

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 206**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2010 PCT/EP2010/061191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11012725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10737916 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2459697**

54 Título: **Método de producción de un polipéptido o virus de interés en un cultivo celular continuo**

30 Prioridad:

31.07.2009 US 230313 P

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

22.03.2019

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

GRILLBERGER, LEOPOLD;

REITER, MANFRED y

FLEISCHANDERL, DANIEL

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 705 206 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

Método de producción de un polipéptido o virus de interés en un cultivo celular continuo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una estrategia de cultivo celular continuo para la producción de polipéptidos o virus de interés en cultivos celulares de mamíferos. La estrategia de cultivo celular continuo que se describe en la presente combina las ventajas de las tecnologías de cultivo en perfusión y en quimiostato.

10

Antecedentes de la invención

La capacidad de producir un polipéptido o virus de interés es cada vez más importante para la industria biotecnológica. Durante las dos últimas décadas, los avances en biotecnología despertaron el interés en numerosos polipéptidos y virus que tienen un uso terapéutico potencial como vacunas y productos farmacéuticos. La producción a gran escala generalmente implica la producción recombinante del polipéptido o virus de interés, por ejemplo, en células de bacterias, levaduras, insectos, mamíferos, o de otro tipo. La producción de polipéptidos o virus de interés en cultivos de mamíferos, en particular, tiene ventajas sobre la producción en bacterias u otros hospederos microbianos inferiores debido a la capacidad de las células de mamíferos para los procesos post-traducción para estructuras complejas de proteínas, a través, por ejemplo, del plegado y glicosilación dependientes de disulfuro.

20

Las células de mamíferos se propagan generalmente *in vitro* en uno de dos modos: como células independientes de anclaje que crecen libremente en suspensión en todo el volumen del cultivo, o como células dependientes de anclaje que requieren adhesión a un sustrato sólido para su propagación (es decir, crecimiento celular de tipo monocapa). Se han desarrollado sistemas microportadores para dar cabida a ambos tipos de crecimiento. Por ejemplo, pueden propagarse células dependientes de anclaje en sistemas de microportadores que comprenden pequeñas partículas sólidas que se suspenden en el medio de cultivo mediante agitación lenta. Este sistema permite que las células dependientes de anclaje se fijen a la superficie de las partículas en suspensión, y crezcan hasta la confluencia, mientras que los microportadores permanecen suspendidos en el medio de cultivo. Alternativamente, pueden usarse microportadores macroporosos para contener células independientes de anclaje en biorreactores, por ejemplo, mediante la adhesión inespecífica de las células a la superficie de dichos microportadores. Los cultivos de microportadores en suspensión ya sea de células independientes de anclaje o de células dependientes de anclaje son el medio que más se usa para la producción a gran escala de células y productos celulares.

25

30

35

40

45

Los cultivos en suspensión a gran escala pueden funcionar en un sistema cerrado, por ejemplo, como los sistemas cerrados por lote o lote alimentado, que son más sencillos de operar y escalar que los sistemas abiertos. Típicamente, en un sistema cerrado, las células, productos y/o productos de desecho no se eliminan (aunque puede adicionarse aire (por ejemplo, oxígeno) y eliminar CO₂ mediante aireación). El perfil típico de crecimiento visto en los sistemas de crecimiento por lote involucra una fase de latencia, seguida de una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de declive. En dichos sistemas de lotes, el entorno cambia continuamente, ya que los nutrientes se agotan y se acumulan metabolitos. En un sistema de lote alimentado, los nutrientes esenciales se introducen continuamente en el sistema para prolongar el ciclo de crecimiento, aunque las células, productos, subproductos y productos de desecho, lo que incluye los metabolitos tóxicos, no se eliminan. En consecuencia, la producción de un polipéptido o virus de interés mediante sistemas de lote o lote alimentado se limita por la acumulación de células y sustancias nocivas, tales como metabolitos tóxicos.

50

55

Los cultivos en suspensión a gran escala también pueden funcionar en un sistema abierto, por ejemplo, un sistema en perfusión o un sistema de quimiostato. En un sistema de perfusión, un medio fresco se perfunde a través del cultivo, mientras que las células se conservan con una variedad de dispositivos de retención celular. Los tipos de dispositivos de retención celular incluyen, por ejemplo, microportadores, filtros giratorios de malla fina, fibras huecas, filtros de membrana de placa plana, tubos de sedimentación, dispositivos ultrasónicos de retención celular, y similares. Típicamente, los cultivos en perfusión se diseñan para aumentar las densidades celulares al máximo, con dispositivos de retención celular diseñados y operados para tener una tasa de retención celular de >90 %. Dichos cultivos alcanzan típicamente densidades celulares de $>2 \times 10^7$, que pueden tener que suministrarse con una alimentación de medio de cultivo celular a una tasa de dilución mayor de aproximadamente $2,0 \text{ d}^{-1}$. Sin embargo, el estado de equilibrio del sistema es difícil de mantener debido al aumento incontrolado de la biomasa, y las condiciones de producción consistentes son difíciles de lograr y/o controlar.

60

65

Los sistemas de quimiostato funcionan con una entrada continua de medios y una salida de células y productos. En el sistema de quimiostato, no hay ningún dispositivo de retención celular, de manera que la concentración de células en el biorreactor y la concentración de células en el sobrenadante cosechado del biorreactor son idénticas sustancialmente. Típicamente, el medio de cultivo se introduce al reactor a una tasa predeterminada y constante, lo que mantiene una tasa de dilución baja del cultivo (típicamente $0,3 \text{ d}^{-1}$ a $0,8 \text{ d}^{-1}$). Para evitar el lavado de las células, se elige generalmente una tasa de dilución menor que, a veces igual a, la tasa de crecimiento específica máxima de las células. Los líquidos del cultivo que contienen células, productos celulares, subproductos, productos de desecho, etcétera, se eliminan a la misma tasa, o sustancialmente la misma tasa. Los sistemas de quimiostato suelen

proporcionar un grado alto de control, ya que los cultivos pueden equilibrarse, es decir, llegar a un estado de equilibrio a una tasa de crecimiento específica equivalente a la tasa de dilución. Este equilibrio es determinante de la concentración de las células, metabolitos, productos de desecho, productos expresados (por ejemplo, proteínas secretadas), etcétera. Las tasas de crecimiento específicas en sistemas de quimiostato son más bajas típicamente que la tasa de crecimiento máxima debido a al menos un sustrato limitante. En algunos sistemas, sin embargo, los estados estacionarios pueden mantenerse a tasas de crecimiento máxima mediante el control y el ajuste de la biomasa, por ejemplo, en sistemas turbidostato de cultivos en quimiostato. Preferentemente, dichos cultivos en quimiostato contienen una distribución homogénea de células (por ejemplo, suspensiones de células individuales) en todo el biorreactor. En comparación con el sistema de perfusión, sin embargo, el sistema de quimiostato resulta típicamente en densidades celulares menores. Por otra parte, una desventaja inherente de los sistemas de quimiostato es que la alimentación de las células no puede controlarse independientemente de la densidad celular en el sistema del biorreactor.

Los cultivos de células en suspensión para la producción de proteínas recombinantes en medio libre de suero y/o definido químicamente también se limitan en que el medio libre de suero y/o definido químicamente soporta típicamente tasas de crecimiento más lentas en comparación con las células que crecen en medio que contiene suero. La disminución de las tasas de crecimiento en el cultivo significa una disminución de la producción del polipéptido o virus de interés.

En consecuencia, se mantiene la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo celular capaces de mantener la producción de un polipéptido o virus de interés, especialmente cultivos que puedan mantenerse durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, para satisfacer las demandas de aumento de la producción a bajo costo. La presente invención proporciona métodos dirigidos a satisfacer esta y otras necesidades.

Resumen

La presente invención se define, *inter alia*, por los elementos siguientes:

1. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular continuo, dicho método comprende

(a) cultivar células de mamíferos que expresan el polipéptido en un sistema de cultivo celular continuo, en donde dicho sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular y tiene una tasa de dilución (D) de menos que 2 d^{-1} y una densidad celular de menos de 2×10^7 células/ml; y

(b) recuperar dicho polipéptido del medio que se elimina de dicho sistema de cultivo celular;

en donde dichas células se modifican genéticamente para expresar una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13 (ADAMTS13).

2. El método de conformidad con el elemento 1, en donde dicho dispositivo de retención celular produce una tasa de retención celular de menos de 90 %.

3. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dicha tasa de dilución está entre $0,1$ y $1,0 \text{ d}^{-1}$.

4. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dicha densidad celular es menos de 1×10^7 células/ml.

5. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dicho sistema de cultivo celular tiene una relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica (D/μ) entre 1,2 y 5.

6. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dicho sistema de cultivo celular tiene una tasa de crecimiento específica de entre $0,2 \text{ d}^{-1}$ y $0,8 \text{ d}^{-1}$.

7. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular por más de 20 días.

8. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular por más de 40 días.

9. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular por más de 50 días.

10. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dicha tasa de dilución y dicha densidad celular se mantienen por al menos 80 % del tiempo en que las células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular.

11. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dicho dispositivo de retención celular comprende un microportador macroporoso.
- 5 12. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células se cultivan en un medio libre de suero.
13. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células se cultivan en al menos 250 l del medio.
- 10 14. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células son células independientes de anclaje.
15. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, que comprende además, antes de la etapa de cultivo, precultivar las células en suspensión.
- 15 16. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde dichas células son células CHO.
17. El método de conformidad con el elemento 1 para la producción de una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13 (ADAMTS13) en un cultivo celular continuo, el método comprende (a) cultivar células de mamíferos independientes de anclaje que expresan la proteína ADAMTS13 recombinante en un sistema de cultivo celular continuo, donde el sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular que tiene una tasa de retención celular de menos de 90 % y tiene una tasa de dilución (D) entre 0,1 y 1,0 d⁻¹ y una densidad celular de menos de 1 X 10⁷ células/ml; y (b) recuperar la proteína ADAMTS13 del medio eliminado del sistema de cultivo celular.
- 20 25 18. El método de conformidad con cualquiera de los elementos anteriores, en donde la tasa de dilución se mantiene a menos de aproximadamente 1,0 d⁻¹, menos de aproximadamente 0,9 d⁻¹, menos de aproximadamente 0,8 d⁻¹, menos de aproximadamente 0,7 d⁻¹, o menos de aproximadamente 0,6 d⁻¹.
- 30 En la presente se describe un cultivo celular continuo para la producción de polipéptidos y/o virus de interés en células de mamíferos, particularmente células independientes de anclaje. El método de cultivo celular continuo descrito en la presente combina las ventajas de los sistemas abiertos de perfusión y sistemas abiertos de quimiostato y permite mayor densidad celular y crecimiento celular, particularmente en los medios libres de suero o definidos químicamente. El aumento de la densidad celular y el crecimiento celular proporcionan el aumento de los rendimientos de las proteínas y/o virus de interés al tiempo que permite un mayor control sobre los parámetros del proceso.
- 35 40 En consecuencia, un aspecto de la descripción se refiere a un método para la producción de un polipéptido y/o virus de interés en un cultivo celular continuo, el método comprende cultivar células de mamíferos que expresan el polipéptido y/o virus en un sistema de cultivo celular continuo, en donde el sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular y tiene una tasa de dilución de menos de aproximadamente 2 d⁻¹ y una densidad celular de menos de aproximadamente 2X10⁷ células/ml; y recuperar el polipéptido y/o virus de interés del medio eliminado del sistema de cultivo celular. En algunas modalidades, las células se modifican genéticamente para expresar de manera recombinante el polipéptido y/o virus de interés.
- 45 50 En algunas modalidades, el dispositivo de retención celular se elige para que tenga menor capacidad de retener las células que los dispositivos de retención celular típicos. En algunas modalidades, el dispositivo de retención celular produce una tasa de retención celular de menos de aproximadamente 90 %, menos de aproximadamente 85 %, menos de aproximadamente 80 %, o menos de aproximadamente 75 %. En algunas modalidades, el dispositivo de retención celular comprende un microportador macroporoso, por ejemplo, una partícula basada en celulosa.
- 55 La tasa de dilución y la densidad celular se mantienen preferentemente en valores o intervalos elegidos. En algunas modalidades, la tasa de dilución es menos de aproximadamente 1 d⁻¹, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1,0 d⁻¹. En algunas modalidades, la densidad celular es menos de aproximadamente 1x10⁷ células/ml. En algunas modalidades, la relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica (D/μ) del sistema de cultivo celular se mantiene en un valor o intervalo elegido. En algunas modalidades preferidas, el sistema de cultivo celular tiene una relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica mayor que aproximadamente 1, por ejemplo, entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 5,0, o entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 3. En algunas modalidades, la tasa de crecimiento específica se mantiene entre 0,2 d⁻¹ y 0,8
- 60 65 Una ventaja de ciertas modalidades del sistema de cultivo celular continuo descrito en la presente es que el cultivo puede mantenerse durante un período prolongado de tiempo. En algunas modalidades, por ejemplo, la tasa de dilución y/o la densidad celular se mantienen durante al menos aproximadamente 80 % del tiempo en que las células se cultivan en el sistema de cultivo celular continuo. En algunas modalidades, las células se cultivan en el sistema de cultivo celular por más de 20 días, preferentemente más de 40 días, y con mayor preferencia, más de 50 días, por ejemplo, lo que permite una mayor producción del polipéptido y/o virus de interés, potencialmente a bajo costo.

Otra ventaja de ciertas modalidades del sistema de cultivo celular continuo es un aumento en la productividad volumétrica debido a una densidad celular superior, en comparación con un cultivo en quimioestado típico. Por ejemplo, en modalidades preferidas particulares, la productividad volumétrica aumenta en 70 %, 90 %, o más. Aún otra ventaja de ciertas modalidades del sistema de cultivo celular continuo es una actividad específica mejorada de la proteína que se recupera, debido, por ejemplo, al tiempo de permanencia reducido en la unidad de cultivo, lo cual puede tener un efecto beneficioso en la estabilidad, estructura, y/o función de la proteína.

Otra ventaja de ciertas modalidades del sistema de cultivo celular continuo descrito en la presente es que el sistema es susceptible de escalarse para producciones a gran escala. Esto es, al permitir el aumento de la densidad celular y/o el crecimiento de las células, en comparación con los sistemas estándar de cultivo en quimioestado, el sistema de cultivo celular continuo descrito en la presente permite la producción a escala comercial de un polipéptido y/o virus de interés. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células se cultivan en al menos aproximadamente 250 l de medio, por ejemplo, al menos aproximadamente 500 l, o al menos aproximadamente 1000 l de medio. En algunas modalidades preferidas, las células se cultivan en medio libre de suero y/o medio definido químicamente.

En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de precultivo, por ejemplo, para adaptar las células para la producción del polipéptido y/o virus de interés en un sistema de cultivo celular continuo como se describe en la presente. Así, en algunas modalidades preferidas, el método comprende, además, antes de la etapa de cultivo, precultivar las células en suspensión, por ejemplo, hasta que el cultivo alcance un volumen apropiado.

En una modalidad particular, el polipéptido de interés es una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13 (ADAMTS13). En algunas modalidades, las células de mamífero son las células CHO, por ejemplo, células CHO modificadas genéticamente para expresar la proteína ADAMTS13. En una modalidad particular, se proporciona un método para la producción de un polipéptido y/o virus de interés en un cultivo celular continuo, el método comprende: (a) cultivar las células de mamífero independientes de anclaje que expresan el polipéptido y/o virus de interés en un sistema de cultivo celular continuo, donde el sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular que tiene una tasa de retención celular de menos de 90 %, y tiene una tasa de dilución (D) entre 0,1 y 1,0 d⁻¹ y una densidad celular de menos de 1 X 10⁷ células/ml, y (b) recuperar el polipéptido y/o virus de interés del medio que se elimina del sistema de cultivo celular.

En otra modalidad particular, se proporciona un método para la producción de un polipéptido y/o virus de interés en un cultivo celular continuo, el método comprende: (a) cultivar las células CHO independientes de anclaje que expresan el polipéptido y/o virus de interés en un sistema de cultivo celular continuo, donde el sistema de cultivo celular comprende un microportador macroporoso como dispositivo de retención celular que tiene una tasa de retención celular de menos de 90 %, y tiene una tasa de dilución (D) entre 0,1 y 1,0 d⁻¹ y una densidad celular de menos de 1 X 10⁷ células/ml, y (b) recuperar el polipéptido y/o virus de interés del medio que se elimina del sistema de cultivo celular.

Aún en otra modalidad particular, se proporciona un método para la producción de ADAMTS13 en un cultivo celular continuo, el método comprende (a) cultivar las células de mamífero independientes de anclaje que expresan la proteína recombinante ADAMTS13 en un sistema de cultivo celular continuo, donde el sistema de cultivo celular comprende un microportador macroporoso como dispositivo de retención celular que tiene una tasa de retención celular de menos de 90 %, y tiene una tasa de dilución (D) entre 0,1 y 1,0 d⁻¹ y una densidad celular de menos de 1 X 10⁷ células/ml, y (b) recuperar el ADAMTS13 del medio que se elimina del sistema de cultivo celular.

Aún en otra modalidad particular, se proporciona un método para la producción de un polipéptido y/o virus de interés en un cultivo celular continuo, el método comprende (a) cultivar las células de mamíferos independientes de anclaje que expresan el polipéptido y/o virus de interés en un sistema de cultivo celular continuo, donde el sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular que tiene una tasa de retención celular de menos de 90 %, y tiene una tasa de dilución (D) entre 0,1 y 1,0 d⁻¹, una densidad celular de menos de 1 X 10⁷ células/ml, y una relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica (D/μ) entre 1,2 y 5, y (b) recuperar el polipéptido y/o virus de interés del medio que se elimina del sistema de cultivo celular; y además donde las células se cultivan en el sistema de cultivo celular durante más de 50 días, y la tasa de dilución, la densidad celular, y la relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica se mantienen cada una al menos 80 % del tiempo en que las células se cultivan en el sistema de cultivo celular.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido y/o virus de interés producido de acuerdo con los métodos descritos en la presente, por ejemplo, una composición que comprende una proteína recombinante ADAMTS13 producida en consecuencia. Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a más abajo.

Descripción detallada

El sistema de cultivo celular continuo como se describe en la presente combina algunas de las ventajas del cultivo en perfusión y del cultivo en quimioestado de células de mamíferos. Como se describió anteriormente, los sistemas de cultivo en perfusión funcionan mediante la perfusión de medio fresco a través del cultivo de células, mientras las

células se retienen mediante el uso de un dispositivo de retención celular; los sistemas de quimiostato funcionan mediante la entrada continua de medio y la salida de células y productos, sin un dispositivo de retención celular.

