

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 994**

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: **04.06.2015 PCT/US2015/034297**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15188009**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2015 E 15730015 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3152317**

54 Título: **Métodos de recolección en cultivos de células de mamífero**

30 Prioridad:

**04.06.2014 US 201462007588 P**

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

**22.04.2019**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)  
One Amgen Center Drive  
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**GOUDAR, CHETAN;  
COLE, SEAN;  
SABO, NICOLE;  
LIN, HENRY;  
LULL, JONATHAN y  
THARMALINGAM, THARMALA**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 709 994 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos de recolección en cultivos de células de mamífero

**5 Campo de la invención**

La invención proporciona un método y materiales para el cultivo de células de mamífero y la recolección de proteínas recombinantes.

**10 Antecedentes de la invención**

Como la demanda de grandes cantidades de proteínas recombinante terapéuticas continúa creciendo, se ha puesto mucho empeño en la optimización del procedimiento, particularmente en métodos y estrategias para el cultivo, alimentación y mantenimiento de la producción de cultivos celulares que tienen un impacto positivo en la viabilidad celular y la recuperación de proteínas. El desarrollo de los procedimientos de fabricación de proteínas recombinantes es un empeño complejo en el que se tienen que equilibrar muchas variables. Esto es particularmente cierto para los procedimientos corriente arriba, en los que cada elemento del procedimiento de cultivo celular tiene un gran impacto sobre los últimos estadios de la producción, particularmente la recolección y el procesamiento corriente abajo.

Un cultivo celular típico experimenta una fase de crecimiento, este es un periodo de crecimiento exponencial en el que la densidad celular aumenta. La fase de crecimiento continúa con una fase de transición en el que el crecimiento celular exponencial se ralentiza y la producción de proteína comienza a aumentar. Esto marca el inicio de la fase estacionaria, una fase de producción, en la que la densidad celular normalmente baja de nivel y el título de producto aumenta. En los sistemas de recolección por lotes, en los que el cultivo celular se mantiene durante un número fijo de días seguido por la recolección de todo el cultivo a la vez, la mayoría del producto se puede producir en los últimos pocos días antes de la recolección cuando el cultivo celular normalmente ha alcanzado su mayor rendimiento. Si bien esto puede resultar en una única recolección con un título alto, es a expensas de un tiempo de respuesta no productivo para iniciar la siguiente ejecución y el tiempo de demora para alcanzar nuevamente la producción máxima. En los sistemas de recolección continua, en los que el permeado que contiene el producto se recolecta del cultivo celular en una base continua a lo largo de la fase de producción, la duración del cultivo celular se extiende, pero a expensas de títulos de producto menores y mayores volúmenes de residuos del fluido de cultivo celular con los que hay que lidiar durante los estadios de recolección y purificación.

El desarrollo del procedimiento de cultivo celular y recolección es en último término un ejercicio en proceso de optimización, tratando variables tales como la velocidad de procesamiento para el título de producto y la calidad del producto. Los desafíos incluyen, por ejemplo, el mantenimiento de la viabilidad celular, la consecución de un título de producto con el que se pueda trabajar, y equilibrar el rendimiento del procesamiento corriente arriba con el que pueda manejarse la recolección y los procesamientos corriente abajo.

Son valiosos los nuevos métodos de procesamiento que proporcionan incluso mejoras crecientes en la producción y recuperación de proteínas recombinantes, dado el coste de los procedimientos de cultivo celular a gran escala y la creciente demanda de mayores cantidades y menores costes de productos biológicos. Se necesitan mejoras en los procedimientos de cultivo celular que puedan dar lugar a una mayor recuperación de producto, reduciendo por esto los costes asociados con la fabricación de proteínas terapéuticas. La invención cumple con estas necesidades proporcionando dichos métodos y materiales para extender la duración del cultivo celular mientras se aumenta la recuperación de proteínas.

**Sumario de la invención**

La invención proporciona un método para extender una recolección periódica que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo medio de cultivo celular fresco en el biorreactor, pasando el cultivo celular a través de un filtro y recolectando un permeado, en el que se recolecta inicialmente un permeado nulo hasta que se alcanza un primer parámetro predeterminado, a cuyo momento se recolecta una cosecha durante un tiempo predeterminado, seguido por una recolección alteradamente de un permeado nulo hasta que se alcanza un segundo parámetro predeterminado, recolectando entonces un permeado de cosecha durante un tiempo predeterminado, en el que la recolección alternante de permeado nulo y permeado de cosecha continúa hasta que se termina el cultivo celular.

En una realización el parámetro predeterminado se selecciona de entre el tiempo, la densidad celular viable, volumen celular empaquetado o título.

En una realización, el primer parámetro predeterminado es al menos de 12 horas a 25 días después del establecimiento del cultivo celular. En una realización, el primer parámetro predeterminado es al menos de 24 a 72 horas después del establecimiento del cultivo celular. En una realización, el primer parámetro predeterminado es al

