de tres litros (volumen de trabajo de 2 litros) con controladores automáticos (Applikon BioController 1010) con circuitos de perfusión externos que consisten en cartuchos de fibra hueca de microfiltración (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, 0,2 micras C22M-021-01N) o ultrafiltración (GE Healthcare, Piscataway, NJ, NMWC de 50 kDa, modelo UFP-50-C-5A). Se hizo circular cultivo (que contiene células) al lado del tubo de los cartuchos de filtración de fibra hueca con una bomba peristáltica (Watson-Marlow, Wilmington, MA, modelo 505U) y se extrajo el medio consumido sin células del lado de la carcasa usando una bomba peristáltica programable en Tándem modelo 1081 ChemTec (Scilog, Inc., Middleton, WI). La densidad celular y la viabilidad se controlaron mediante el procedimiento de exclusión de colorante azul de tripano utilizando un dispositivo automático de conteo de células, CEDEX modelo AS20 (Innovatis GmbH, Bielefeld, Alemania). Los niveles de lactato y amonio se midieron usando un analizador automático NOVA Bioprofile 400 (Nova Biomedical Corp., Waltham, MA). La osmolalidad se midió usando un osmómetro automático, modelo 3900 (Advanced Instruments, Inc., Norwood, MA). El título (concentración de anticuerpo) se midió usando cromatografía analítica de afinidad de HPLC de proteína A (HP Series 1100 HPLC con una columna 2-1001-00 ProA de Applied Biosystems, Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, Alemania, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ejemplo 2.2: Proceso de alimentación por lotes modificado con dispositivo de microfiltración

Estos experimentos investigaron el uso de perfusión continua durante un tiempo relativamente corto seguido de un cultivo alimentado por lotes, y usaron un esquema de incrementos por etapas en la velocidad de perfusión comenzando el día 2 del cultivo celular inicial. El medio utilizado para la perfusión fue el mismo medio que se usó para la inoculación inicial. Para los experimentos etiquetados como "alta velocidad de perfusión", la perfusión del biorreactor se inició con 1 volumen del reactor por día de perfusión (vvd) el día 2, aumentó hasta 1,5 vvd el día siguiente y finalmente a 2 vvd el día 4, para 24 horas adicionales (véase la **FIG. 2**). En este punto, es decir, el día 5, se detuvo la perfusión, se detuvo la recirculación a través del circuito de recirculación que contiene el dispositivo de microfiltración (filtro de tamaño de poro de 0,2 micras de fibra hueca) y todas las células que todavía estaban en el circuito de recirculación se perdieron ya que el bucle de recirculación fue taponado frente a las células al circuito de recirculación en el biorreactor. En otros experimentos, el biorreactor de "velocidad de perfusión baja" comenzó con 0,5 volúmenes de reactor por día de perfusión, y se aumentó a 0,75, luego a 1,0, de una forma similar (**FIG. 2**). Se usó una condición de control usando un biorreactor alimentado por lotes con idéntica densidad de inoculación y medio para determinar el alcance de cualquier beneficio de la perfusión continua, a corto plazo, sobre un biorreactor alimentado por lotes simple. La temperatura en todos los biorreactores se cambió de 37 °C a 31 °C el día 5. El cultivo de control alimentado por lotes también recibió diferentes alimentaciones concentradas de nutrientes, comenzando el día 3, de manera que los niveles de nutrientes se mantuvieron altos (para mantener el crecimiento celular). Por lo tanto, es probable que los beneficios exhibidos en los reactores de perfusión resultaron de la eliminación de los productos de desecho, por ejemplo, lactato y amonio.

Se alcanzaron densidades celulares viables significativamente más altas, y se mantuvieron más tiempo, en los biorreactores que utilizan la perfusión a corto plazo en comparación con el biorreactor de control alimentado por lotes (**FIG. 3**). Las viabilidades celulares también fueron más altas, y se mantuvieron más tiempo, con perfusión a corto plazo (**FIG. 4**). Además, una velocidad de perfusión más alta extendió la viabilidad por más tiempo (**FIG. 4**).

La perfusión continua iniciada el día 2 suprimió la acumulación de lactato y amonio en cultivos celulares (véanse las **FIGs. 5 y 6**). La alta velocidad de perfusión seguida por el cultivo alimentado por lotes suprimió el lactato y el amonio en mayor medida. La fuerza osmótica del medio también se mantuvo en un intervalo más adecuado para el crecimiento celular y la producción de proteínas mediante la introducción de la perfusión (**FIG. 7**). El título de anticuerpo final, que se correlaciona con la productividad del biorreactor, aumentó aproximadamente 86 % (comparando el cultivo alimentado por lotes solo con cultivo de alto rendimiento de perfusión) mediante el uso de perfusión a corto plazo (**FIG. 8**). El título de anticuerpo final recuperado del biorreactor de perfusión fue menor que el anticuerpo real producido en el biorreactor de perfusión, ya que se perdió algo de anticuerpo en el permeado y no se recogió ni recuperó.

Ejemplo 2.3: Proceso alimentado por lotes modificado con dispositivo de ultrafiltración

En estos experimentos, se iniciaron aumentos escalonados en la velocidad de perfusión en el día 2 del cultivo celular, y el cambio de temperatura de 37 °C a 31 °C se realizó en el día 4 (**FIG. 9**). El día 5, la perfusión se detuvo y las células se mantuvieron como un cultivo de células alimentadas por lotes. No se realizó un control alimentado por lotes para este experimento. Una condición experimental adicional consistía en un biorreactor que funcionaba a una alta velocidad de perfusión, excepto que el circuito de recirculación contenía una fibra hueca de dispositivo de ultrafiltración (UF) con un corte de 50.000 daltons. Este dispositivo retuvo casi el 100 % del producto polipeptídico (es decir, el anticuerpo anti-IL-22). Las densidades celulares en estos experimentos fueron significativamente mayores que las densidades celulares de los cultivos en el Ejemplo 2.2 (véase la **FIG. 10**, véase la **FIG. 3**). El

bioreactor conectado al dispositivo UF funciona de manera similar, si no mejor que, el bioreactor conectado al dispositivo MF. Vale la pena señalar que no hubo obstrucción, es decir, reducción en el flujo de permeado, observado en el circuito de recirculación (es decir, dispositivo de retención celular), posiblemente debido a las altas viabilidades celulares logradas tanto en el bioreactor que funciona con el dispositivo MF como en el bioreactor que funciona con el dispositivo UF (**FIG. 11**). Se obtuvieron títulos de anticuerpos muy altos; por ejemplo, el bioreactor que funciona con el dispositivo de UF alcanzó una concentración de anticuerpo de 4,5 g/l en solo nueve días (véase la **FIG. 12**).

Ejemplo 2.4: Proceso alimentado por lotes modificado con perfusión continua

En el experimento de perfusión "continuado" (es decir, extendido), la perfusión se extendió al día 6 del cultivo, con una velocidad de flujo de perfusión máxima a 1,5 vvd (véase la **FIG. 13**). Un bioreactor utilizaba medio normal y tenía el circuito de recirculación conectado a un dispositivo MF (R1), mientras que otro bioreactor utilizaba una formulación de medio más concentrado y tenía el circuito de recirculación conectado a un dispositivo UF (R2).

Para determinar la utilidad de la perfusión continua (por ejemplo, perfusión que se extiende dos días después del cambio de temperatura), las muestras se extrajeron de los bioreactores el día del cambio de temperatura, es decir, el día 4 y se colocaron en matraces de agitación de plástico estilo Erlenmeyer en una incubadora humidificada con 7 % de dióxido de carbono a 31 °C. El matraz de agitación 1 (SF1) contenía muestras de R1 y el matraz de agitación 2 (SF2) contenía muestras de R2. Tales matraces de agitación son generalmente conocidos por producir resultados similares a las condiciones controladas del bioreactor de tanque agitado. Mientras que los matraces ya no se sometieron a perfusión, se alimentaron con nutrientes concentrados de manera similar a los bioreactores de tanque agitado.

Además, los nutrientes en bolo que se alimentan a los bioreactores en este experimento se iniciaron el día 5, precediendo al cese de la perfusión (véase la **FIG. 13**). Las alimentaciones también fueron más frecuentes y más concentradas que en los Ejemplos 2.2 y 2.3. Para aproximar los niveles de nutrientes que permanecen en el cultivo celular, las muestras del bioreactor se analizaron regularmente mediante un osmómetro de punto de congelación para determinar la resistencia osmótica. Si la alimentación de nutrientes del día anterior se había consumido en gran medida, es decir, la resistencia osmótica había vuelto al valor alimentación previa, el cultivo se complementó con una alimentación adicional.

Las densidades celulares en este experimento no fueron tan altas como en el Ejemplo 2.3, pero la viabilidad se mantuvo durante mucho más tiempo, dando como resultado una densidad celular viable integrada más alta (datos no mostrados). Al comparar el número de células viables en las muestras en los matraces agitados con los de los bioreactores de los que se extrajeron, era evidente que la perfusión continua, es decir, la perfusión durante dos días después del cambio de temperatura en el día 4, aumentaba ligeramente el pico de densidad de células viables en el bioreactor que utiliza el medio más concentrado y el dispositivo de retención de células UF, pero no parece beneficiar significativamente la densidad de células viable en el bioreactor utilizando el medio menos concentrado y el dispositivo de retención de células MF (véase la **FIG. 14**). Es posible que la tensión de cizallamiento de la recirculación continuada de células a través del circuito de filtración MF disminuya ligeramente la viabilidad del cultivo mantenido en el bioreactor cuando se compara con el del matraz de agitación de los días 4 a 6 (véase la **FIG. 15**).