Como se usa en la presente descripción "perfusión" se refiere al flujo continuo de una solución fisiológica de nutrientes a una tasa constante, a través o sobre una población de células. Como los sistemas de perfusión generalmente implican la retención de las células dentro de la unidad de cultivo, los cultivos en perfusión se caracterizan por tener densidades de células relativamente altas, pero las condiciones de cultivo son difíciles de mantener y controlar. Además, dado que las células crecen y se mantienen dentro de la unidad de cultivo a densidades altas, la tasa de crecimiento típicamente disminuye continuamente con el tiempo, lo que da lugar a la fase exponencial tardía o incluso estacionaria, del crecimiento celular. Por el contrario, "quimiostato", como se usa en la presente descripción, se refiere a la entrada continua de una solución fisiológica de nutrientes, junto con una salida continua de células y otros productos con los medios que se eliminan, a través de un cultivo de células, por ejemplo, como en los sistemas de quimiostato. Sin embargo, debido a que las células se eliminan continuamente, el sistema de quimiostato típicamente sólo soporta densidades celulares menores.

La estrategia de cultivo continuo descrita en la presente descripción comprende, generalmente, cultivar las células de mamíferos, por ejemplo, células independientes de anclaje, que expresan un polipéptido y/o virus de interés durante una fase de producción, en un sistema de cultivo celular continuo. Por "células independientes de anclaje", se entiende células que se propagan libremente en suspensión en todo el volumen del cultivo, en lugar de adherirse o fijarse a un sustrato sólido durante la propagación. El sistema de cultivo celular continuo comprenderá un dispositivo de retención celular similar al que se usa en un sistema de perfusión, pero que permita la eliminación continua de una parte importante de las células, preferentemente de manera que se retenga un porcentaje menor de células que en el cultivo en perfusión. Por "dispositivo de retención celular" se entiende cualquier estructura capaz de retener las células, particularmente células independientes de anclaje, en una ubicación determinada durante el cultivo celular. Los ejemplos no limitantes incluyen microportadores, filtros giratorios de malla fina, fibras huecas, filtros de membrana de placas planas, tubos de sedimentación, dispositivos ultrasónicos de retención celular, y similares, que pueden retener las células independientes de anclaje en biorreactores. Los polipéptidos y/o virus de interés (por ejemplo, un polipéptido recombinante y/o virus recombinante) pueden recuperarse del sistema de cultivo celular, por ejemplo, del medio que se elimina del sistema de cultivo celular.

El método para la producción de un polipéptido y/o virus de interés (por ejemplo, un polipéptido recombinante y/o virus recombinante) descrito en la presente comprende un método de cultivo celular que proporciona un sistema de cultivo de tipo quimiostato y que usa un dispositivo de retención celular. El sistema comprende cultivar las células de mamíferos que expresan un polipéptido y/o virus de interés en un sistema de cultivo celular continuo con un dispositivo de retención celular. El papel del dispositivo de retención celular es evitar la eliminación del cultivo de una porción, preferentemente una porción sustancial, de las células viables durante la reposición del medio de cultivo gastado con un medio fresco. Un dispositivo de retención celular exitoso debe cumplir la mayor cantidad posible de los requisitos siguientes: (1) daño celular o efecto mínimo sobre el crecimiento celular y la productividad, (2) retención selectiva de células viables solamente (las células no viables se eliminan preferentemente del cultivo, ya que ellas liberan metabolitos tóxicos en el medio de cultivo), (3) funcionamiento ininterrumpido durante largos períodos de cultivo, (4) bajo consumo de energía, (5) simplicidad de operación y mantenimiento (6), capacidades de escalado para unidades de producción a gran escala, (7) estructura compacta, y (8) eficacia en función de los costos.

En modalidades particularmente preferidas, el dispositivo de retención celular que se usa permite la retención parcial de las células. Los dispositivos de retención celular y/o métodos se conocen bien en la técnica. Muchos se basan en las técnicas de sedimentación, centrifugación y/o filtración convencionales. Los ejemplos no limitantes de los dispositivos de retención celular incluyen microportadores, filtros giratorios, tales como filtros giratorios de malla fina, fibras huecas, filtros de membrana de placas planas, tubos de sedimentación, dispositivos ultrasónicos de retención celular, sedimentadores por gravedad, centrífugas, filtros de células acústicos, separadores de células en base a dielectroforesis, y similares (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,019,512; 5,626,734).

De acuerdo con una modalidad del sistema de cultivo descrito en la presente, los microportadores pueden usarse como dispositivo de retención celular. El microportador puede actuar como una superficie escalable de bajo costo en el que las células independientes de anclaje pueden inmovilizarse para favorecer la retención celular. Como se usa en la presente descripción, "microportadores" se refiere a partículas suficientemente pequeñas como para que se usen en cultivos en suspensión, preferentemente con una tasa de agitación que no cause un daño de cizalladura significativo a las células. Los microportadores pueden ser sólidos, porosos, o tener un núcleo sólido con un recubrimiento poroso. Los microportadores pueden ser, por ejemplo, sin limitación, en base a celulosa o dextrano, y sus superficies (superficie exterior e interior en el caso de los portadores porosos) pueden cargarse positivamente. Pueden encontrarse más detalles sobre los microportadores, por ejemplo, en el documento WO 02/29083.

En una modalidad, el microportador es un microportador macroporoso. Como se usa en la presente descripción, "microportadores macroporosos" se refiere a partículas, por ejemplo, partículas a base de celulosa, las cuales tienen las propiedades siguientes: (a) son suficientemente pequeñas como para permitir el uso en cultivos en suspensión, preferentemente con una tasa de agitación que no causa un daño de cizalladura significativo a las células; y (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño suficiente para permitir que las células migren hacia los espacios

interiores. Sus superficies (exterior e interior) en una modalidad pueden cargarse positivamente. En una modalidad, los portadores: (a) tienen un diámetro total de partícula entre aproximadamente 150 y aproximadamente 350 μm ; (b) tienen poros que tienen un diámetro promedio de apertura de poro entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 μm ; y (c) tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas modalidades, la carga positiva la proporcionan los grupos DEAE (N,N,-dietilaminoetil). Los microportadores macroporosos útiles incluyen, sin limitación, CYTOPORE 1™ y CYTOPORE 2™ (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Los microportadores macroporosos útiles particularmente son los portadores CYTOPORE 2™, que tienen un diámetro medio de partícula de 230 μm , un tamaño promedio de los poros de 30 μm , y una densidad de carga positiva de 1,8 meq/g.

En algunas modalidades, las unidades de cultivo se agitan. La agitación puede comprender revolver, agitar, balancear, vibrar, o similares, como se conoce en la técnica. En una modalidad preferida, la agitación se logra con un impulsor de tipo Rushton con deflectores. Los deflectores pueden estar a aproximadamente 140 rpm, lo que corresponde a una entrada de potencia/volumen específico de aproximadamente 40 W/m^3 . En algunas modalidades, la entrada de potencia/volumen específico es más de aproximadamente 40 W/m^3 , por ejemplo, aproximadamente 50 W/m^3 , aproximadamente 60 W/m^3 , aproximadamente 70 W/m^3 , aproximadamente 80 W/m^3 o más. Pueden usarse otras tasas como adecuadas de acuerdo con las células o cultivo en particular que se use.

La concentración de los microportadores como se describe en la presente es baja generalmente, por ejemplo, para ayudar a mantener la tasa de dilución y la densidad celular en intervalos específicos. En una modalidad, la unidad de cultivo puede comprender una cantidad de microportadores que corresponde a una concentración final de microportadores en el intervalo de 0,05-1,0 g/l. En una modalidad, la concentración final del microportador es de aproximadamente 0,05-0,1 g/l. En una modalidad, la concentración final del microportador es de aproximadamente 0,1-0,25 g/l. En otra modalidad, la concentración final del microportador es de aproximadamente 0,25-0,5 g/l. En otra modalidad, la concentración final del microportador es de aproximadamente 0,5-0,75 g/l. En otra modalidad, la concentración final del microportador es de aproximadamente 0,75-1,0 g/l. En otra modalidad, la concentración del portador puede aumentarse o reducirse durante el cultivo continuo, por ejemplo, para ajustar las densidades celulares y las tasas de dilución dentro de intervalos predeterminados.

El sistema de cultivo de células continuo descrito tiene una tasa de dilución preferida (D) y una densidad celular preferida. En particular, la tasa de dilución y la densidad celular se mantienen en valores predeterminados o dentro de los intervalos predeterminados. Además, el sistema de cultivo celular continuo descrito puede tener una tasa de crecimiento específica mínima o un intervalo predeterminado de tasas de crecimiento específicas durante todo el tiempo de proceso.