- 5 menos de 4 días después del establecimiento del cultivo celular. En una realización, el primer parámetro predeterminado es al menos de 5 o más días después del establecimiento del cultivo celular. En una realización, el primer parámetro predeterminado es al menos de 25 días después del establecimiento del cultivo celular. En una realización, el primer parámetro predeterminado es al menos de 5 a 25 días después del establecimiento del cultivo celular. En una realización, el primer parámetro predeterminado es al menos de 10 a 12 días después del establecimiento del cultivo celular.
- 10 En una realización, el segundo parámetro predeterminado es al menos de 12 a 72 horas después de la recolección del permeado de cosecha. En una realización, el segundo parámetro predeterminado es al menos de 24 a 72 horas después del permeado de cosecha. En una realización, el segundo parámetro predeterminado es al menos de 24 a 48 horas después de la recolección del permeado de cosecha.
- 15 En una realización el tiempo predeterminado es al menos de 12 a 72 horas. En una realización, el tiempo predeterminado es al menos de 24 a 72 horas. En una realización, el tiempo predeterminado es al menos de 24 a 48 horas.
- 20 En una realización, el permeado nulo se recolecta inicialmente durante al menos 24 horas a 25 días, en cuyo tiempo se recolecta el permeado de cosecha durante 12 a 72 horas, seguido por la recolección de manera alterna de un permeado nulo durante al menos 24 horas a 25 días, recolectando entonces un permeado de cosecha durante 12 a 72 horas.
- 25 En una realización, cuando se recolecta el permeado nulo, el filtro es un filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (Molecular Weight Cut Off, MWCO) que retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En una realización relacionada el corte de peso molecular es de 300 kDa o menos. En una realización relacionada el filtro de fibra hueca es un ultrafiltro.
- 30 En una realización en la que el permeado de cosecha se recolecta, el filtro es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En una realización relacionada el corte de peso molecular es al menos de 500 kDa. En una realización relacionada el filtro de fibra hueca es un microfiltro.
- 35 En una realización, el filtro es un sistema de filtro de una sola unidad. En una realización relacionada en la que el sistema de filtro de una sola unidad comprende al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que retiene la proteína recombinante en el biorreactor y al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En una realización relacionada el corte de peso molecular de al menos un componente de filtro de fibra hueca que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es de 300 kDa o menos. En una realización relacionada el corte de peso molecular de al menos un componente de filtro de fibra hueca que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es al menos de 500 kDa. En una realización relacionada al menos un componente de filtro de fibra hueca que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un ultrafiltro y al menos un componente de filtro de fibra hueca que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un microfiltro. En una realización relacionada, el sistema de filtro de una sola unidad está contenido en una carcasa. En una realización relacionada el sistema de filtro de una sola unidad comprende adicionalmente un espaciador entre al menos dos componentes del filtro de fibras huecas.
- 45 En una realización cuando se recolecta el permeado nulo se extrae desde al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que retiene la proteína recombinante en el biorreactor.
- 50 En una realización cuando el permeado de cosecha se recolecta, se extrae desde al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor.
- 55 En una realización cuando el permeado se recolecta de un filtro que es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor, el medio de cultivo celular reciente se formula con o se suplementa para conseguir al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico. En una realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es un copolímero en bloque de polioxipropileno-polioxietileno. En una realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es poloxamer 188.
- 60 En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante el procedimiento de cultivo celular, evaluando las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativamente las características de la proteína recombinante y/o el procedimiento de cultivo celular. En una realización relacionada las muestras se controlan cuantitativa y/o cualitativamente utilizando técnicas de procesamiento analítico.
- 65 En una realización la perfusión es una perfusión continua. En una realización la velocidad de perfusión es constante. En una realización la perfusión se lleva a cabo a una velocidad de menos de o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por

día. En una realización la perfusión se consigue mediante una bomba peristáltica, una bomba de doble diafragma, una bomba de bajo cizallamiento o de flujo tangencial alternante. En una realización relacionada la perfusión se consigue por flujo tangencial alternante.

5 En una realización el método anterior comprende adicionalmente someter el cultivo celular a un cambio de temperatura en el que las células se cultivan a) a una primera temperatura durante un primer periodo de tiempo y b) a una segunda temperatura durante un segundo periodo de tiempo. En una realización relacionada el cambio de temperatura se produce en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura se produce durante la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado. En una realización relacionada el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado en el que la consecución del parámetro predeterminado se determina utilizando una sonda de biomasa basada en la capacitancia.

10 En una realización el cultivo celular se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,1 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización relacionada el inóculo se cultiva por medio de un procedimiento de perfusión utilizando filtración de flujo tangencial alternante.

15 En una realización antes de la entrada en el biorreactor, el medio de cultivo celular se trata utilizando nanofiltración, alta temperatura en corto tiempo (HTST), o UV en combinación con la filtración.

20 En una realización, el biorreactor es un biorreactor de producción. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l a 2000 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 1000 l a 2000 l.

25 En una realización, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular libre de suero. En una realización el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero. En una realización el medio de cultivo es un medio de cultivo celular de perfusión.

30 En una realización, las células de mamífero son células de Ovario de Hámster Chino (CHO). En una realización, la proteína recombinante se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citocina.

35 En una realización, la proteína recombinante se purifica del permeado de cosecha mediante uno o más de entre floculación, precipitación, centrifugación, filtración profunda, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía en hidroxipatita. En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante el procedimiento de purificación, la evaluación de las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativa las características de la proteína recombinante y el procesamiento de purificación.

40 En una realización, la proteína recombinante se formula en una formulación farmacéuticamente aceptable. En una realización se proporciona una proteína recombinante producida por el método anterior.

45 La invención también proporciona un método para la recolección de una proteína recombinante que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para alcanzar una concentración de al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico y pasando el cultivo celular a través de un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor y recolectando un permeado que contiene la proteína recombinante.

50 En una realización el corte de peso molecular es al menos de 500 kDa. En una realización el filtro de fibra hueca es un microfiltro.

55 La invención también proporciona un método para recolectar una proteína recombinante que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, el mantenimiento del cultivo celular perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para alcanzar una concentración de al menos 1 g/l de un copolímero en bloque no iónico y pasando el cultivo celular a través de un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que retiene la proteína recombinante en el biorreactor, y recolectar un permeado, una vez que se alcanza un parámetro predeterminado perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para alcanzar una concentración de al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico y pasando el cultivo celular a través de un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor y recolectar un permeado que contiene la proteína recombinante.

65 En una realización el corte de peso molecular del filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso

## ES 2 709 994 T3

molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es de 300 kDa o menos. En una realización, el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un ultrafiltro.

5 En una realización el corte de peso molecular del filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es al menos de 500 kDa. En una realización el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un microfiltro.

10 En una realización el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor y el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor son componentes de un sistema de filtro de solo una unidad.

15 En una realización, el copolímero en bloque no iónico es un copolímero en bloque de polioxipropileno-polioxietileno. En una realización el copolímero en bloque no iónico es poloxamer 188.