La perfusión continua en los bioreactores suprimió la acumulación de lactato y amonio, en comparación con los niveles en los matraces de agitación no perfundidos, de los días 4-6 (véanse las **FIGs. 16 y 17**). Sin embargo, las células en los matraces agitados no perfundidos todavía convirtieron su metabolismo, y comenzaron a tomar ácido láctico y amoníaco alrededor del día 6 o 7.

Las concentraciones de producto para este experimento se muestran en la **FIG. 18**. Para todas las condiciones, los títulos son más altos que cualquiera que haya sido reportado en la literatura hasta la fecha para un proceso de cultivo de células de mamífero alimentado por lotes. La condición de UF con el medio concentrado alcanzó 8,9 g/l el día 14 y 9,9 g/l el día 17. Hubo solo una ligera diferencia en la concentración de producto en los matraces agitados no perfundidos, lo que sugiere que la perfusión más allá del día 4 puede no haber sido necesaria para lograr una alta productividad del bioreactor. Vale la pena señalar que, si se utilizara un dispositivo UF como la metodología de retención celular, tampoco se incrementaría el volumen de cosecha, que es una consideración para una instalación con volúmenes fijos de tanques de procesamiento (por ejemplo, ningún aumento en el volumen de recolección simplificaría la purificación).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cultivo celular para la producción de un polipéptido que comprende las etapas de:
- 5 (a) cultivar células en un cultivo celular hasta un primer nivel crítico en el que se alcanza dicho primer nivel crítico a
- una densidad celular de 1 millón hasta 9 millones de células por mililitro,
 - un nivel de concentración de lactato de 1 g/l hasta 6 g/l o,
 - en el día 1 al día 5 del cultivo celular;
- 10 (b) perfundir el cultivo celular, en el que la perfusión comprende reemplazar el medio consumido por medio nuevo, con lo que se retiene al menos una porción de las células y se elimina al menos un producto de desecho;
- (c) cultivar células en el cultivo celular hasta un segundo nivel crítico en el que dicho segundo nivel crítico se alcanza a
- 15 - una densidad celular de 5 millones hasta 40 millones de células por mililitro, o
- en el día 2 al día 7 del cultivo celular;
- (d) iniciar una fase de producción de polipéptido por un cambio de temperatura, de pH o de osmolaridad del cultivo celular o una combinación de los mismos; y
- 20 (e) mantener las células en un cultivo alimentado por lotes durante al menos una porción de la fase de producción del polipéptido,
- en el que el cultivo celular es un cultivo de células CHO.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer nivel crítico se alcanza a una densidad celular de 1 millón a 9 millones de células por mililitro.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer nivel crítico se alcanza a una concentración de lactato de 1 g/l a 6 g/l.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer nivel crítico se alcanza en el día 1 al día 5 del cultivo celular.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo nivel crítico se alcanza a una densidad celular de 5 a 40 millones de células por mililitro.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo nivel crítico se alcanza en el día 2 al día 7 del cultivo celular.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de iniciar la fase de producción del polipéptido comprende un cambio de temperatura en el cultivo celular.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de perfusión comprende además administrar al menos una alimentación en bolo al cultivo celular.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de mantenimiento de las células en un cultivo alimentado por lotes se inicia cuando el cultivo celular alcanza el segundo nivel crítico.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de mantenimiento de las células en un cultivo alimentado por lotes se inicia después de que ha transcurrido un período de tiempo desde que el cultivo celular alcanzó el segundo nivel crítico.
- 55 12. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende, después de la etapa de mantenimiento de las células en un cultivo alimentado por lotes, una etapa de recolección del polipéptido producido por el cultivo celular.
- 60 13. El procedimiento de la reivindicación 12, que además comprende, después de la etapa de recolección del polipéptido, una etapa de purificación del polipéptido.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 7, 12 y 13, en el que el polipéptido producido por el cultivo celular es un anticuerpo.