La tasa de dilución (D) se refiere al volumen del medio suministrado por día dividido por el volumen del cultivo. Aunque el sistema de cultivo celular continuo descrito en la presente involucra la retención de células, la tasa de dilución del sistema de cultivo celular continuo es generalmente menor que la de un cultivo en perfusión, por ejemplo, menos de aproximadamente 2 volúmenes de dilución/día (2 d^{-1}). En una modalidad, la tasa de dilución se mantiene entre más de aproximadamente $0,2 \text{ d}^{-1}$ a menos de aproximadamente 2,0. En otra modalidad, la tasa de dilución se mantiene a menos de aproximadamente $2,0 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $1,8 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $1,5 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $1,2 \text{ d}^{-1}$, etcétera. En otra modalidad, la tasa de dilución se mantiene a menos de aproximadamente $1,0 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $0,9 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $0,8 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $0,7 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de aproximadamente $0,6 \text{ d}^{-1}$, etcétera. En otra modalidad, la tasa de dilución se mantiene a más de aproximadamente $0,2 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, más de aproximadamente $0,3 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, más de aproximadamente $0,4 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, más de aproximadamente $0,5 \text{ d}^{-1}$, etcétera.

Adicionalmente, en un sistema de cultivo celular continuo como se describe en la presente, la densidad celular se mantiene en un valor menor que la que se mantiene en un sistema de cultivo en perfusión, pero mayor que las densidades celulares que se logran en un sistema de quimiostato. En una modalidad, la densidad celular es menos de aproximadamente 2×10^7 células/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente 1×10^7 células/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente 8×10^6 células/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente 6×10^6 células/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente 5×10^6 células/ml. En otra modalidad, la densidad celular puede ser más de aproximadamente 1×10^6 células/ml, por ejemplo, más de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml, por ejemplo, más de aproximadamente 2×10^6 células/ml, por ejemplo, más de aproximadamente 3×10^6 células/ml, por ejemplo, más de aproximadamente 4×10^6 células/ml, etcétera. En otra modalidad, la densidad celular se mantiene entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente 2×10^6 células/ml. En otra modalidad, la densidad celular se mantiene entre aproximadamente 2×10^6 células/ml a aproximadamente 4×10^6 células/ml. En otra modalidad, la densidad celular se mantiene entre aproximadamente 5×10^6 células/ml a aproximadamente 1×10^7 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 6×10^6 células/ml a aproximadamente 8×10^6 células/ml. En otra modalidad, la densidad celular se mantiene entre aproximadamente 1×10^7 células/ml a aproximadamente 2×10^7 células/ml.

Un experto en la técnica reconocerá que el mecanismo por el cual pueden mantenerse las densidades celulares implica la disminución de la porción de células que se retienen con el dispositivo de retención celular, es decir, la

tasa de retención celular. Generalmente, un cultivo en perfusión tiene una tasa de retención celular mayor que 90 % o 95 % y, en muchos casos, cerca del 100 %. En el sistema de cultivo celular continuo descrito, la tasa de retención celular es menos de 90 %. En una modalidad, la retención celular es menos de aproximadamente 85 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 75 %. En una modalidad, la tasa de retención celular es menos de aproximadamente 70 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 60 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 30 %. En una modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 90 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 80 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 70 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 60 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 40 % y aproximadamente 70 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 50 % y aproximadamente 90 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 60 % y aproximadamente 90 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 90 %. En otra modalidad, la retención celular se mantiene entre aproximadamente 80 % y aproximadamente 90 %.

El cultivo también puede caracterizarse por la relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica. La tasa de crecimiento específica (μ) se refiere al aumento de la masa celular por masa celular por día (con relación a la masa celular total): $\mu = (\ln(X_t/X_{t-1}))/((t)-(t-1))$, en donde X_t es la concentración de biomasa en el tiempo (t) y X_{t-1} es la biomasa en el punto de tiempo anterior. Generalmente, la tasa de crecimiento específica del sistema de cultivo continuo como se describe en la presente deberá ser constante dentro de un intervalo predeterminado, y preferentemente con un cierto nivel mínimo para garantizar un mínimo de expresión del polipéptido y/o virus que se asocia al crecimiento. Por ejemplo, la tasa de crecimiento específica del sistema de cultivo continuo descrito en la presente puede ser de aproximadamente 0,1 d⁻¹ a aproximadamente 1,0 d⁻¹. En una modalidad, la tasa de crecimiento específica mantenida por el sistema de cultivo continuo descrito en la presente es mayor que aproximadamente 0,1 d⁻¹, por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,15 d⁻¹, por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,2 d⁻¹, por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,25 d⁻¹, por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,3 d⁻¹, por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,35 d⁻¹, etcétera. En otra modalidad, la tasa de crecimiento específica mantenida por el sistema de cultivo continuo descrito en la presente es menor de aproximadamente 1,0 d⁻¹, por ejemplo, menor de aproximadamente 0,8 d⁻¹, por ejemplo, menor de aproximadamente 0,7 d⁻¹, por ejemplo, menor de aproximadamente 0,6 d⁻¹, por ejemplo, menor de aproximadamente 0,5 d⁻¹, por ejemplo, menor de aproximadamente 0,45. En otra modalidad, la tasa de crecimiento específica puede mantenerse entre aproximadamente 0,1 d⁻¹ a aproximadamente 0,45. En una modalidad, la tasa de crecimiento específica mantenida por el sistema de cultivo continuo descrito en la presente está entre aproximadamente 0,15 d⁻¹ a aproximadamente 0,3. En una modalidad, la tasa de crecimiento específica mantenida por el sistema de cultivo continuo descrito en la presente está entre aproximadamente 0,2 d⁻¹ a aproximadamente 0,25.

Como se describió anteriormente, el sistema de cultivo continuo descrito en la presente mantiene una densidad celular de menos de aproximadamente 2×10^7 células/ml. Un mecanismo por el cual las densidades celulares pueden mantenerse como se describió anteriormente implica mantener una relación particular entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica. Los cultivos en quimiostato tienen tasas de dilución aproximadamente iguales a las tasas de crecimiento específicas para una relación D/ μ de aproximadamente 1. Los cultivos en perfusión tienen generalmente tasas de dilución absoluta más altas y tasas de crecimiento específico muy bajas, por lo que la relación D/ μ es mayor que 1 significativamente. Sin embargo, en el sistema de cultivo continuo descrito en la presente, se mantiene preferentemente una tasa de dilución que es ligeramente más alta que la tasa de crecimiento específica. En consecuencia, en el cultivo continuo descrito en la presente descripción, se mantiene una relación D/ μ mayor que 1. En modalidades preferidas particularmente, la tasa de dilución se calcula y se establece de acuerdo con la eficiencia del dispositivo de retención a fin de mantener la tasa de crecimiento específica dentro de un intervalo predeterminado. En una modalidad, la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica es mayor que aproximadamente 1,0, por ejemplo, mayor que aproximadamente 1,2, por ejemplo, mayor que aproximadamente 1,5, por ejemplo, mayor que aproximadamente 2, por ejemplo, mayor que aproximadamente 2,5. En otra modalidad, la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica es menor de aproximadamente 5, por ejemplo, menor de aproximadamente 4, por ejemplo, menor de aproximadamente 3. En una modalidad, la relación D/ μ está entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 5. En otra modalidad, la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica está entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 3. En otra modalidad, la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica está entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 2,5.

Los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en una unidad de cultivo adecuada o biorreactor. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño, siempre que sea útil para el cultivo de células, por ejemplo, células de mamíferos. Dado que los procesos con densidades celulares bajas son fáciles generalmente de escalar, los métodos de la invención pueden ser particularmente ventajosos para el cultivo a gran escala (es decir, con volúmenes de cultivos mayores que 250 l) y pueden ser particularmente susceptibles de escalar a partir de cultivos pequeños a escala de laboratorio (por ejemplo, 10 l) a cultivos a escala de producción (por ejemplo, 250 l o más) con una modificación mínima de las condiciones de cultivo. Las condiciones internas de la unidad de cultivo incluyen, pero no se limitan a,

pH, pO₂, y temperatura, se controlan típicamente durante el período de cultivo. Una unidad de cultivo de producción se refiere a la unidad de cultivo final que se usa en la producción del polipéptido, virus y/o cualquier otro producto de interés. El volumen de una unidad de cultivo de producción a gran escala es generalmente mayor que aproximadamente 250 litros, y puede ser de aproximadamente 300, aproximadamente 500, aproximadamente 800, aproximadamente 1000, aproximadamente 2500, aproximadamente 5000, aproximadamente 8000, aproximadamente 10 000, aproximadamente 120 000 l o mayor, o cualquier volumen intermedio. Una unidad de cultivo o unidad de cultivo de producción adecuada puede componerse por (es decir, construirse de) cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células en suspensión en medio, bajo las condiciones de cultivo contempladas en la presente descripción, y que es propicio para el crecimiento y viabilidad de células de mamíferos. Los ejemplos de materiales adecuados incluyen, sin limitación, vidrio, plástico y/o metal. En modalidades preferidas, el(los) material(es) no interfiere(n), o no interfiere(n) de manera significativa o sustancialmente, con la expresión y/o la estabilidad del producto deseado, por ejemplo, el polipéptido y/o virus de interés. Un experto en la técnica estará al tanto de, y será capaz de elegir, unidades de cultivo adecuadas para usar en la práctica del presente sistema de cultivo continuo.