20 En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante los procedimientos de cultivo celular, evaluando las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativamente las características de la proteína recombinante y/o el procedimiento de cultivo celular. En una realización, las muestras se controlan cuantitativa y/o cualitativamente utilizando técnicas de procesamiento analítico.

25 En una realización la perfusión es una perfusión continua. En una realización la velocidad de perfusión es constante. En una realización la perfusión se lleva a cabo a una velocidad menor o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por día. En una realización la perfusión se consigue mediante una bomba peristáltica, una bomba de doble diafragma, una bomba de bajo cizallamiento o de flujo tangencial alternante. En una realización, la perfusión se consigue por flujo tangencial alternante.

30 En una realización el método anterior comprende adicionalmente someter el cultivo celular a un cambio de temperatura en el que las células se cultivan a) a una primera temperatura durante un primer periodo de tiempo y b) a una segunda temperatura durante un segundo periodo de tiempo. En una realización relacionada, el cambio de temperatura se produce en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura se produce durante la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado. En una realización relacionada el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado en el que la consecución del parámetro predeterminado se determina utilizando una sonda de biomasa basada en la capacitancia.

35 En una realización el cultivo celular se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,1 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización, el inóculo se cultiva por medio de un procedimiento de perfusión utilizando filtración de flujo tangencial alternante.

En una realización antes de la entrada en el biorreactor, el medio de cultivo celular se trata utilizando nanofiltración, alta temperatura en corto tiempo (HTST), o UV en combinación con la filtración.

45 En una realización, el biorreactor es un biorreactor de producción. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l a 2000 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 1000 l a 2000 l.

50 En una realización, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular libre de suero. En una realización el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero. En una realización el medio de cultivo es un medio de cultivo celular de perfusión.

En una realización, las células de mamífero son células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

55 En una realización, la proteína recombinante se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citocina.

60 En una realización, la proteína recombinante se purifica del permeado de cosecha mediante uno o más de entre floculación, precipitación, centrifugación, filtración profunda, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía en hidroxipatita.

65 En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante el procedimiento de purificación, la evaluación de las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativa las características de la proteína recombinante y el procesamiento de purificación.

En una realización la proteína recombinante se formula en una formulación farmacéuticamente aceptable.

En una realización, se proporciona una proteína recombinante producida por el método anterior.

5 La invención también proporciona un sistema de filtro de una sola unidad que comprende dos o más componentes del filtro de fibras huecas de diferentes tamaños de poro o cortes de peso molecular (MWCO), en el que los componentes del filtro de fibras huecas se aseguran entre ellos en serie de manera que se mantiene una vía de flujo entre las fibras huecas individuales y los componentes del filtro de fibras huecas de diferentes tamaños de poro o cortes de peso molecular se aíslan entre ellos con respecto a sus lados de cubierta hueca de los que se retira el permeado, de manera que el permeado se puede retirar independiente de cada componente de filtro de fibra hueca respectiva.

10 En una realización al menos un componente de filtro de fibra hueca tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor y al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un filtro con un tamaño de poro que es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En una realización relacionada al menos un componente de filtro de fibra hueca tiene un corte de peso molecular de 399 kDa o menos y al menos un componente de filtro de fibra hueca tiene un corte de peso molecular de al menos 500 kDa. En una realización relacionada al menos un componente de fibra hueca es un ultrafiltro y al menos un componente de filtro de fibra hueca es un microfiltro. En una realización relacionada el sistema de filtro de una sola unidad está contenido en una carcasa. En una realización, el filtro de una sola unidad comprende un espaciador entre al menos dos de los componentes del filtro de fibras huecas.

15 El método también proporciona un método para cultivar las células que expresan una proteína recombinante que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo un medio de cultivo celular reciente en el biorreactor, pasando el cultivo celular a través de un sistema de filtro de una sola unidad y recolectando un permeado, en el que el sistema de filtro de una sola unidad se une al biorreactor y el cultivo celular se extrae del biorreactor y se mete en el sistema de filtro de una sola unidad por un único sistema de bombeo, en el que el cultivo celular pasa a través del lado de la luz de las fibras huecas del sistema de filtro de una sola unidad y vuelve al biorreactor y se retira un permeado de uno o más de los componentes del filtro de fibras huecas.

20 En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante el procedimiento de cultivo celular, evaluando las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativamente las características de la proteína recombinante y/o el procedimiento de cultivo celular. En un procedimiento relacionado las muestras se controlan cuantitativa y/o cualitativamente utilizando técnicas de procesamiento analítico.

25 En una realización la perfusión es una perfusión continua. En una realización la velocidad de perfusión es constante. En una realización la perfusión se lleva a cabo a una velocidad de menos de o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por día.

30 En una realización la perfusión se consigue mediante una bomba peristáltica, una bomba de doble diafragma, una bomba de bajo cizallamiento o de flujo tangencial alternante. En una realización relacionada la perfusión se consigue por flujo tangencial alternante.

35 En una realización cuando el permeado se recolecta de un filtro que es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor, el medio de cultivo celular reciente se formula con o se suplementa para conseguir al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico. En una realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es un copolímero en bloque de polioxipropileno-polioxietileno. En una realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es poloxamer 188.

40 En una realización el método anterior comprende adicionalmente someter el cultivo celular a un cambio de temperatura en el que las células se cultivan a) a una primera temperatura durante un primer periodo de tiempo y b) a una segunda temperatura durante un segundo periodo de tiempo. En una realización el cambio de temperatura se produce en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura se produce durante la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado donde la consecución del parámetro predeterminado se determina utilizando una sonda de biomasa basada en la capacitancia.

45 En una realización el cultivo celular se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,1 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización relacionada el inóculo se cultiva por medio de un procedimiento de perfusión utilizando filtración de flujo tangencial alternante.

50 En una realización antes de la entrada en el biorreactor, el medio de cultivo celular se trata utilizando nanofiltración, alta temperatura en corto tiempo (HTST), o UV en combinación con la filtración. En una realización, el biorreactor es un biorreactor de producción. En una realización relacionada el biorreactor tiene

una capacidad de al menos 500 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l a 2000 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 1000 l a 2000 l.