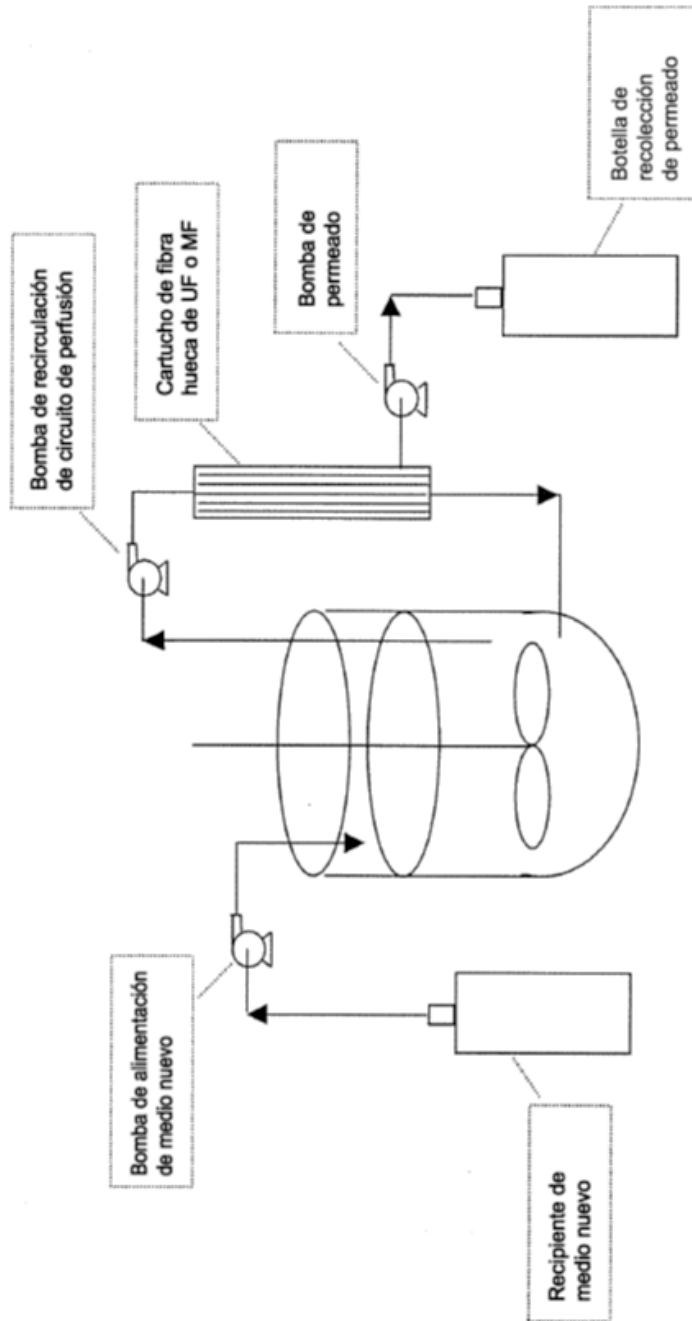


FIG. 1

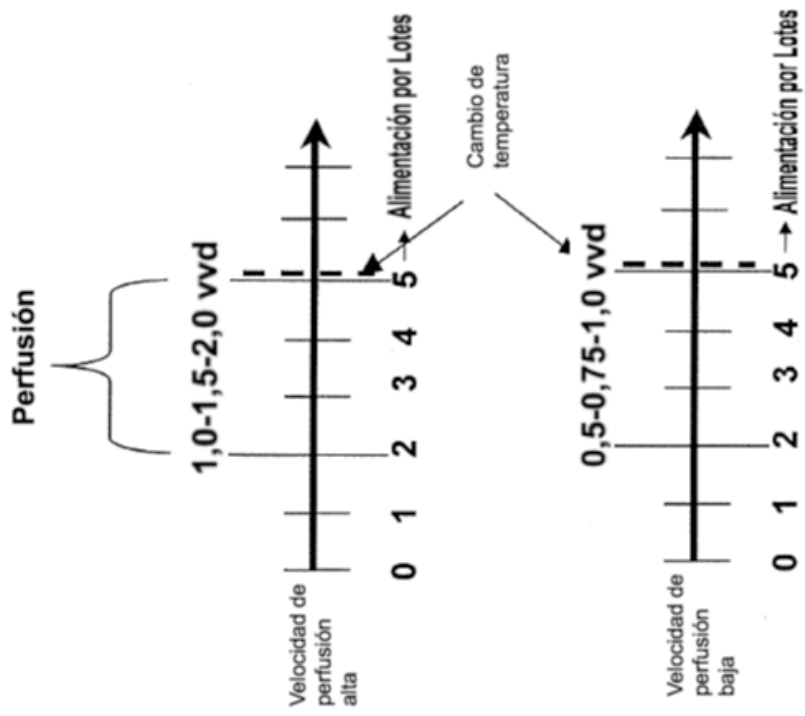


FIG. 2

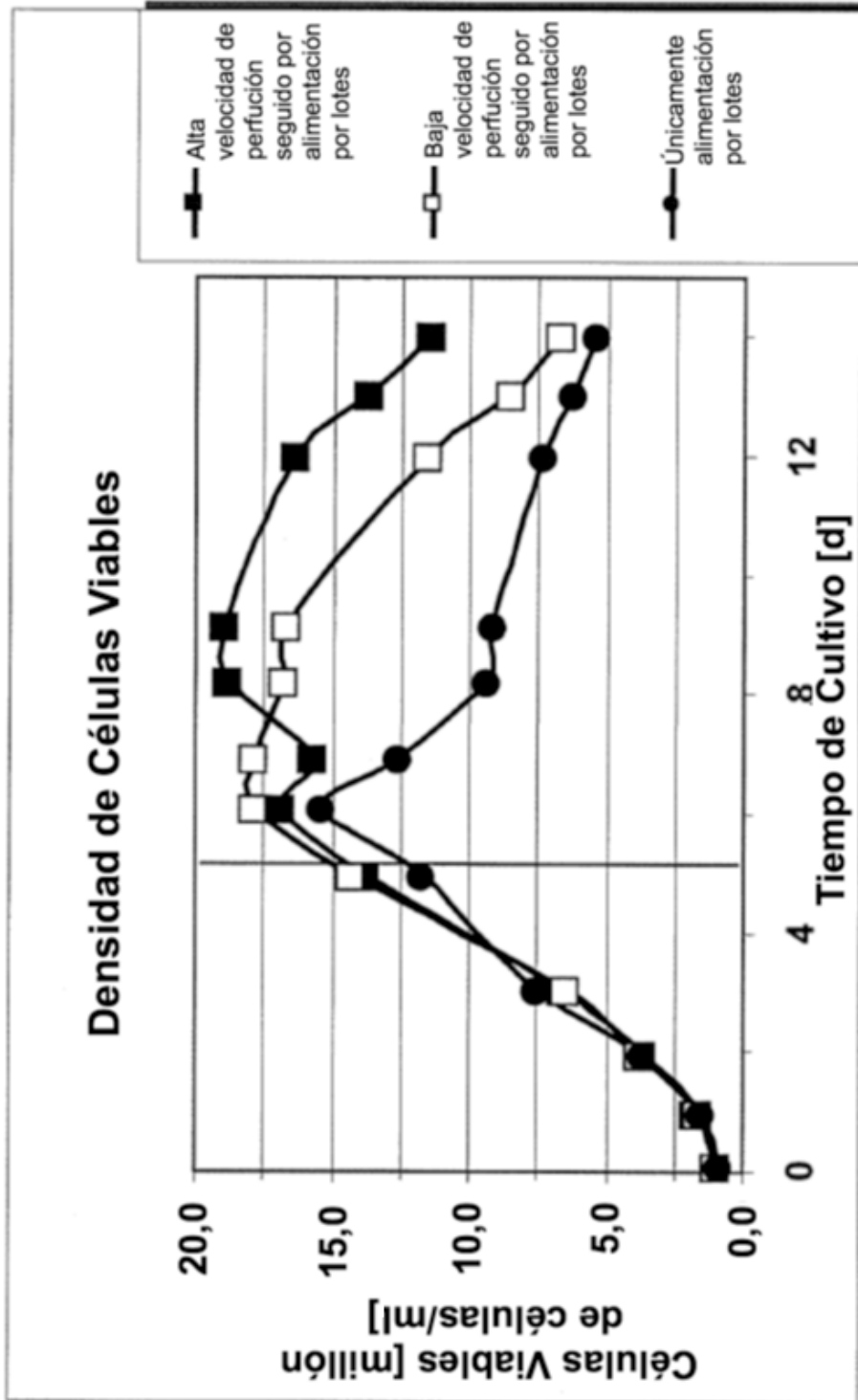


FIG. 3