En algunas modalidades, el proceso de cultivo celular funciona en más de una unidad de cultivo distinta, tales como mediante el uso de una o más unidades de cultivo semilla (propagación) seguido por el uso de la unidad de cultivo de producción. En algunas modalidades, entonces, el proceso implica la transferencia de aproximadamente 50 l del cultivo semilla de propagación (que tiene aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml) en una unidad de cultivo de 250 l que contenga aproximadamente 150 l de medio de cultivo. En general, el sistema de cultivo continuo descrito en la presente sólo se aplica a las unidades de cultivo de producción. Por ejemplo, células de mamífero semillas pueden propagarse primero, por ejemplo, en sistemas de lote, lote alimentado, perfusión y/o quimiostato, en una o más unidades de cultivo semilla. Después de la transferencia de las células a una unidad de cultivo de producción, las células pueden cultivarse de acuerdo con el sistema de cultivo continuo como se describe en la presente, por ejemplo, con un dispositivo de retención celular en un sistema de cultivo celular que tiene una tasa de dilución de menos de aproximadamente 2 d^{-1} y una densidad celular de menos de aproximadamente 2×10^7 células/ml.

Alternativamente, la expansión de las células a la unidad de cultivo de producción y la fase de producción puede realizarse en una unidad de cultivo física. Por ejemplo, las células pueden expandirse a una escala de producción final y cambiar el proceso a las condiciones de producción, con lo cual pueden usarse las condiciones para el sistema de cultivo celular continuo descrito en la presente.

Se descubrió inesperadamente que los métodos de cultivo de la invención pueden usarse para mantener las densidades celulares y la tasa de dilución dentro de intervalos predeterminados, por ejemplo, para soportar fases de producción de una duración similar a la de los sistemas de quimiostato o perfusión. Por "intervalos predeterminados" se entiende intervalos objetivos, por ejemplo, los intervalos descritos en la presente para el funcionamiento de los sistemas de cultivo continuo de acuerdo con modalidades de la presente invención. Por ejemplo, en algunas modalidades, el intervalo objetivo para la tasa de dilución es entre $0,2 \text{ d}^{-1}$ a $2,0 \text{ d}^{-1}$ y la densidad celular es menos de 2×10^7 células/ml. En otra modalidad, la tasa de dilución se mantiene a menos de $2,0 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de $1,8 \text{ d}^{-1}$, por ejemplo, menos de $1,5 \text{ d}^{-1}$, o por ejemplo, menos de $1,2 \text{ d}^{-1}$, y la densidad celular es menos de $1,5 \times 10^7$ células/ml, por ejemplo, menos de 1×10^7 células/ml, o por ejemplo, menos de 8×10^6 células/ml. En algunas modalidades, la tasa de crecimiento específica es de $0,1 \text{ d}^{-1}$ a $1,0 \text{ d}^{-1}$ y la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica está entre 1,2 y 5. En algunas modalidades, el intervalo objetivo para la tasa de dilución es entre $0,5 \text{ d}^{-1}$ a $1,0 \text{ d}^{-1}$ y la densidad celular es menos de 5×10^6 células/ml. En algunas modalidades, la tasa de crecimiento específica es de $0,15 \text{ d}^{-1}$ a $0,3 \text{ d}^{-1}$ y la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica está entre 1,8 y 3. En algunas modalidades, la tasa de crecimiento específica es de $0,2 \text{ d}^{-1}$ a $0,25 \text{ d}^{-1}$ y la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica está entre 2,0 y 2,5. En otra modalidad preferida particularmente, la densidad celular es 5×10^6 células/ml o menos, la tasa de dilución es menos de $0,6 \text{ d}^{-1}$, y la tasa de crecimiento específica es $0,18$ a $0,27 \text{ d}^{-1}$. En otra modalidad preferida particularmente, la densidad celular es menos de 5×10^6 células/ml, la tasa de dilución está entre $0,55$ y $0,6 \text{ d}^{-1}$, y la tasa de crecimiento específica es $0,16$ a $0,26 \text{ d}^{-1}$. Las modalidades incluyen mantener la tasa de dilución y/o la densidad celular y/o la tasa de crecimiento específica y/o la relación de la tasa de dilución con respecto a la tasa de crecimiento específica dentro de un intervalo objetivo (por ejemplo, aquellos expuestos anteriormente) por al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo al menos aproximadamente 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 90 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 98 % del tiempo de cultivo continuo total y/o el tiempo de la fase de producción.

El sistema de cultivo celular continuo descrito en la presente puede permitir la producción sostenida de un polipéptido y/o virus de interés a partir de células de mamíferos. En algunas modalidades, las células se cultivaron por un tiempo de cultivo celular continuo total de más de aproximadamente 7 días. En modalidades más preferidas, las células se cultivaron por más de aproximadamente 9 días, más de aproximadamente 14 días, más de aproximadamente 21 días, más de aproximadamente 28 días, más de aproximadamente 35 días, más de aproximadamente 40 días, más de aproximadamente 45 días, o más de aproximadamente 50 días.

Los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" (o simplemente "medio") se refieren a una solución nutritiva usada para el crecimiento de células eucariotas que proporciona típicamente al menos un componente de una o más de las categorías siguientes: (1) sales (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, etcétera) que contribuyen a la osmolaridad del medio; (2) una fuente de energía, usualmente en forma de carbohidratos tales como la glucosa; (3) todos los aminoácidos esenciales, y usualmente el conjunto básico de veinte aminoácidos; (4) vitaminas y/o otros compuestos orgánicos necesarios en bajas concentraciones; y (5) oligoelementos, donde los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos que se necesitan típicamente a concentraciones muy bajas, usualmente en el intervalo micromolar. La solución nutritiva puede complementarse opcionalmente con uno o más de los componentes de cualquiera de las categorías siguientes: (a) suero animal; (b) hormonas y otros factores de crecimiento tales como, por ejemplo, insulina, transferrina, y factor de crecimiento epidérmico; e (c) hidrolizados de plantas, levaduras y/o tejidos, lo que incluye hidrolizados de proteínas de estos.

El presente sistema de cultivo continuo encuentra uso particular cuando se cultivan células de mamíferos que expresan un polipéptido y/o un virus de interés en un medio libre de suero, un medio definido químicamente, o un medio que carece de componentes derivados de animales. Los medios definidos químicamente son los medios en los cuales todos los componentes tienen una estructura química conocida. Los medios definidos químicamente están disponibles de proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, Sigma, JRH Biosciences, Gibco y Gemini. En otras modalidades de la invención, el medio puede contener un aminoácido(s) derivado(s) de cualquier fuente o método conocido en la técnica, lo que incluye, pero no se limita a, un aminoácido(s) que se deriva(n) de la adición de uno o más aminoácidos o de la adición de un hidrolizado de peptona o de proteínas (lo que incluye hidrolizado a partir de un animal, levadura, o fuente(s) vegetal(es)).

Puede usarse cualquier medio de cultivo celular que soporte el crecimiento y el mantenimiento celular en las condiciones de la invención. Típicamente, el medio contiene agua, un regulador de la osmolaridad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, uno o más factores de crecimiento sintéticos o recombinantes, vitaminas, y cofactores. En modalidades preferidas, el medio de cultivo carece de componentes derivados de animales. Como se usa en la presente descripción, los componentes "derivados de animales" son cualesquiera componentes que se produzcan en un animal intacto (tales como, por ejemplo, las proteínas que se aíslan y purifican a partir del suero), o que se producen mediante el uso de componentes que se producen en un animal intacto (tales como, por ejemplo, un aminoácido elaborado mediante el uso de una enzima que se aisló y purificó a partir de un animal para hidrolizar un material de origen vegetal). Por el contrario, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, tiene un origen genómico en un animal), pero que se produce *in vitro* en cultivos celulares (tales como, por ejemplo, en una célula de levadura o bacteria recombinante o en una línea continua de células eucariotas establecida, recombinante o no), mediante el uso de medios que carecen de componentes que se producen en, o se aíslan y purifican a partir de, un animal intacto no es un componente "derivado de animal". Por ejemplo, la insulina producida en una levadura o una célula bacteriana, o la insulina producida en una línea celular de mamíferos establecida, tales como, por ejemplo, las células CHO, BHK o HEK, o el interferón producido en células Namalwa, no constituye un componente "derivado de animal". En consecuencia, un medio de cultivo celular que carece de componentes derivados de animales es uno que puede contener proteínas animales que se producen de forma recombinante; dicho medio, sin embargo, no contiene, por ejemplo, suero animal o proteínas u otros productos purificados a partir de suero animal. Dicho medio puede, por ejemplo, contener uno o más componentes que se derivan de plantas.

Aún en otras modalidades de la invención, el medio que se usa durante la fase de crecimiento celular contiene medio concentrado, es decir, medio que contiene una concentración de nutrientes más alta que la que se necesita normalmente y que se proporciona normalmente a un cultivo en crecimiento. Un experto en la técnica reconocerá cuál medio celular, medio de inoculación, etcétera, es apropiado para cultivar una célula en particular, por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHO). Por ejemplo, un experto en la técnica será capaz de seleccionar adecuadamente para un cultivo en particular la cantidad de glucosa y otros nutrientes, tales como glutamina, hierro, oligoelementos, y similares, así como también otras variables del cultivo, tales como, por ejemplo, la cantidad de espuma, osmolaridad, etcétera. (ver, por ejemplo, Mather, J. P., y otros (1999) "Culture media, animal cells, large scale production", Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2:777-785 (especialmente las páginas 780 a 783); Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/0121568 (especialmente párrafos [0144] a [0185] y [0203] a [0331])). La presente invención también contempla variantes de dichos medios conocidos, lo que incluye, por ejemplo, variantes de dichos medios enriquecidos con nutrientes, medios concentrados, medios definidos químicamente, medios libres de suero, y medios que se modifican de otra manera de acuerdo con diversas modalidades de la invención.