5 En una realización, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular libre de suero. En una realización el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero. En una realización el medio de cultivo es un medio de cultivo celular de perfusión.

En una realización, las células de mamífero son células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

10 En una realización, la proteína recombinante se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citocina.

15 En una realización, la proteína recombinante se purifica del permeado de cosecha mediante uno o más de entre floculación, precipitación, centrifugación, filtración profunda, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía en hidroxiapatita.

20 En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante el procedimiento de purificación, la evaluación de las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativa las características de la proteína recombinante y el procesamiento de purificación.

En una realización la proteína recombinante se formula en una formulación farmacéuticamente aceptable. En una realización, se proporciona una proteína recombinante producida por el método anterior.

## 25 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Vista esquemática de un sistema de filtro de una sola unidad, que tiene una única abertura por donde entre el fluido de cultivo celular y sale a través de una única abertura. Los filtros pueden estar en cualquier orientación, se muestra un microfiltro de fibras huecas seguido por un ultrafiltro de fibras huecas.

30 Figura 2. Título del proceso de recolección periódica extendida, n = 2 (cuadrados vacíos) comparado con el procedimiento de ultrafiltración, n = 4 (círculos rellenos).

35 Figura 3. Densidad celular viable del proceso de recolección periódica extendida, n = 2 (cuadrados vacíos) en comparación con el procedimiento de ultrafiltración, n = 4 (círculos rellenos).

Figura 4. Porcentaje de viabilidad del proceso de recolección periódica extendida, n = 2 (cuadrados vacíos) en comparación con el procedimiento de ultrafiltración, n = 4 (círculos rellenos).

40 Figura 5. Porcentaje de viabilidad de los reactores equipados con un filtro de 750 kDa (círculos vacíos) y de reactores equipados con filtros de 30 kDa (círculos rellenos). El porcentaje de viabilidad disminuía hasta el 80 % el día 6 en los reactores equipados con filtros de 750 kDa. El porcentaje de viabilidad de los reactores equipados con los filtros de 30 kDa se mantuvo a >80 % durante 14 días.

45 Figura 6. Concentraciones de Lutrol® F68 medidas en el sobrenadante (círculos rellenos) y el permeado (cuadrados vacíos) de reactores con una unidad de filtro de fibras huecas de 30 kDa o 750 kDa. El sobrenadante de 30 kDa muestra una acumulación de Lutrol® F68 sobre los días 9-13.

50 Figura 7A. Densidad celular viable normalizada para las líneas celulares A y B con cada concentración de Lutrol® F68 (2 g/l-5 g/l) en comparación con 1 g/l, dando la relación de densidad celular. Se hicieron comparaciones utilizando ensayos t de Student entre los datos de todos los pasajes comparados con el de 1 g/l. Significación estadística \* <0,0001; \*\* <0,001; \*\*\* <0,01; \*\*\*\* <0,05.

55 Figura 7B. Porcentaje de viabilidad para las líneas celulares A y B con cada concentración de Lutrol® F68 (2 g/l-5 g/l) en comparación con 1 g/l. Se hicieron las comparaciones utilizando ensayos t de Student entre los datos de todos los pasajes comparados con el de 1 g/l. Significación estadística \* <0,0001; \*\* <0,001; \*\*\* <0,01; \*\*\*\* <0,05.

60 Figura 7C. Diámetro celular para las líneas celulares A y B con cada concentración de Lutrol® F68 en comparación con el diámetro de la célula a 1 g/l de Lutrol® F68. Se hicieron las comparaciones utilizando ensayos t de Student entre los datos de todos los pasajes comparados con el de 1 g/l. Significación estadística \* <0,0001; \*\* <0,001; \*\*\* <0,01; \*\*\*\* <0,05.

65 Figura 8. Porcentaje de viabilidad celular para las líneas celulares A y B a 1 g/l de Lutrol® F68 (cuadrados vacíos) y 5 g/l de Lutrol® F68 (círculos llenos). La viabilidad se mantuvo a >90 % durante >30 días cuando la concentración de Lutrol® F68 se aumentaba a 5 g/l.

Figura 9. El efecto de la concentración de pluronic sobre la viabilidad de las células cultivadas en reactores de 2 l

con un filtro ATF de 750 kDa con perfusión de medios que contenían 1 g/l de Lutrol® F68 (cuadrados llenos) o 5 g/l de Lutrol® F68 (círculos vacíos).

5 Figura 10 El efecto del aumento de la concentración de Lutrol® F68 (hasta 5 g/l) sobre la recuperación de viabilidad de células en cultivo con 1 g/l de Lutrol® F68 en reactores de 2 l con un filtro ATF de 750 kDa. Medio A: círculos llenos. Medio B: círculo vacío. La flecha indica cuando se aumentó la concentración de Lutrol® F68.

10 Figura 11. Cuantificación por GCMS de glucosa y manosa. (A) TIC para la separación por GC de hexosas y (B) patrón de fragmentación de espectro de masas típico que se encuentra en los picos de hexosa que contenían tanto 12C-hexosa como 13C-hexosa de referencia interna. (C) Ensayo de linealidad para la cuantificación de glucosa y manosa.

15 Figura 12. El efecto de manosa sobre la glicosilación con manosa alta de IgG. (A) células CHO cultivadas con cantidades crecientes de manosa; (B) células CHO cultivadas con cantidades crecientes de manosa y a diferentes concentraciones de glucosa. El aumento lineal de glicosilación con manosa alta es independiente de la concentración de glucosa.

20 Figura 13. Vista esquemática del bucle de retroalimentación PAC. Los elementos clave del procedimiento PAC necesarios para los atributos de suministro de una calidad de producto predefinida son los QTPP, un sistema PAT que incluye la toma de muestras automática y atribuye analíticas específicas, un modelo de control para modificar el procesamiento y un procedimiento con palancas de control conocidas para ajustar los niveles de atributo.