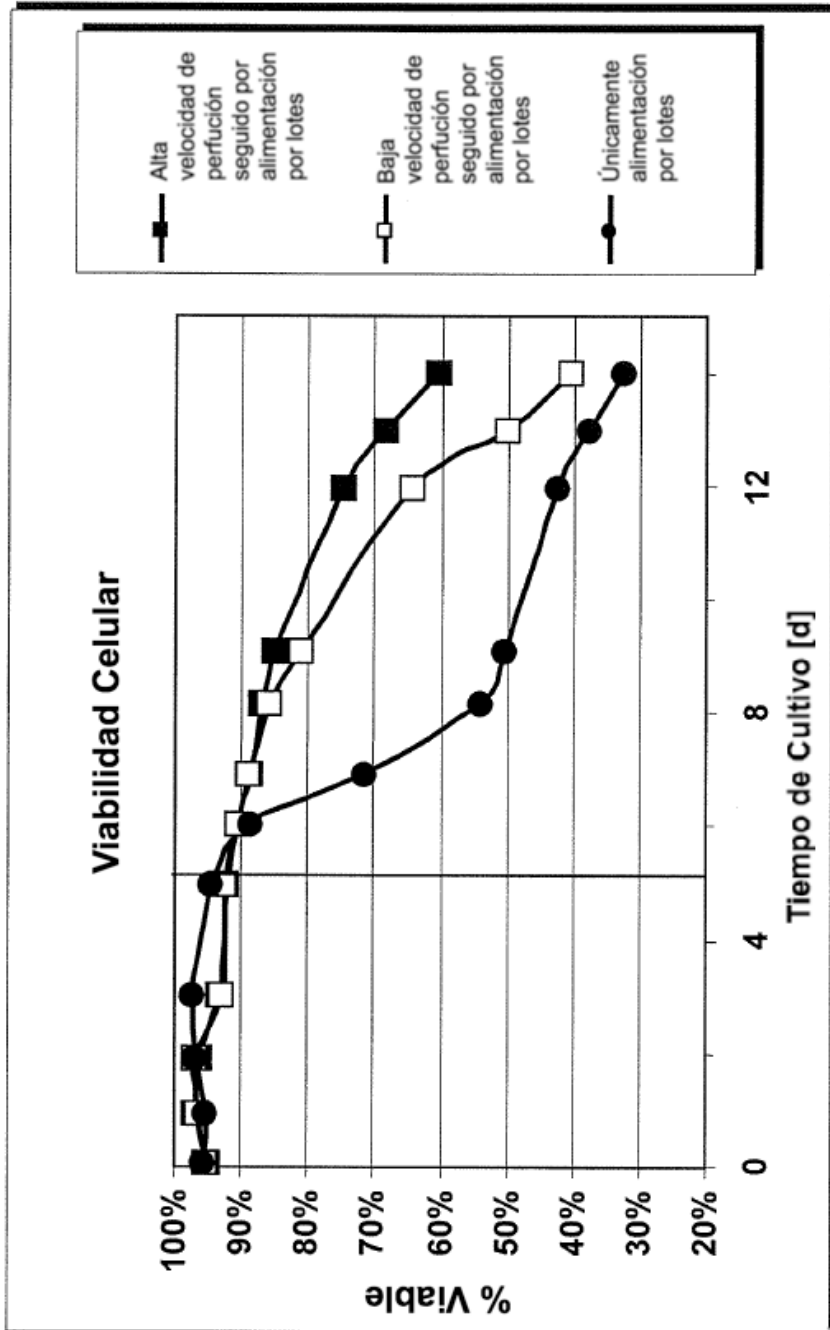


FIG. 4

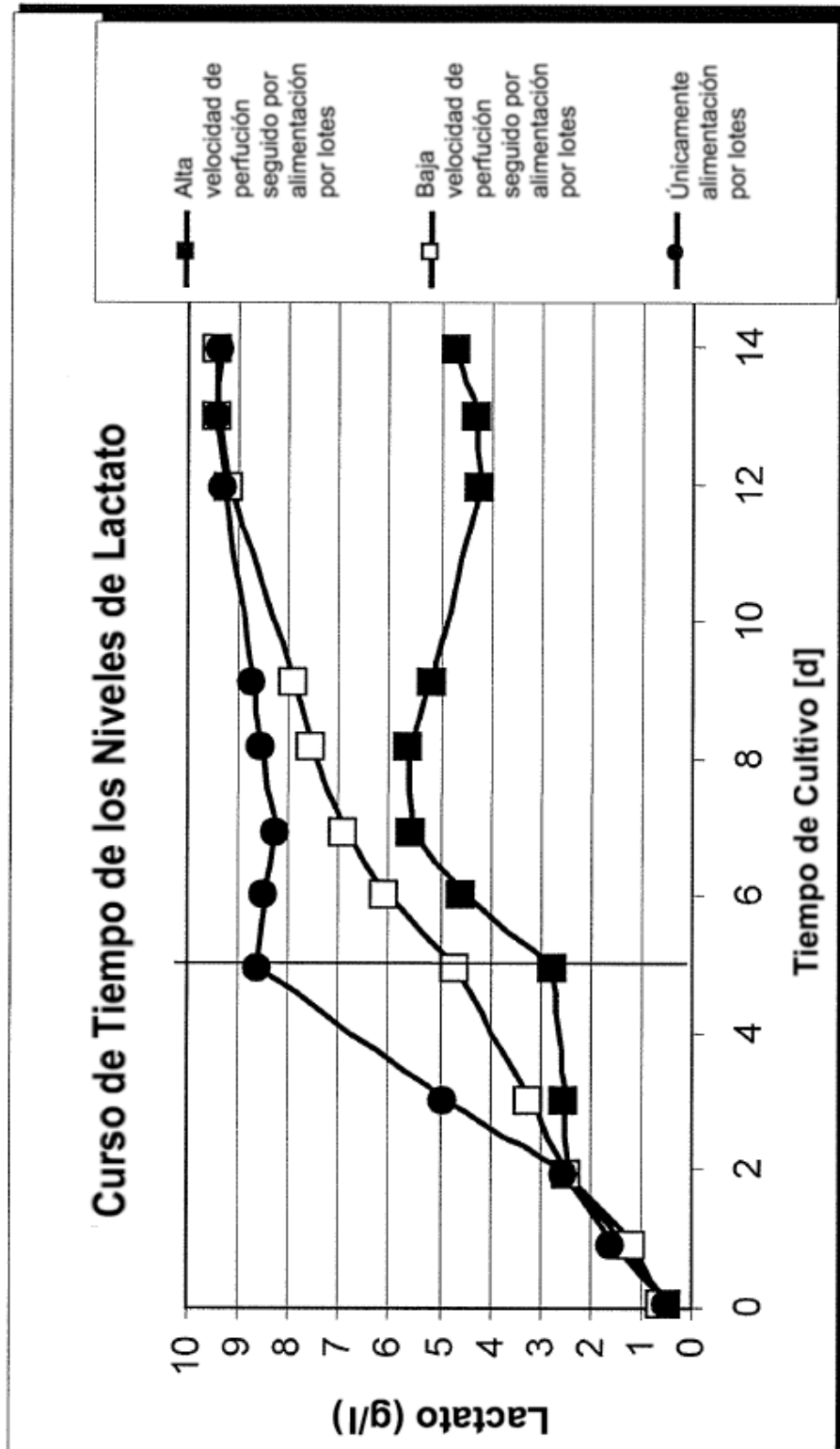


FIG. 5

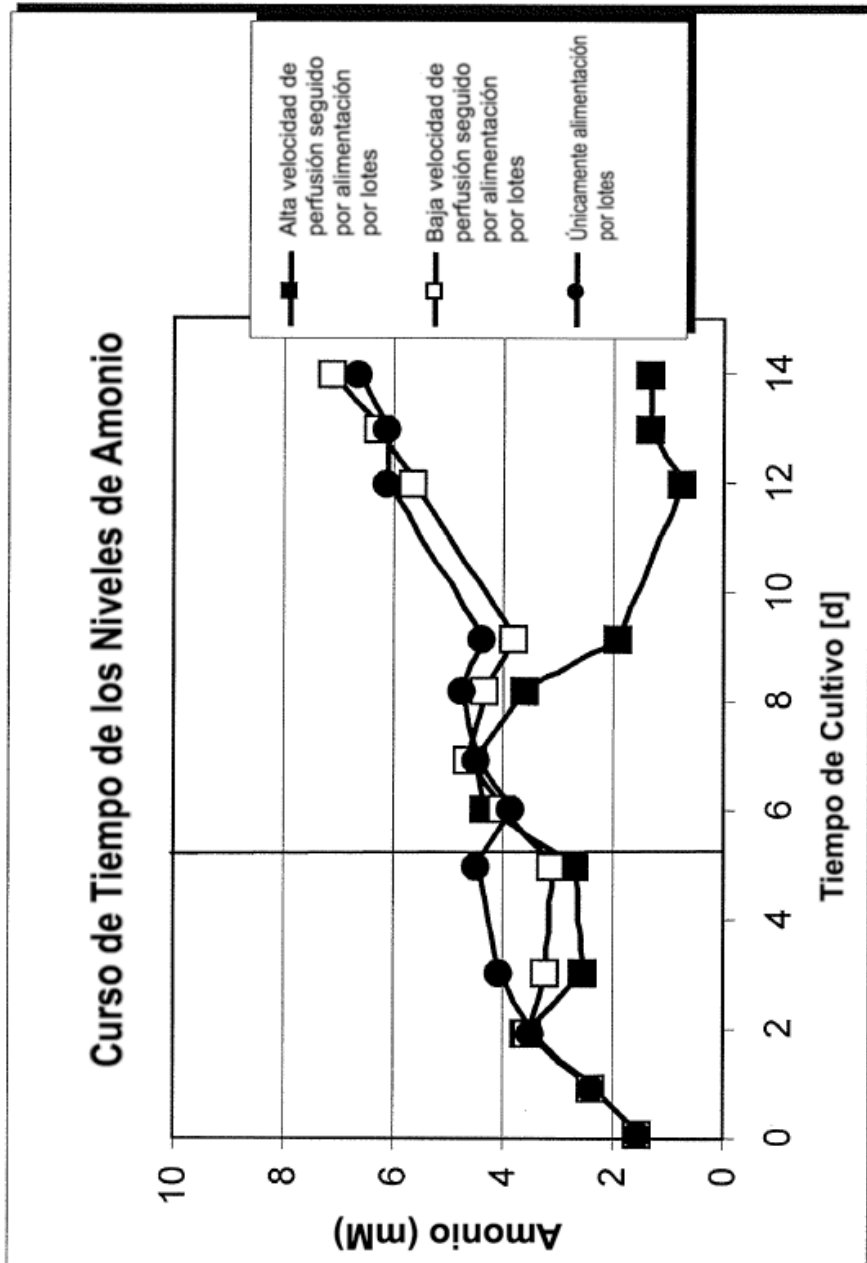


FIG. 6