El sistema de cultivo continuo no se limita a ningún tipo de células de mamífero independientes de anclaje. Las células de mamíferos pueden ser células de mamífero que se modifican genéticamente que expresan un polipéptido recombinante (y/o virus recombinante) de interés, o células de mamífero sin modificar que expresan un polipéptido (y/o un virus) de interés. Un número de líneas de células de mamíferos son células hospederas adecuadas para la expresión recombinante de polipéptidos y/o virus. Las líneas celulares de mamífero hospederas incluyen, por ejemplo, células COS, PER.C6, TM4, VERO, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L cells, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, Jurkat cells, Rat2, BaF3, 32D, FDPC-1, PC12, M1x, mielomas murinos (por ejemplo, SP2/0 y NS0) y C2C12, así como también líneas

celulares de primates transformadas, hibridomas, células normales diploides y cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios. Cualquier célula de mamíferos que puede adaptarse al cultivo en suspensión puede usarse en el método de cultivo celular que se describe. Un ejemplo no limitante incluye células CHO, que son dependientes de anclaje cuando se cultivan en presencia de suero y superficies adecuadas, pero se adaptan fácilmente al crecimiento en cultivo en suspensión (ver, por ejemplo, Rasmussen 1998, Cytotechnology 28: pp31-42, especialmente las páginas 34-37, con respecto al cultivo de una línea de células CHO libre de suero). También puede usarse cualquier célula de mamífero capaz de expresar el polipéptido y/o virus de interés (ya sea de producción recombinante o no) en los métodos de cultivo celular descritos. En una modalidad, el método de cultivo celular continuo que se describe en la presente puede usarse para adaptar una línea celular dependiente de anclaje a una línea celular independiente de anclaje. Numerosas líneas celulares están disponibles de fuentes comerciales, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés). En una modalidad, el sistema de cultivo celular continuo se usa para cultivar células CHO modificadas genéticamente.

Como se describe en la presente, el sistema de cultivo celular continuo permite la recuperación de un polipéptido y/o virus de interés (por ejemplo, un polipéptido recombinante y/o virus recombinante). El polipéptido y/o virus se recupera típicamente a partir de medio gastado que se elimina del sistema. Las ventajas de las modalidades preferidas de la invención incluyen la reducción del tiempo de residencia de la proteína y/o virus en el biorreactor, lo que es particularmente útil para productos susceptibles a la degradación. Sin embargo, el sistema de cultivo celular continuo, como se describe en la presente no se limita a tales polipéptidos o virus lábiles, y puede usarse para la recuperación de otros polipéptidos o virus de interés.

La presente descripción se refiere a métodos para el cultivo continuo mejorado a gran escala de células de mamífero que expresan una o más proteínas y/o virus de interés, ya sea a partir de genes endógenos o de infección natural, o a consecuencia de la introducción en dichas células de genes recombinantes que codifican las proteínas o los virus de interés. Dichas proteínas incluyen, como ejemplos no limitantes, enzimas, hormonas, anticuerpos, receptores de proteína, proteínas de fusión (por ejemplo, fusiones de receptores solubles y el dominio Fc de una IgG), vacunas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, proteínas del factor de la sangre etcétera. En una modalidad, la proteína de interés es la ADAMTS13. En otra modalidad, la proteína de interés es el Factor VII o Factor VIII. En otra modalidad, la proteína de interés es el inhibidor de la alfa-1-proteinasa.

La presente descripción se refiere también a métodos para mejorar el cultivo continuo a gran escala de células de mamífero que expresan uno o más virus de interés (lo que incluye partículas virales y vectores virales), ya sean de tipo salvaje o recombinante. Los ejemplos no limitantes de dichos virus de tipo salvaje o recombinante, partículas virales y/o vectores virales incluyen Adenovirus, Herpes virus, Retrovirus, Lentivirus, virus de la Influenza, etcétera. La producción de virus recombinantes, partículas virales y el uso de vectores virales recombinantes se conocen bien en la técnica. Para la expresión del virus, el método de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para, pero no se limita a, la infección con y la expresión de virus no-líticos tales como, por ejemplo, Hepatitis A y TBE en, por ejemplo, células Vero, o Lentivirus en, por ejemplo, HEK293 u otras líneas celulares humanas o de mamíferos.

Una vez que el medio se elimina de la unidad de cultivo, puede someterse a una o más etapas del proceso para obtener la proteína y/o virus de interés. Las etapas posteriores del proceso incluyen, sin limitación, centrifugación y/o filtración para retirar células que no se eliminaron anteriormente del cultivo; cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica; cromatografía de intercambio iónico; cromatografía de exclusión molecular; procedimientos de electroforesis (por ejemplo, focalización isoeléctrica preparativa (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, la precipitación por sulfato de amonio), extracción, y similares. Ver, generalmente, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, New York, 1982; y Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989.

En ciertas modalidades, las células de mamífero se someten a una etapa de precultivo, por ejemplo, una etapa de precultivo para la adaptación de las células para la producción del polipéptido y/o virus de interés. En algunas modalidades, la adaptación comprende precultivar las células en suspensión, por ejemplo, por un tiempo para permitir que el cultivo alcance un volumen de trabajo final deseado, por ejemplo, de aproximadamente 5 l, aproximadamente 8 l, aproximadamente 10 l, aproximadamente 12 l, aproximadamente 15 l, o aproximadamente 20 l, etcétera. En este punto, el cultivo puede cambiarse a una alimentación continua del medio y funcionar de acuerdo con el sistema de cultivo celular continuo que se describe en la presente.

Modalidades ilustrativas de la invención que se describen en la presente se discuten adicionalmente en los Ejemplos proporcionados más abajo. Los Ejemplos, sin embargo, y sus detalles particulares, de ninguna manera intentan limitar la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Los cultivos en quimiostato se prepararon con una línea celular CHO recombinante que expresa la ADAMTS13 humana en el medio BACD-A13 definido químicamente (formulación de DMEM/F12 enriquecida), que se suplementa como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Composición del medio de cultivo celular BACD-A13

Componente	Concentración [g/kg]
DMEM/HAMS F12 BaxS9	12,74
L-Glutamina	1,3
Synperonic	1,00
Etanolamina	0,00153
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0,001
NaHCO ₃	1,5

5 Células CHO recombinantes que expresan la ADAMTS13 humana se adaptaron a un medio definido químicamente, específicamente medio BCS, como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Composición del medio de cultivo celular BCS

Componente	Concentración [g/kg]
DMEM/HAMS F12 Bax Especial	11,75
L-Glutamina	0,9
Synperonic	1,00
Etanolamina	0,00153
Putrescina.2HCl	0,0036
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0,0006
NaHCO ₃	2,0

20 Se descongeló un banco celular de trabajo de desarrollo y se preparó el inóculo de células en medio BCS. Las células se transfirieron a una unidad de cultivo de 10 l con impulsores de tipo Rushton y se cultivaron en cultivos repetidos en lote en medio BACD-A13 con parámetros controlados en línea, como sigue: pH 7,10, temperatura 36 °C, y DO de saturación del aire 20 %.

Después de 2 ciclos en lotes, los cultivos alcanzaron un volumen de trabajo final de 10 l, y el cultivo se cambió a alimentación de medio continua en el día 4 y funcionó hasta el día 18 en modo de quimiostato.

40 A partir de este cultivo, una segunda unidad de cultivo de 10 l con impulsor de tipo Rushton y un dispositivo de retención celular se inoculó para perfusión de tipo quimiostato, mediante el uso del mismo medio de cultivo celular, y se cultivó durante 8 días en cultivo en lote repetido. Se añadieron microportadores CYTOPORE 2™ (GE Healthcare) (0,25 g/l), y la unidad de cultivo funcionó en modo de perfusión continua de tipo quimiostato en paralelo a la otra unidad de cultivo en modo quimiostato. Las unidades de cultivo se agitaron con impulsores de tipo Rushton con deflectores a 140 rpm, lo que corresponde a una entrada de potencia/volumen específica de aproximadamente 40 W/m³.

50 Ambas unidades de cultivo funcionaron en paralelo durante 24 días. Los datos se calcularon en intervalos de 3 semanas y un intervalo adicional de 3 días (Tabla 1.3. (Quimiostato) y Tabla 1.4 (perfusión de tipo quimiostato). Los datos de cuatro intervalos de la Tabla 1.3. (días 26-32; días 33-39; días 40-46; y días 47-49) se compararon directamente con los cuatro intervalos mostrados en la Tabla 1.4 (días 9-15; días 16-22; días 23-29; y días 30-32).

55 Se tomaron muestras de las unidades de cultivo y se analizaron para la concentración de ADAMTS13 por ELISA, y para la actividad de ADAMTS13 por el ensayo FRET-73. Los conteos de células se determinaron por la tecnología Nucleocounter. Para los cultivos de perfusión, el conteo total de células y el conteo de células en el sobrenadante se midieron por separado para calcular la retención celular relativa. Las tasas de dilución se midieron y se usaron para calcular las tasas de crecimiento y las productividades volumétricas. Las ecuaciones se proporcionan más abajo

60 La tasa de crecimiento (μ) en el cultivo en quimiostato se calculó mediante el uso de la ecuación: $\mu = D + \ln(X_t/X_{t-1})/(t - t_{-1})$, en donde D = tasa de dilución, X_t = densidad celular total en el tiempo t, y (t - t₋₁) = tiempo entre t y t₋₁.