25 Figura 14. Se utilizó una única ejecución del reactor para calcular los parámetros modelo mediante regresión de cuadrados mínimos. Los símbolos son mediciones utilizadas para encontrar los parámetros modelo mediante regresión de cuadrados mínimos. Las líneas sombreadas son los resultados que resultan del modelo. Las líneas de puntos son los ajustes del modelo utilizando los parámetros de cultivo que se utilizaron para MPC. Las líneas rojas continuas de las figuras A y B muestran la alimentación de manosa utilizada para generar estos datos de entrenamiento. A) % con manosa alta; B) Concentración de manosa en el reactor; C) Densidad celular (volumen calculado escalado arbitrariamente); D) Concentración del producto.

30 Figura 15. Demostración del control de % con manosa alta mediante el Control de Modelo Predictivo. En todas las figuras los símbolos son valores medidos, pero solo los símbolos vacíos se utilizaron para el Control de Modelo Predictivos. La línea de puntos es el resultado del modelo que da las mediciones y la acción de control que se tomó. Las líneas continuas rojas de las figuras A y B muestran la alimentación con manosa determinada por MPC. A) % con manosa alta; B) Concentración de manosa en el reactor; C) Densidad celular como volumen calculado escalado arbitrariamente (SCV); D) Concentración de producto.

40 Figura 16. Comparación de datos del PAC y no PAC. Los datos de % con manosa alta se obtuvieron mediante el ensayo HILIC.

### Descripción detallada de la invención

45 La invención proporciona un método de recolección periódica extendida que ofrece la ventaja de mantener un cultivo celular continuo en su pico de producción mientras que se obtiene un alto título de permeado. La invención proporciona un método para una recolección periódica extendida que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan un producto proteico recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo medio de cultivo celular reciente en el biorreactor, pasando el cultivo celular a través de un filtro y recolectando un permeado, en el que se recolecta inicialmente un permeado nulo hasta  
50 que se alcanza un primer parámetro predeterminado, en cuyo momento se recolecta un permeado de cosecha durante un tiempo predeterminado, esto continúa recolectando de manera alterna un permeado nulo hasta que se alcanza un segundo parámetro predeterminado, recolectando entonces un permeado de cosecha durante un tiempo predeterminado, en el que la recolección alternante del permeado nulo y el permeado de cosecha continúa hasta que se termina el cultivo celular.

55 Los parámetros predeterminados se pueden alcanzar consiguiendo algunas características deseadas, atributos o cumplimiento de una meta del cultivo celular; tal como una densidad celular viable, volumen o título celular empaquetado o momento. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar cuando la densidad celular viable es mayor o igual a  $1 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar cuando la densidad celular viable sea al menos de  $20 \times 10^6$  células viables/ml a  $30 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar cuando el volumen celular empaquetado es menor o igual al 35 %. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar cuando el volumen celular empaquetado es menor o igual al 30 %.

65

El parámetro predeterminado puede basarse en un tiempo determinado. El tiempo determinado se puede medir en horas, días, semanas, o meses después de un evento o acción desencadenante. Un evento o acción desencadenante puede ser horas o días en cultivo, horas o días después de un evento tal como alcanzar una densidad celular viable, volumen celular empaquetado, título, inoculación del biorreactor o recolección de un permeado de cosecha. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar en 12 horas a 25 días después del evento o acción desencadenante. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar en 4 días después del evento o acción desencadenante. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar en 5 días después del evento o acción desencadenante. En una realización, el parámetro predeterminado se puede alcanzar en 24 a 72 horas después de un evento o acción desencadenante. En una realización, el parámetro se puede alcanzar al menos 25 días después del evento o acción desencadenante. En una realización, el primer parámetro predeterminado se puede alcanzar en 5 a 25 días después de la inoculación del biorreactor. En una realización, el primer parámetro predeterminado se puede alcanzar en 10 a 12 días después de la inoculación del biorreactor. En una realización, un segundo parámetro predeterminado se puede alcanzar en 12 a 72 horas después de la recolección de un permeado de cosecha. En una realización, un segundo parámetro predeterminado se puede alcanzar en 24 a 72 horas después de la recolección de un permeado de cosecha. En una realización, un segundo parámetro predeterminado se puede alcanzar en 24 a 48 horas después de la recolección de un permeado de cosecha.

Una vez que el parámetro predeterminado se haya alcanzado se puede recolectar un permeado de cosecha durante un tiempo predeterminado. En una realización el tiempo predeterminado es al menos 12 a 72 horas. En una realización el tiempo predeterminado es 24 a 72 horas. En una realización el tiempo predeterminado es de 24 a 48 horas.

En una realización, el filtro es un sistema de filtro de una sola unidad. En una realización relacionada el sistema de filtro de una sola unidad comprende al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) que retiene la proteína recombinante en el biorreactor y al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En otra realización el corte de peso molecular de al menos un componente de filtro de fibra hueca que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es de 300 kDa o menos. En otra realización el corte de peso molecular de al menos un componente de filtro de fibra hueca que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es al menos de 500 kDa. En otra realización al menos un componente de filtro de fibra hueca que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un ultrafiltro y al menos un componente de filtro de fibra hueca que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un microfiltro. En otra realización relacionada, el sistema de filtro de una sola unidad está contenido en una carcasa. En una realización relacionada el sistema de filtro de una sola unidad está contenido en una carcasa. En otra realización el sistema de filtro de una sola unidad comprende adicionalmente un espaciador entre al menos dos componentes del filtro de fibras huecas.

En una realización cuando el permeado nulo se recolecta utilizando un sistema de filtro de una sola unidad se extrae de al menos un componente de filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene a proteína recombinante en el biorreactor. En una realización cuando el permeado de cosecha que se recolecta utilizando un sistema de filtro de una sola unidad se extrae de al menos un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En una realización el permeado se recolecta de un filtro que es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor, el medio de cultivo reciente se formula o suplementa para alcanzar al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico. En una realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es un copolímero en bloque de polioxipropileno-polioxietileno. En otra realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es poloxamer 188.