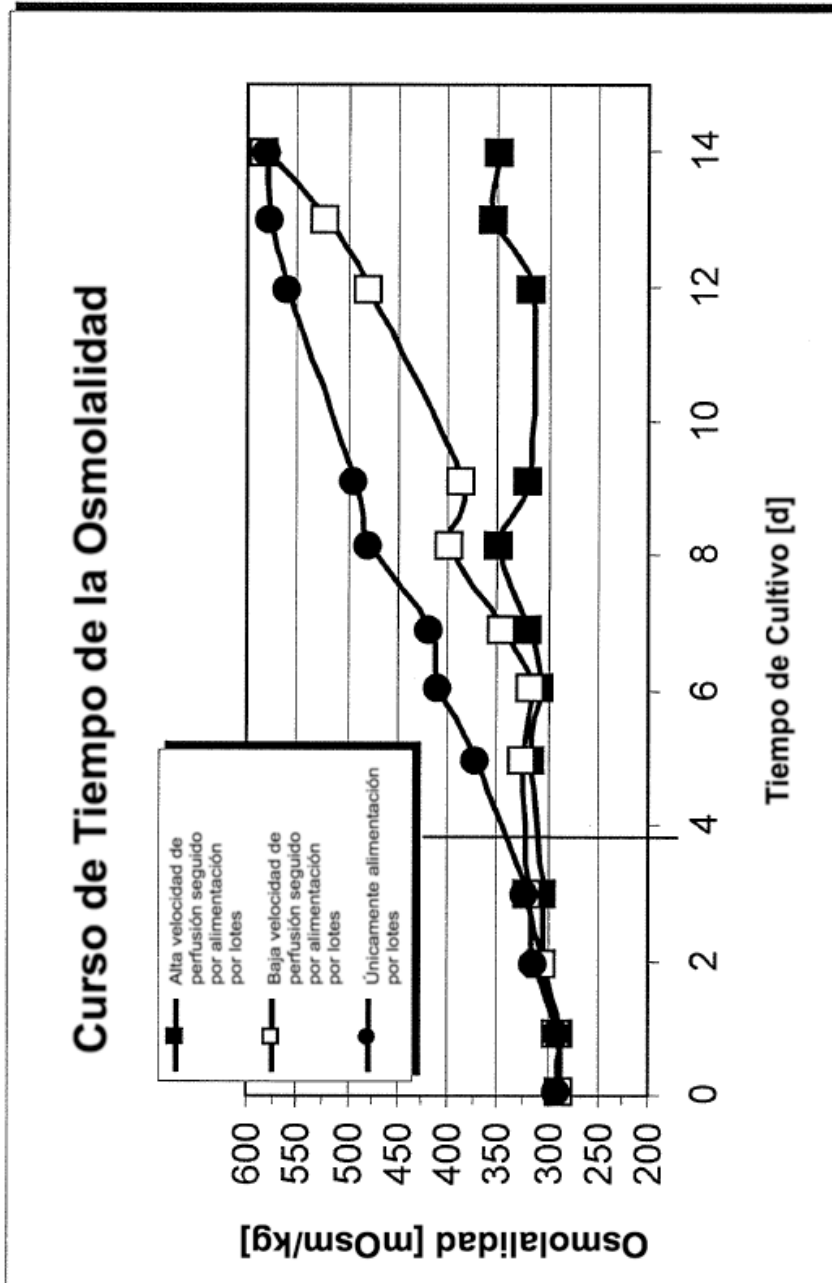


FIG. 7

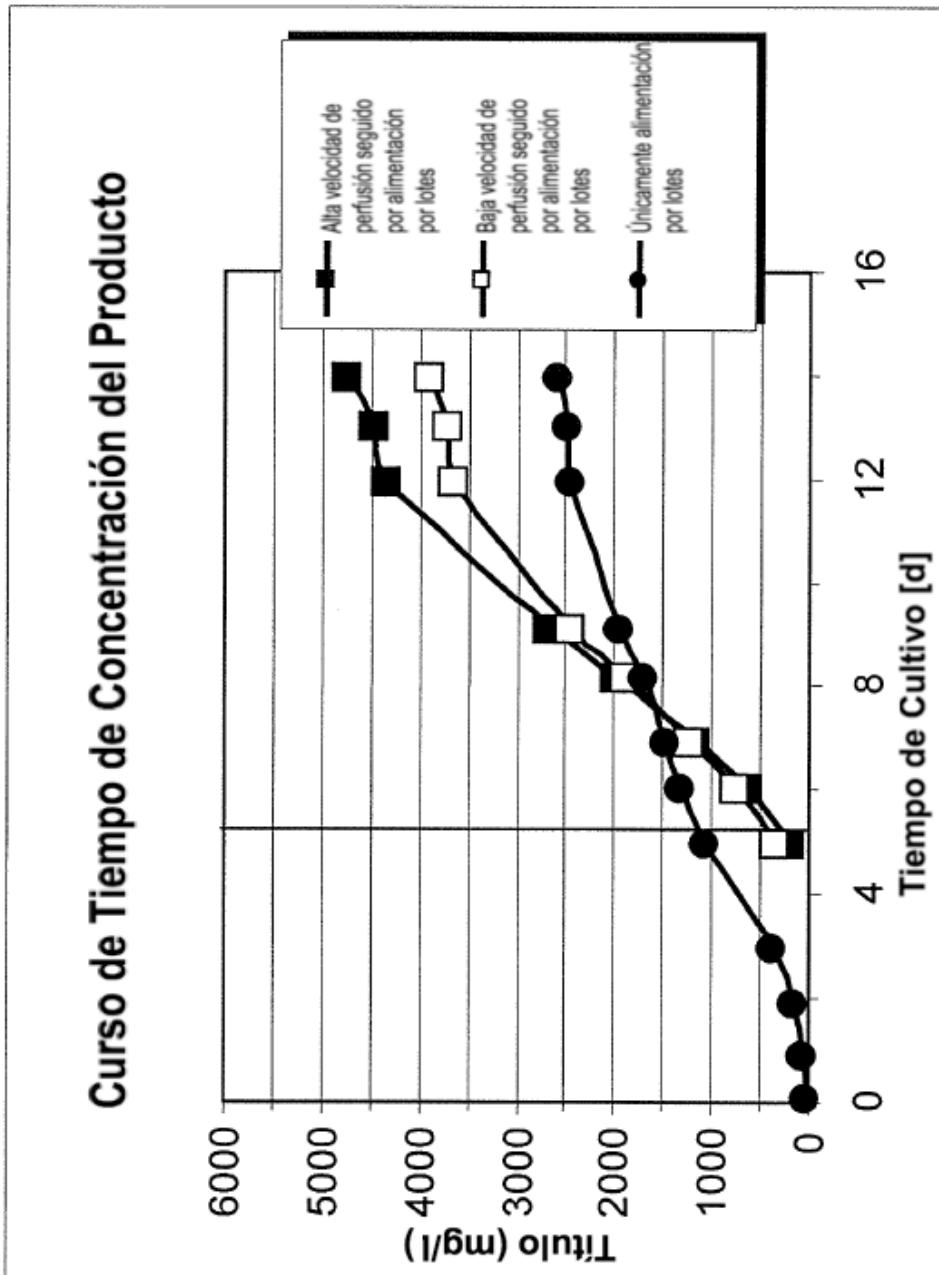


FIG. 8

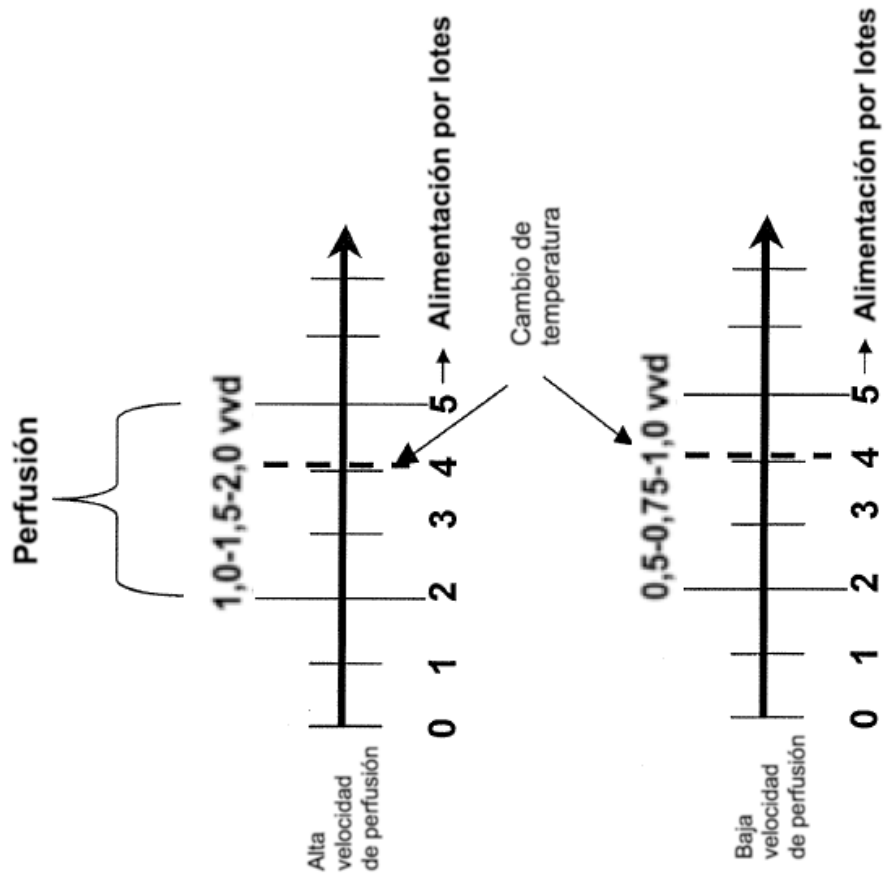


FIG. 9