65 La tasa de crecimiento (μ) en el cultivo en perfusión de tipo quimiostato se calculó mediante el uso de la ecuación $\mu = \ln(X_t/X_{t-1})/(t - t_{-1}) + D \times (\text{media logarítmica } X_{SN} / \text{media logarítmica } X) / (t - t_{-1})$; en donde D = tasa de dilución, X_t = densidad celular total en el tiempo t, (t - t₋₁) = tiempo entre t y t₋₁, media logarítmica X = media logarítmica de la

densidad celular total = $(X_t - X_{t-1}) / (\ln(X_t) - \ln(X_{t-1}))$, y media logarítmica X_{SN} = media logarítmica del sobrenadante de densidad celular.

La tasa de retención celular se calculó como = $100 \times (1 - X_{SN} / X)$ [%]

Tabla 1.3: Datos de la suspensión de fermentación para el cultivo en quimiostato

Intervalo	ZZ.-Nuc.	D	μ	Adams Frets	Adams ELISA	espec. Actividad	P Frets	P ELISA	qp Frets	qp ELISA
Días	[1 E6/ml]	[1d]	[1d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	U/mg	[U//d]	[mg//d]	[mU/E06/d]	[μ g/E06/d]
0-4	n.a.	Lote	0,420	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5-11	2,76	0,353	0,369	4314,4	4,09	1055	1523	1,44	551	0,52
12-18	2,01	0,309	0,299	9148,8	8,45	1083	2830	2,61	1407	1,30
19-25	1,82	0,311	0,300	8609,6	8,67	993	2677	2,70	1473	1,48
26-32	1,76	0,309	0,304	8868,2	9,96	891	2742	3,08	1560	1,75
33-39	1,84	0,321	0,337	7845,4	10,10	777	2519	3,24	1369	1,76
40-46	1,97	0,330	0,340	8098,7	9,24	877	2674	3,05	1358	1,55
47-49	2,02	0,361	0,343	7353,7	9,30	791	2658	3,36	1314	1,66
Media 26-49	1,90	0,330	0,331	8041,5	9,65	834	2648	3,18	1400	1,68

Tabla 1.4: Datos de la suspensión de fermentación para el cultivo de tipo quimiostato

Intervalo	Total CC [1x10 ⁶ /ml]	CC sobrenadante. [1x10 ⁶ /ml]	Retención celular %	D	μ	Adamts Frets [mU/ml]	Adamts ELISA [μ g/ml]	espec. Actividad U/mg	P Frets [U//d]	P ELISA [mg//d]	In qp Frets [mU/E06/d]	In qp ELISA [mU/E06/d]
Días				[1/d]	[1/d]							
0-8	n.a.	n.a.	n.a.	Lote	0,398	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9-15	2,04	0,82	60	0,37	0,271	5804,4	6,25	929	2176	2,34	1068	1,15
16-22	3,75	1,14	70	0,44	0,192	8863,5	10,18	871	3889	4,46	1037	1,19
23-29	5,86	1,53	74	0,53	0,178	11873,6	11,03	1076	6292	5,84	1073	1,00
30-32	8,05	1,30	84	0,62	0,175	9398,6	10,61	886	5794	6,54	719	0,81
Media 9-32	4,93	1,20	72	0,49	0,204	8985,0	9,52	941	4538	4,80	974	1,04

La tasa de crecimiento específica de las células en cultivo en lote fue aproximadamente 0,42 d⁻¹. Después de cambiar a cultivo en quimiostato, se observó un descenso de la tasa de crecimiento específica de aproximadamente 0,30 d⁻¹, lo cual es indicativo de condiciones limitantes del crecimiento en el medio definido químicamente. Las densidades celulares se equilibraron en el intervalo de 1,8-2x10⁶ células/ml. Bajo tales condiciones de cultivo continuo, se alcanzó el estado de equilibrio (a partir del intervalo de 12-18), y se pudieron alcanzar más de 2500 U//d.

Como se indicó anteriormente, después de la inoculación de la unidad de cultivo con un dispositivo de retención celular, el día 18, las células se cultivaron adicionalmente en un modo de perfusión continuo de tipo quimiostato. Debido a la retención celular, la densidad celular en los cultivos en perfusión de tipo quimiostato se incrementó. Sin embargo debido a la tasa de retención celular relativamente baja (media 72 %; intervalo 60 %-84 %), las densidades celulares se mantuvieron en un nivel bajo relativamente de $<1 \times 10^7$ células/ml (media $4,93 \times 10^6$ células/ml) y la tasa de dilución máxima fue de $0,62 \text{ d}^{-1}$.

La tasa de retención celular baja también permitió a las células mantener una tasa constante de crecimiento específico de $0,18$ a $0,27 \text{ d}^{-1}$ sin dar lugar a densidades celulares excesivas. Esto se considera una ventaja para las células recombinantes, las cuales expresan proteínas recombinantes en una forma asociada al crecimiento. A pesar de una productividad específica reducida (por ejemplo 974 mU/E06/d frente a 1400 mU/E06/d) la productividad volumétrica se incrementó en más del 70 % de 2648 U/l/d a 4538 U/l/d , debido a la densidad celular aproximadamente 2,8 veces más alta. La actividad específica de la proteína recombinante también mejoró (941 U/mg frente a 834 U/mg), debido probablemente al tiempo reducido de permanencia en la unidad de cultivo, lo que mejora de esta manera la estabilidad, o cualquier otro efecto beneficioso sobre la estructura y función de la ADAMTS13 recombinante que se expresa.

Ejemplo 2: Los cultivos de quimiostato se prepararon con una línea celular CHO recombinante que expresa la ADAMTS13 humana en el medio BACD-A13 definido químicamente (formulación de DMEM/F12 enriquecida), que se suplementó como se muestra en la Tabla 1.1.

Células CHO recombinantes que expresan la ADAMTS13 humana se adaptaron a un medio definido químicamente, específicamente medio BCS, como se muestra en la Tabla 1.2. Se descongeló un banco celular de trabajo de desarrollo y se preparó el inóculo de células en medio BCS. Las células se transfirieron a una unidad de $1,5 \text{ l}$ con impulsores de paleta y se cultivaron en cultivos repetidos en lote en medio BACD-A13 con pH $7,1$, temperatura $36 \text{ }^\circ\text{C}$, y DO de saturación del aire 20% que se controlaron en línea.

Después de 2 ciclos en lote, los cultivos alcanzaron un volumen final de trabajo de $1,5 \text{ l}$, y el cultivo se cambió a una alimentación de medio continua el día 5 y funcionó hasta el día 7 en modo quimiostato.

A partir de este cultivo se inoculó una segunda unidad que comprendía un dispositivo de retención celular con impulsores de paleta mediante el uso del mismo medio de cultivo celular y se cultivaron durante 1 día en cultivo en lote. Se añadieron microportadores CYTOPORE 2™ (GE Healthcare) ($0,25 \text{ g/l}$), y la unidad de cultivo funcionó en modo de perfusión continua de tipo quimiostato en paralelo a la otra unidad de cultivo en modo quimiostato.

Ambas unidades de cultivo funcionaron en paralelo durante 28 días. Los datos se calcularon en 4 intervalos semanales (Tabla 2.1 (quimiostato) y 2.2 (modo de perfusión de tipo quimiostato)).

Se tomaron muestras de las unidades de cultivo y se analizaron para la concentración de ADAMTS13 por ELISA y para la actividad ADAMTS13 por el ensayo FRETS-73. Los conteos de células se determinaron por la tecnología Nucleocounter. Para los cultivos en perfusión de tipo quimiostato, el recuento total de células y el recuento de células en el sobrenadante se midieron por separado para calcular la retención celular relativa. Las tasas de dilución se midieron y se usaron para calcular las tasas de crecimiento y las productividades volumétricas.

La tasa de crecimiento (μ) en el cultivo en quimiostato se calculó mediante el uso de la ecuación: $\mu = D + \ln(X_t / X_{t-1}) / (t - t_{-1})$, en donde D = tasa de dilución, X_t = Densidad total de células en el tiempo t , y $(t - t_{-1})$ = Tiempo entre t y t_{-1}

La tasa de crecimiento (μ) en el cultivo en perfusión de tipo quimiostato se calculó mediante el uso de la ecuación $\mu = \ln(X_t / X_{t-1}) / (t - t_{-1}) + D \times (\text{media logarítmica } X_{\text{SN}} / \text{media logarítmica } X) / (t - t_{-1})$; en donde D = tasa de dilución, X_t = densidad total de células en el tiempo t , $(t - t_{-1})$ = tiempo entre t y t_{-1} , log medio X = media logarítmica de la densidad celular total = $(X_t - X_{t-1}) / (\ln(X_t) - \ln(X_{t-1}))$, y media logarítmica X_{SN} = media logarítmica de la densidad celular del sobrenadante.