La invención también proporciona un método para la recolección de una proteína recombinante que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para alcanzar una concentración de al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico y pasando el cultivo celular a través de un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor y recolectando el permeado que contiene la proteína recombinante. En una realización el corte de peso molecular es al menos de 500 kDa. En una realización el filtro de fibra hueca es un microfiltro.

La invención también proporciona un método para la recolección de una proteína recombinante que comprende el establecimiento de un cultivo inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para alcanzar una concentración de al menos 1 g/l de un copolímero en bloque no iónico y pasando el cultivo celular a través de un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor, y recolectando un permeado; una vez que se alcanza un parámetro predeterminado, perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para alcanzar una concentración de al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico y pasando el cultivo celular a través de un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no

- retiene la proteína recombinante en el biorreactor y recolectando un permeado que contienen la proteína recombinante. En una realización el corte de peso molecular del filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es de 300 kDa o menos. En una realización relacionada el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un ultrafiltro. En una realización el corte de peso molecular del filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es al menos de 500 kDa. En una realización relacionada el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un microfiltro. En una realización el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor y el filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor son componentes de un sistema de filtro de una sola unidad. En una realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es un copolímero en bloque polioxipropileno-polioxietileno. En otra realización relacionada el copolímero en bloque no iónico es poloxamer 188.
- 15 La invención también proporciona un sistema de filtro de una sola unidad que comprende dos o más componentes de fibra hueca de diferentes tamaños de poro o corte de peso molecular, en el que los componentes del filtro de fibras huecas están asegurados entre ellos en serie de manera que se mantiene la vía de flujo estéril entre las fibras huecas individuales y los componentes del filtro de fibras huecas de diferentes tamaños de poro o cortes de peso molecular se aíslan entre ellos con respecto a los lados de su cubierta hueca de la que el permeado se retira, de manera que el permeado se puede retirar independientemente de cada componente de filtro de fibra hueca. En una realización, al menos un componente del filtro de fibra hueca tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína en el biorreactor y al menos un componente de filtro de fibra hueca tiene un tamaño de poro de filtro que es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor. En una realización, al menos un componente de filtro de fibra hueca tiene un corte de peso molecular de 300 kDa o menos y al menos un componente de filtro de fibra hueca tiene un corte de peso molecular de 500 kDa. En una realización al menos un componente de filtro de fibra hueca es un ultrafiltro y al menos un componente de filtro de fibra hueca es un microfiltro. En una realización, el sistema de filtro de una sola unidad está contenido en una carcasa. En una realización, el sistema de filtro de una sola unidad comprende adicionalmente un espaciador entre al menos dos de los componentes del filtro de fibras huecas.
- 20 En una realización relacionada, la invención proporciona un método para el cultivo de células y/o recolección de una proteína recombinante que comprende la expresión de una proteína recombinante que comprende el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante, manteniendo el cultivo celular perfundiendo medio de cultivo celular reciente en el biorreactor, pasando el cultivo celular a través de un sistema de filtro de una sola unidad y recolectando un permeado, en el que el sistema de filtro de una sola unidad se une al biorreactor y el cultivo celular se extrae del biorreactor y se mete en el sistema de filtro de una sola unidad mediante un único sistema de bombeo, en el que el cultivo celular pasa a través del lado de la luz de las fibras huecas del sistema de filtro de una sola unidad y vuelve al biorreactor y una permeado se retira de uno o más de los componentes de filtros de fibras huecas.
- 25 En una realización relacionada los métodos de la invención comprenden adicionalmente la toma de muestra durante los procedimientos de cultivo celular, la evaluación de muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativamente las características de la proteína recombinante y/o el procedimiento de cultivo celular. En una realización relacionada las muestras se controlan cuantitativa y/o cualitativamente utilizando técnicas de procesamiento analítico.
- 30 En una realización relacionada de los métodos de la invención la perfusión es una perfusión continua. En una realización la velocidad de perfusión es constante. En una realización la perfusión se lleva a cabo a una velocidad menor o igual a 1,0 volumen de trabajo por día. En una realización, la perfusión se consigue mediante una bomba peristáltica, una bomba de doble diafragma, una bomba de baja cizalladura o de flujo tangencial alternante. En una realización, la perfusión se consigue mediante flujo tangencial alternante.
- 35 En una realización relacionada, los métodos de la invención comprenden adicionalmente someter el cultivo celular a un cambio de temperatura en el que las células se cultivan a) a una primera temperatura durante un primer periodo de tiempo y B) a una segunda temperatura durante un segundo periodo de tiempo. En una realización, el cambio de temperatura se produce en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización, el cambio de temperatura se produce durante la fase de producción. En una realización el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado en el que se determina la consecución del parámetro predeterminado utilizando una sonda de biomasa basada en la capacitancia. En una realización el cambio de temperatura es en respuesta a un parámetro predeterminado en el que se determina la consecución del parámetro predeterminado utilizando una sonda de biomasa basada en la capacitancia.
- 40 En una realización relacionada de los métodos de la invención el cultivo celular se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,1 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización el inóculo se cultivó por medio de un proceso de perfusión utilizando filtración de flujo tangencial alternante. En una realización, antes de la entrada en el biorreactor, el medio de cultivo celular se trata utilizando nanofiltración, alta temperatura en corto tiempo (HTST), o UV en combinación con filtración.

En una realización relacionada de los métodos de la invención el biorreactor es un biorreactor de producción. En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l. En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l a 2000 l. En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de al menos 1000 l a 2000 l.

5 En una realización relacionada de los métodos de la invención, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero. En una realización, el medio de cultivo es un medio de cultivo celular de perfusión. En una realización, las células de mamífero son células de Ovario de Hámster Chino (CHO). En una realización, la proteína recombinante se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante, o una citocina.