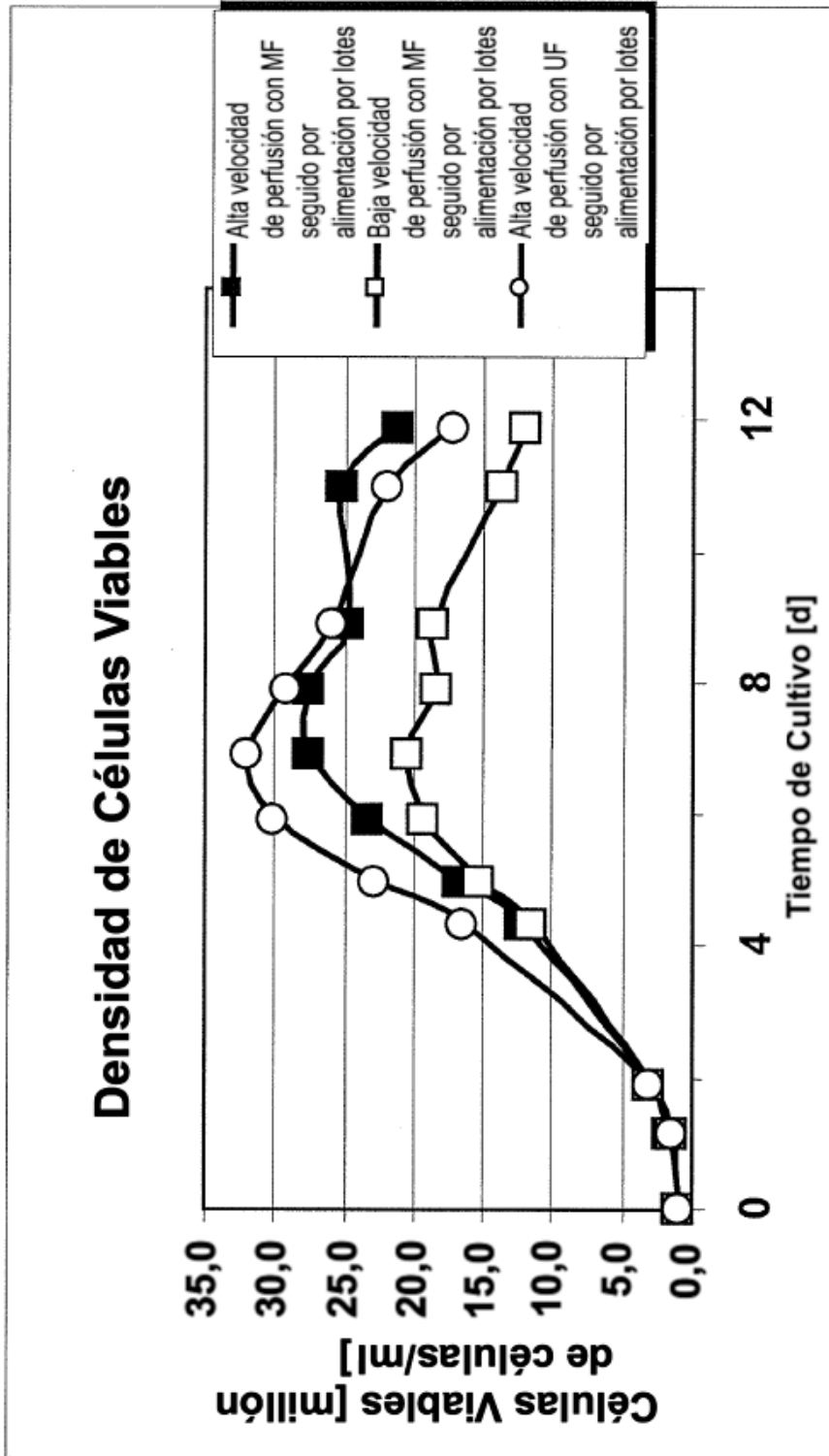


FIG. 10

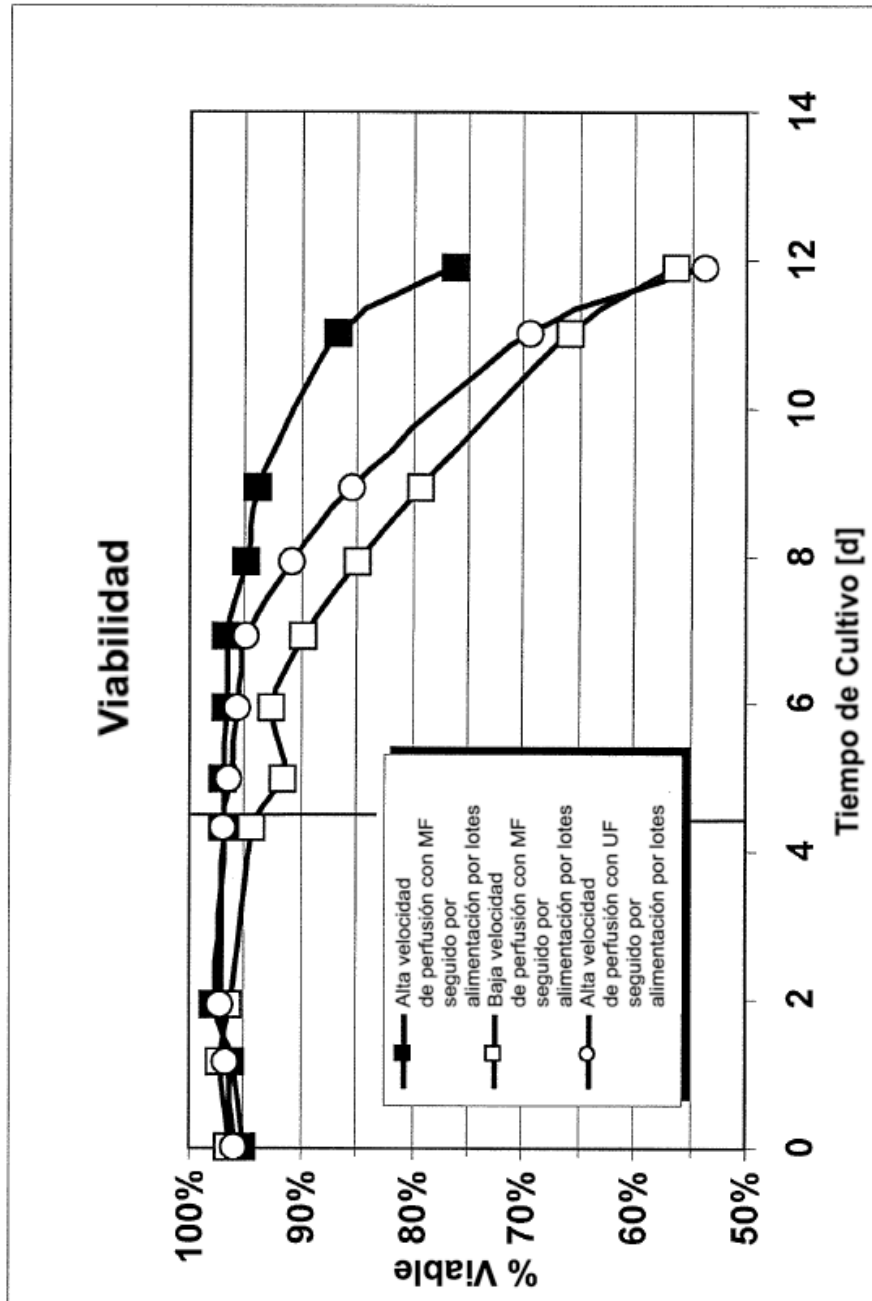


FIG. 11

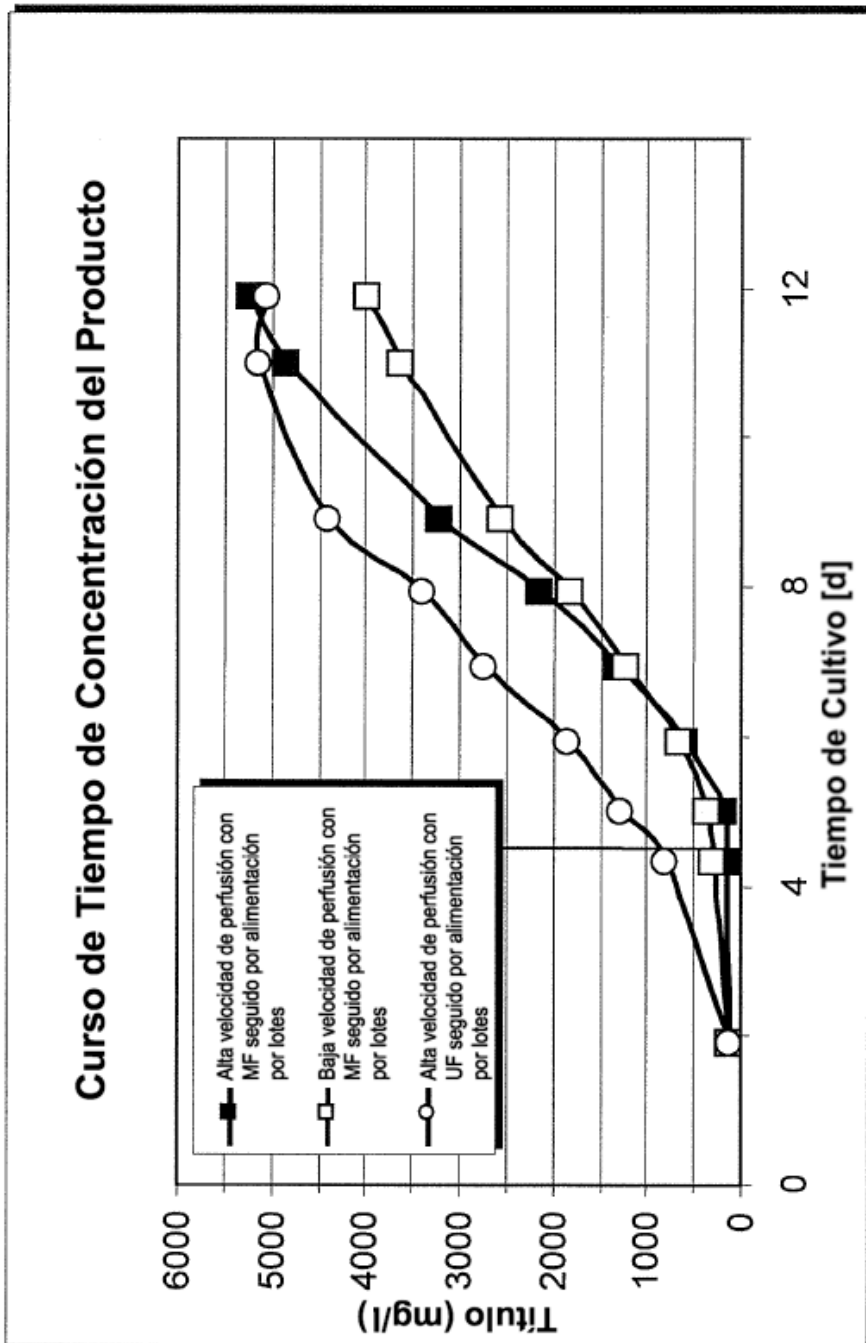


FIG. 12