La tasa de retención celular se calculó como = $100 \times (1 - X_{\text{SN}} / X) [\%]$

Tabla 2.1: Datos de la suspensión de fermentación para el cultivo en quimiostato

Intervalo	Total CC [1x10 ⁶ E6/ml]	D [1/d]	μ [1/d]	Adamts Frets [mU/ml]	Adamts ELISA [μ g/ml]	espec. Actividad U/mg	P Frets [U/l/d]	P ELISA [mg/l/d]	qp Frets [mU/E06/d]	qp ELISA [μ g/E06/d]
0-5	n.a.	Lote	0,507	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9-15	1,87	0,345	0,340	2879,8	2,987	964	994,0	1,031	533,0	0,553
16-22	1,21	0,298	0,253	3483,7	3,755	926	1042,9	1,123	867,7	0,933
23-29	1,02	0,270	0,262	3726,6	3,928	946	951,8	1,008	957,9	1,021
30-36	0,83	0,279	0,268	2551,1	2,858	895	691,8	0,780	837,7	0,948
Media 9-36	1,23	0,298	0,281	3160,3	3,382	933	920,1	0,986	799,1	0,864

Tabla 2.2: Datos de la suspensión de fermentación para el cultivo en perfusión de tipo quimiostato

Intervalo	Total CC [1x10 ¹⁰ E6/ml]	CC sobrenadante. [1x10 ¹⁰ E6/ml]	Retención celular %	D [1/d]	μ [1/d]	Adamts Frets [mU/ml]	Adamts ELISA [μ g/ml]	espec. Actividad U/mg	P Frets [U/l/d]	P ELISA [mg/l/d]	q Frets [mU/E06/d]	q ELISA [μ g/E06/d]
Días												
02-08	1,96	1,22	38	0,449	0,262	2767,4	3,180	870	1241,6	1,427	634,6	0,729
09-15	2,95	1,12	62	0,442	0,256	4726,5	4,788	987	2090,0	2,117	707,7	0,717
16-22	3,90	1,06	73	0,592	0,207	3855,3	4,071	947	2281,5	2,409	585,6	0,618
23-29	3,57	1,00	72	0,604	0,205	2671,2	3,027	882	1613,4	1,829	451,8	0,512
30-36	3,52	1,13	68	0,594	0,222	2559,4	2,761	927	1519,5	1,639	431,3	0,465
37-43	4,20	1,18	72	0,571	0,219	2828,7	2,905	974	1615,2	1,659	384,7	0,395
44-49	4,30	1,21	72	0,566	0,159	2705,0	3,110	870	1530,0	1,759	355,9	0,409
Media 02-29	3,09	1,10	61	0,522	0,232	3505,1	3,767	922	1806,6	1,945	594,9	0,644
Media 02-49	3,49	1,13	68	0,545	0,219	3159,1	3,406	922	1698,8	1,834	507,3	0,549

La tasa de crecimiento específica de las células CHO recombinantes que expresaban ADAMTS-13 en cultivo en lote fue aproximadamente $0,51 \text{ d}^{-1}$. Después de cambiar a cultivo quimiostato, se observó un descenso en la tasa de crecimiento específica a menos de $0,30 \text{ d}^{-1}$, lo cual es indicativo de condiciones limitantes de crecimiento en el medio definido químicamente. Las densidades celulares se equilibraron en el intervalo de $0,8\text{-}1,2 \times 10^6$ células/ml con una tasa de crecimiento específica de $0,25\text{-}0,27 \text{ d}^{-1}$. Bajo dichas condiciones de cultivo continuo, se alcanzó el estado de

equilibrio (a partir del intervalo 16-36). La productividad media de todos los 4 intervalos a partir del día 09-36 fue de 920 U//d.

5 Como se describió anteriormente, después de la inoculación de la unidad de cultivo con un dispositivo de retención celular en el día 7, las células se cultivaron después en modo continuo de tipo quimiostato. Los datos de los cuatro intervalos (días 9-15; días 16-22; días 23-29; y días 30-36) y los valores medios de los días 9-36 de la Tabla 2.1 se compararon directamente con los datos de cuatro intervalos (días 2-8; días 9-15; días 16-22; y días 23-29) y el valor medio de los días 2-29 de la Tabla 2.2.

10 El cultivo en perfusión de tipo quimiostato funcionó después (sin un quimiostato como referencia) para otros 3 intervalos (días 30-36; días 37-43; y días 44-49) para demostrar la estabilidad a largo plazo del cultivo en perfusión de tipo quimiostato. Los valores medios de las 7 semanas de cultivo continuo se proporcionan en la Tabla 2.2 (media de los días 2-49).

15 Debido a la retención celular, la densidad celular en los cultivos en perfusión aumentó. Sin embargo debido a la tasa de retención celular relativamente baja (media de los días 02-29: 61 %, media de los días 02-49: 68 %, intervalo 38 %-72 %), las densidades celulares se mantuvieron en un nivel relativamente bajo de $<5 \times 10^6$ células/ml (media de los días 02-49 = $3,49 \times 10^6$ células/ml). La tasa de dilución máxima de aproximadamente $0,60 \text{ d}^{-1}$ se alcanzó en el 3er intervalo y después se mantuvo constante entre $0,55 \text{ d}^{-1}$ - $0,60 \text{ d}^{-1}$ hasta el final del experimento (media de los días 20 02-49: $0,55 \text{ d}^{-1}$).

25 La tasa de retención celular baja, además, permitió a las células mantener un ritmo constante de crecimiento específico de $0,16$ a $0,26 \text{ d}^{-1}$ (media de los días 02-49: $0,22 \text{ d}^{-1}$) sin conducir a densidades celulares excesivas. A pesar de la productividad específica reducida (por ejemplo 595 mU/E06/d vs 799 mU/E06/d) la productividad volumétrica se incrementó en más del 90 % de 920 U//d a 1807 U//d (media de los 4 primeros intervalos), debido a la densidad celular aproximadamente 2,8X más alta. La productividad del cultivo de tipo quimiostato se mantuvo relativamente estable en el intervalo de 1500-1600 U//d para los 3 intervalos adicionales.

30 Como en el Ejemplo 1, se demostró que este enfoque de la estabilización de cultivos continuos en suspensión con una tasa de retención celular baja puede compensar las desventajas de limitaciones de crecimiento severas bajo determinadas condiciones de cultivo (por ejemplo, al usar medio definido químicamente). En consecuencia, el control de la retención celular permite que el cultivo se mantenga en densidades celulares moderadas relativamente y a tasas de dilución relativamente bajas y constantes. Además, debido a la tasa de retención celular relativamente baja, el cultivo retuvo más de las características de un cultivo en suspensión continua, como se muestra, por 35 ejemplo, por las tasas de crecimiento específicas.

Ciertas modificaciones y mejoras se les ocurrirán a los expertos en la técnica después de leer la descripción anterior. Debe entenderse que todas dichas modificaciones y mejoras se eliminaron en la presente descripción por razones de concisión y legibilidad. No obstante, dichas modificaciones y mejoras se contemplan como dentro del alcance de 40 la presente invención y están apropiadamente dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un polipéptido en un cultivo celular continuo, dicho método comprende
 - (a) cultivar células de mamíferos que expresan el polipéptido en un sistema de cultivo celular continuo, en donde dicho sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular y tiene una tasa de dilución (D) de menos de 2 d^{-1} y una densidad celular de menos de 2×10^7 células/ml; y
 - (b) recuperar dicho polipéptido del medio que se elimina de dicho sistema de cultivo celular; en donde dichas células se modifican genéticamente para expresar una proteína similar a la desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13 (ADAMTS13).
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho dispositivo de retención celular produce una tasa de retención celular de menos de 90 %.
3. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha tasa de dilución está entre $0,1$ y $1,0 \text{ d}^{-1}$.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha densidad celular es de menos de 1×10^7 células/ml.
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho sistema de cultivo celular tiene una relación entre la tasa de dilución y la tasa de crecimiento específica (D/μ) entre 1,2 y 5.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho sistema de cultivo celular tiene una tasa de crecimiento específica de entre $0,2 \text{ d}^{-1}$ y $0,8 \text{ d}^{-1}$.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular por más de 20 días.
8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular por más de 40 días.
9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular por más de 50 días.
10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha tasa de dilución y dicha densidad celular se mantiene por al menos 80 % del tiempo en que las células se cultivan en dicho sistema de cultivo celular.
11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho dispositivo de retención celular comprende un microportador macroporoso.
12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células se cultivan en un medio libre de suero.
13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células se cultivan en al menos 250 l de medio.
14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células son células independientes de anclaje.
15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además, antes de la etapa de cultivo, precultivar las células en suspensión.
16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas células son células CHO.
17. El método de conformidad con la reivindicación 1 para la producción de una proteína similar a desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina tipo 1 motivo 13 (ADAMTS13) en un cultivo celular continuo, el método comprende (a) cultivar células de mamífero independientes de anclaje que expresan proteína ADAMTS13 recombinante en un sistema de cultivo celular continuo, donde el sistema de cultivo celular comprende un dispositivo de retención celular que tiene una tasa de retención celular de menos de 90 % y tiene una tasa de dilución (D) entre $0,1$ y $1,0 \text{ d}^{-1}$ y una densidad celular inferior a 1×10^7 células/ml; y (b) recuperar la proteína ADAMTS13 del medio eliminado del sistema de cultivo celular.

18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la tasa de dilución se mantiene a menos de aproximadamente $1,0 \text{ d}^{-1}$, menos de aproximadamente $0,9 \text{ d}^{-1}$, menos de aproximadamente $0,8 \text{ d}^{-1}$, menos de aproximadamente $0,7 \text{ d}^{-1}$, o menos de aproximadamente $0,6 \text{ d}^{-1}$.