10 En una realización relacionada de los métodos de la invención, la proteína recombinante se purifica del permeado de cosecha por uno o más de entre floculación, precipitación, centrifugación, filtración profunda, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía en hidroxiapatita. En una realización el método anterior comprende adicionalmente la toma de muestras durante el procedimiento de purificación, la evaluación de las muestras para controlar cuantitativa y/o cualitativa las características de la proteína recombinante y el procesamiento de purificación. En una realización las muestras se controlan cuantitativa y/o cualitativamente utilizando técnicas de procesamiento analítico. En una realización, la proteína recombinante se formula en una formulación farmacéuticamente aceptable.

#### Cultivo celular

25 Por "cultivo celular" o "cultivo" se quiere decir el crecimiento y propagación de células fuera de un organismo multicelular o tejido. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células de mamífero se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Las células de mamífero se pueden cultivar en suspensión o mientras están unidas a un sustrato sólido.

30 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "medio de cultivo celular" (también llamado "medio de cultivo", "medio de cultivo tisular") se refiere a cualquier solución nutritiva utilizada para el cultivo de células, por ejemplo, células animales o de mamífero, y que proporciona en general al menos uno o más componentes de entre los siguientes: una fuente de energía (habitualmente en forma de un carbohidrato como la glucosa); uno o más de todos los aminoácidos esenciales, y en general los veinte aminoácidos básicos, más cisteína; vitaminas y/u otros compuestos orgánicos necesarios normalmente a bajas concentraciones; lípidos o ácidos grasos libres; y elementos traza, por ejemplo, compuestos inorgánicos o elementos de origen natural que normalmente se necesitan a muy bajas concentraciones, normalmente en el intervalo micromolar.

40 La solución nutritiva puede suplementarse opcionalmente con componentes adicionales para optimizar el crecimiento de las células, tales como hormonas y otros factores de crecimiento, tales como insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, suero y similares; sales, tales como de calcio, magnesio y fosfatos, y tampones, por ejemplo, HEPES; nucleótidos y bases, tales como adenosina, timidina, hipoxantina; y proteínas e hidrolizados tisulares, tales como proteínas animales o vegetales hidrolizadas (peptona o mezclas de peptona, que se pueden obtener de subproductos animales, gelatina purificada o material vegetal); antibióticos tales como gentamicina; poliaminas, tales como putrescina, espermidina, y espermina (véase, Publicación WIPO N.º WO 2008/154014) y piruvato (véase la Patente de EE. UU. N.º 8053238), compuestos anti-apoptóticos, por ejemplo, MDL 28170, cipermetrina, ciclosporina A, BBMP, ácido Bongkrékico, difumerato S-15176, pifitrina- $\alpha$  cíclica, pifitrina mu, BI-6C9, NSCI, NS3694 o Necrostatina-1 (véase, la Publicación WIPO N.º WO 2014/022102) dependiendo de las necesidades de las células que se van a cultivar y/o los parámetros del cultivo celular deseados.

50 También se pueden añadir tensioactivos no iónicos al medio de cultivo celular. Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen, pero no se limitan a, alcohol polivinílico, polietilenglicol, tensioactivos copolímeros en bloque. También se incluyen óxido de alquilpolietileno, copolímeros de óxido polietileno) y poli(óxido de propileno (copolímeros en bloque EO-PO), poli(vinilpirrolidona), alquil poliglucósidos (tal como monoestearato de sacarosa, lauril diglucósido o monolaurato de sorbitan, octil glucósido y decil maltósido), alcoholes de ácidos grasos (alcohol cetílico o alcohol olefílico, o cocamidas (cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA).

60 También se incluyen copolímeros en bloque basados en óxido de etileno y óxido de propileno, a los que también se hace referencia como copolímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno. Estas moléculas son copolímeros en tribloque no iónicos que tienen una cadena hidrófoba central de polioxietileno (óxido de poli(propileno)) flanqueado por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (óxido de poli(etileno)). De particular interés son los que tienen 70 unidades de polioxipropileno y 30 unidades de cada una de las cadenas de polioxietileno. En una realización preferida el copolímero en bloque es poloxamer 188 (CAS n° 90003-11-6 con un peso molecular medio de 8,4 kd, BASF Chemical, Washington, NJ) que se vende con distintos nombres comerciales tales como Pluronic® F68, Kolliphor® P-188, Lutrol® F68, y Lutrol® 188.