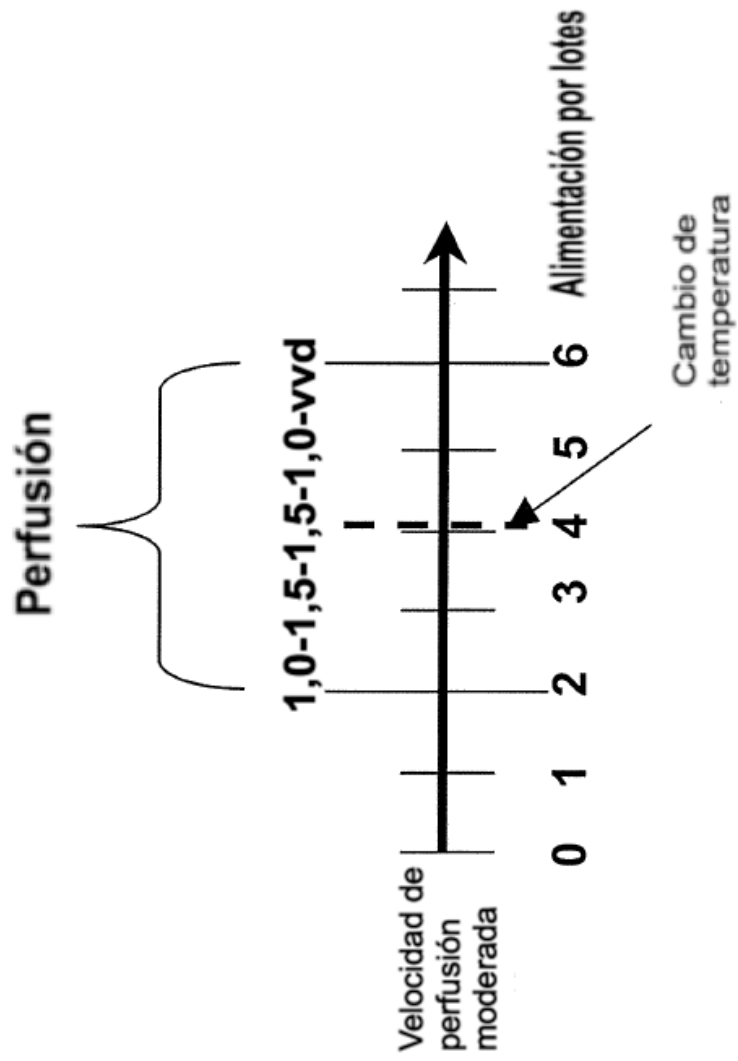


FIG. 13

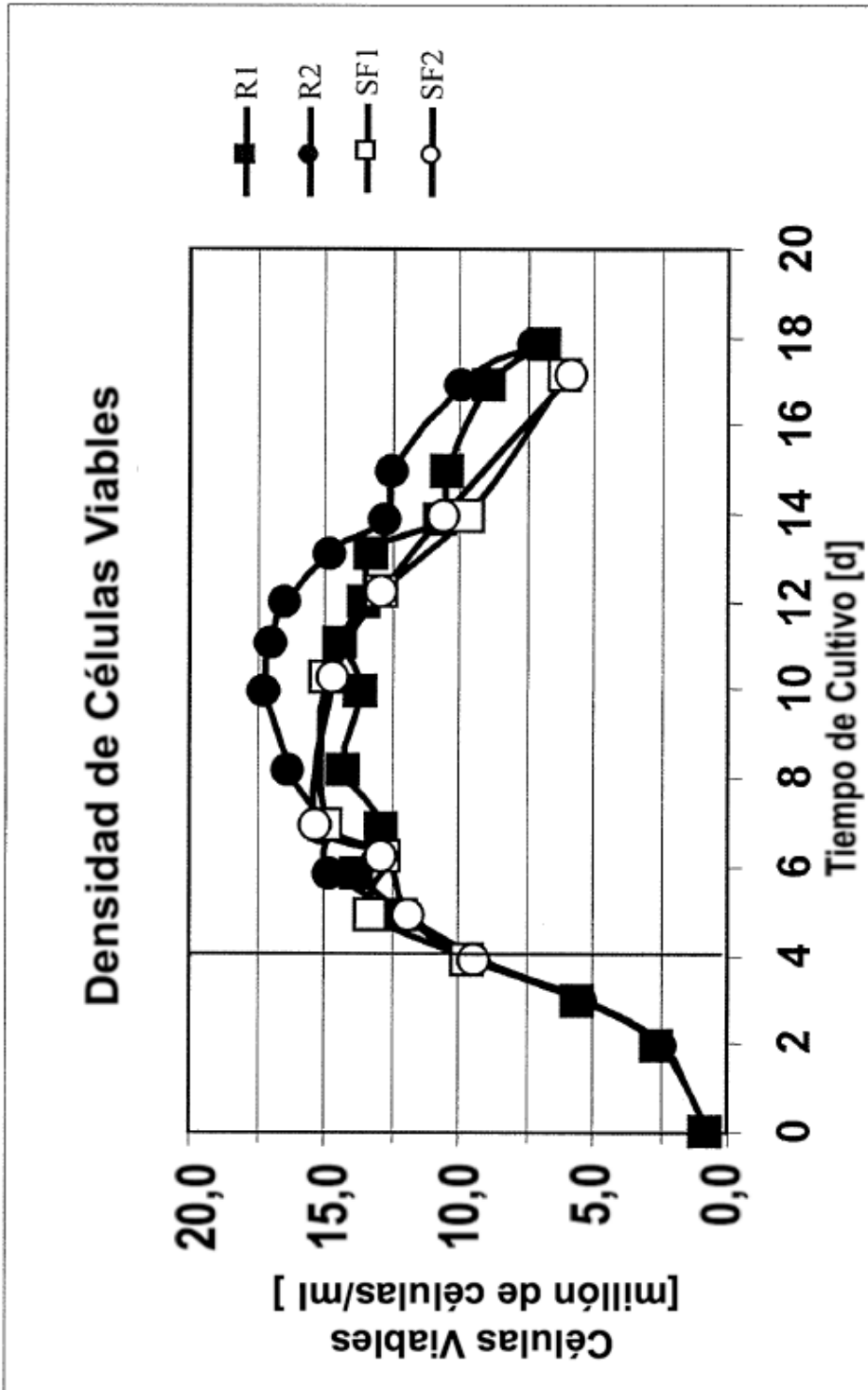


FIG. 14

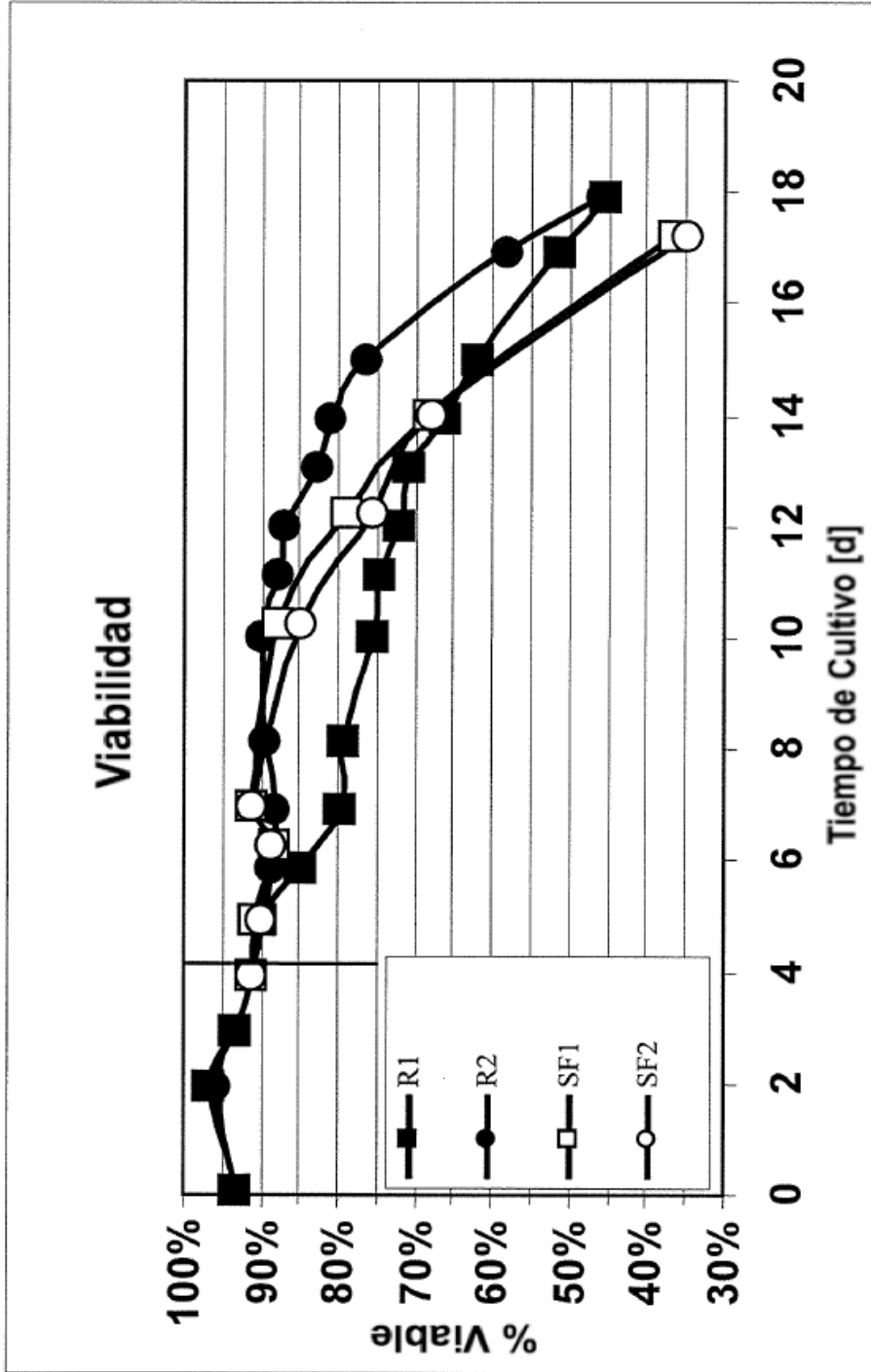


FIG. 15

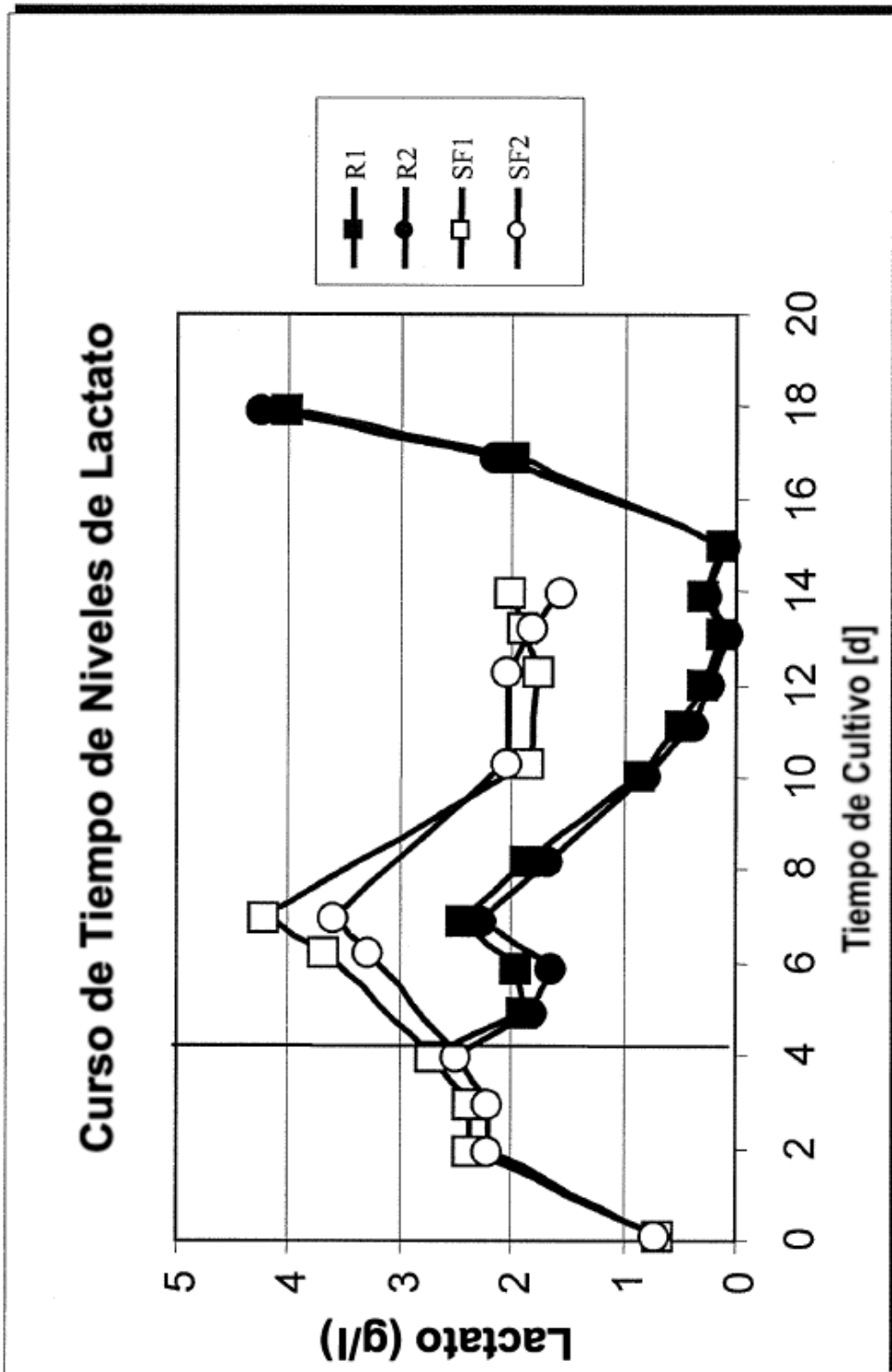


FIG. 16

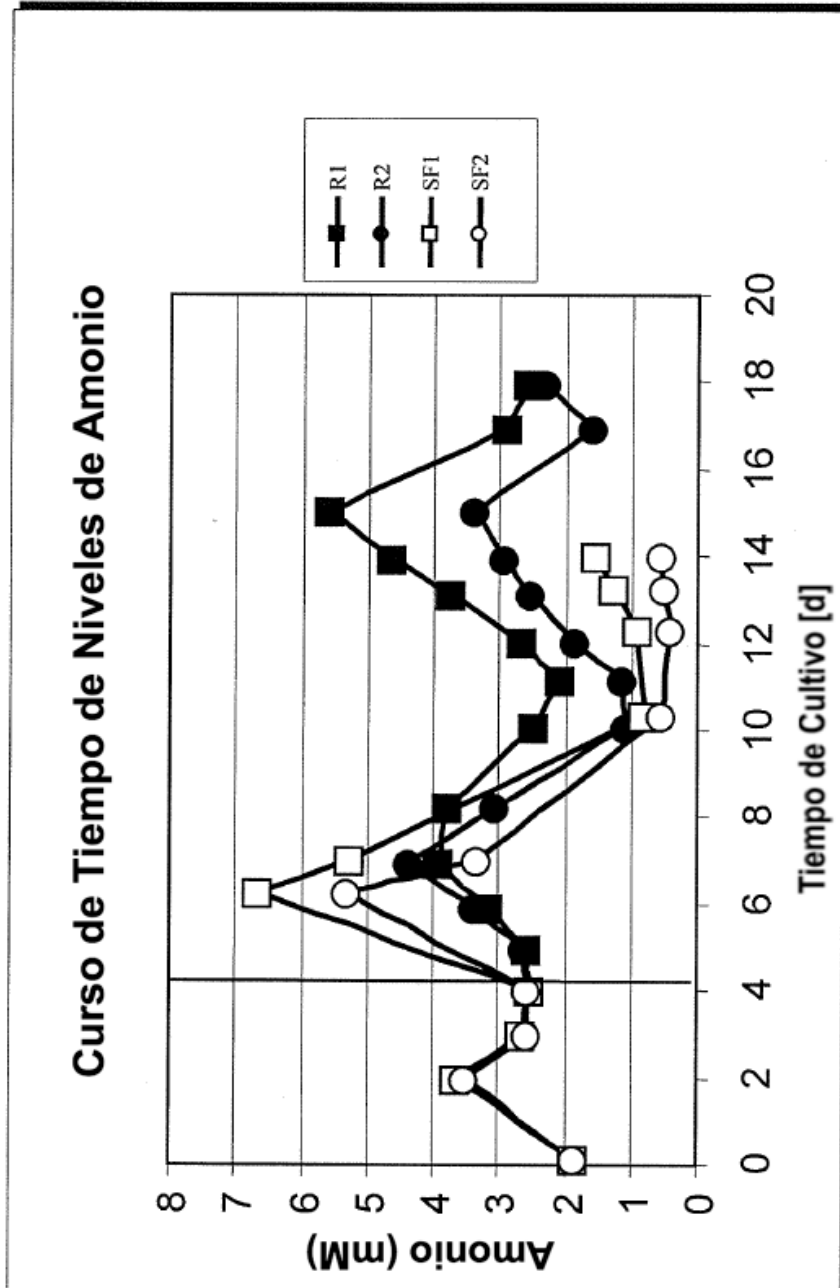


FIG. 17

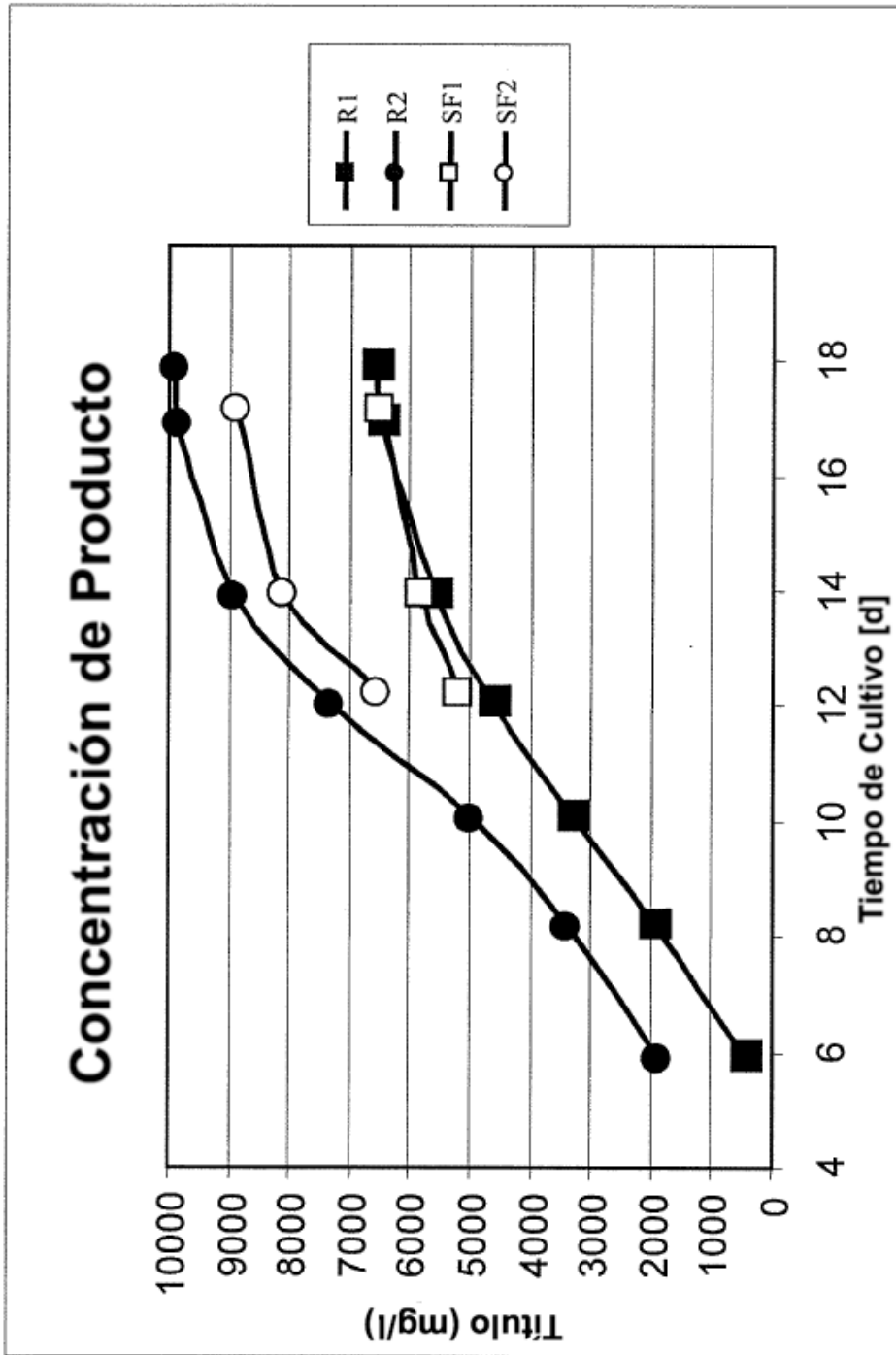


FIG. 18