65

- Estos copolímeros en bloque polioxipropileno-polioxietileno se utilizan para proteger las células de la muerte inducida por las burbujas debido al salpicado y la espuma en el reactor. Como se describe en el presente documento, el nivel de poloxamer 188 que se utiliza normalmente en el medio de cultivo celular (1 g/l) puede no ser suficiente para proteger las células de las fuertes fuerzas de cizalladura en un sistema de perfusión de flujo tangencial alternante (ATF) cuando los cultivos celulares se exponen a microfiltración. Como se ha descrito en el presente documento, la adición de un copolímero en bloque de polioxipropileno-polioxietileno, tal como poloxamer 188, a concentraciones más altas, tales como de 5 g/l, tenía un impacto positivo sobre la viabilidad células, que hacía posible una duración más larga del cultivo en condiciones de perfusión ATF.
- El medio de cultivo celular incluye los que se emplean normalmente y/o se conocen por su uso en cualquier procedimiento de cultivo celular, tal como, pero no limitados a, cultivo de células por lotes, lotes extendidos, semi-continuo y/o de perfusión o continuo.
- Un medio de cultivo o medio de alimentación “base” (o lote) se refiere a un medio de cultivo celular que se utiliza normalmente para iniciar un cultivo celular y es suficientemente completo para completar el soporte del del cultivo celular.
- Un medio de cultivo o medio de alimentación de “crecimiento” se refiere a un medio de cultivo celular que se utiliza normalmente en los cultivos celulares durante un periodo de crecimiento exponencial, una “fase de crecimiento”, y es suficientemente completo para soportar el cultivo celular durante esta fase. Un medio de cultivo celular de crecimiento también puede contener agentes de selección que confieren resistencia o supervivencia a los indicadores genéticos incorporados en la línea celular huésped. Dichos agentes de selección incluyen, pero no se limitan a geneticina (G4118), neomicina, higromicina B, puromicina, zeocina, metionina sulfoximina, metotrexato, medio de cultivo celular libre de glutamina, medio de cultivo celular que carece de glicina, hipoxantina y timidina, o solo timidina.
- Un medio de cultivo celular o medio de alimentación de “producción” se refiere a un medio de cultivo celular que se utiliza normalmente en cultivos celulares durante la transición cuando termina el crecimiento exponencial y durante las fases posteriores de transición y/o producción cuando la producción de proteína tiene lugar. Dicho medio de cultivo es suficientemente completo para mantener una densidad celular, viabilidad y/o título de producto deseados durante esta fase.
- Un medio de cultivo celular o medio de alimentación de “perfusión” se refiere a un medio de cultivo celular que se utiliza normalmente en cultivos celulares que se mantienen por perfusión o métodos de cultivo continuo y es suficientemente completo para soportar el cultivo celular durante este proceso. Las formulaciones de medio de cultivo celular de perfusión pueden ser más ricas o más concentradas que las formulaciones de medio de cultivo celular base para acomodarse el método que se utilice para retirar el medio gastado. El medio de cultivo celular de perfusión puede utilizarse en las fases tanto de crecimiento como de producción.
- Los componentes del medio de cultivo celular pueden estar completamente molidos en una formulación de medio en polvo; parcialmente molidos con adición de suplementos líquidos al medio de cultivo celular según se necesite; o añadidos en forma completamente líquida al cultivo celular.
- Los cultivos celulares se pueden suplementar con medio de alimentación concentrado que contiene los componentes, tales como nutrientes y aminoácidos, que se consumen durante el curso de la fase de producción del cultivo celular. El medio de cultivo celular concentrado puede contener algunos o todos los nutrientes necesarios para mantener el cultivo celular; en particular, el medio concentrado puede contener nutrientes identificados o que se sabe que se consumen durante el curso de la fase de producción del cultivo celular. El medio concentrado puede basarse en justo aproximadamente cualquier formulación de medio de cultivo celular. El medio de alimentación concentrado puede contener algunos o todos los componentes del medio de cultivo celular, por ejemplo, con aproximadamente 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, o incluso aproximadamente 1000X su cantidad normal.
- Los cultivos celulares también se pueden suplementar con alimentaciones concentradas independientes de nutrientes particulares que pueden ser difíciles de formular o se agotan rápidamente en los cultivos celulares. Dichos nutrientes pueden ser aminoácidos tales como tirosina, cisteína y/o cistina (véase, por ejemplo, la publicación WIPO N.º 2012/145682). En una realización, se alimenta con una solución concentrada de tirosina y cistina independientemente al cultivo celular que se va a cultivar en un medio de cultivo celular que carece de tirosina y cistina o cisteína. Las alimentaciones independientes pueden comenzar antes de o al inicio de la fase de producción. Las alimentaciones independientes se pueden conseguir por alimentación por lotes del medio de cultivo el mismo o diferentes días como medio de alimentación concentrado. Dichas alimentaciones independientes se pueden añadir al medio de cultivo celular después de uno o más días, y también se pueden añadir repetidamente durante el curso de la fase de producción, de manera que se evite el agotamiento de tirosina, cisteína y cistina.
- Se pueden emplear métodos para alimentar continuamente un cultivo de células de mamífero, tal como los que no emplean un control de retroalimentación (véase la Publicación WIPO N.º WO 2013/040444).

El medio de cultivo celular, en ciertas realizaciones, está libre de suero y/o libres de productos o ingredientes de origen animal. El medio de cultivo celular, en ciertas realizaciones, está definido químicamente, donde todos los componentes químicos se conocen.

- 5 Las células animales o de mamífero se cultivan en un medio adecuado para celulares particulares que se cultivan y que se pueden determinar por el experto en la técnica sin mayor experimentación. Se pueden utilizar medios disponibles en el mercado e incluyen, pero no se limitan a, Medio de Dulbecco modificado de Iscove, RPMI1640, Medio Esencial Mínimo alfa (MEM-alfa), Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DME/F12, MEM alfa, Medio basal de Eagle con BSS de Earle, DMEM alto en glucosa, con glutamina, DMEM lato en glucosa, sin glutamina, DMEM bajo en glucosa, sin glutamina, DMEM-F12 1:1, con glutamina, GMEM (MEM de Glasgow), GMEM con glutamina, Medio de insectos completo de Grace, Medio de insectos de Grace, sin FBS, F-10 de Ham, con glutamina F-12 de Ham, con glutamina, IMDM con HEPES y glutamina, IMDM con HEPES y sin glutamina, medio de insecto IP41, 15 (Leibovitz) (2X), sin glutamina o Rojo Fenol, 15 (Leibovitz) sin glutamina, Medio modificado 5A de McCoy, Medio 199, MEM Eagle, sin glutamina o Rojo Fenol (2X), MEM Eagle – BSS de Earle, con glutamina, MEM Eagle-BSS de Earle, sin glutamina, MEM Eagle-BSS de Hanks, sin glutamina, NCTC-109, con glutamina, Medio CM de Richter, con glutamina, RPMI 1640 con HEPES, Glutamina y/o penicilina-estreptomicina, RPMI 1640, con glutamina, RPMI 1640, sin glutamina, Medio de insecto de Schneider o cualquier otro medio conocido por el experto en la técnica, que se formula para un tipo de célula en particular. A los medios anteriores ejemplares se pueden añadir componentes suplementarios o ingredientes, que incluyen componentes opcionales, en concentraciones o cantidades apropiadas, según sea necesario o se dese, y como se conoce y practica por los expertos en la técnica utilizando técnicas de rutina.

#### Tratamientos del medio

- 25 El medio de cultivo celular se puede tratar utilizando métodos o dispositivos para esterilizar o desinfectar el medio antes de la adición al biorreactor y/o cultivo celular. En una realización, el medio de cultivo celular se trata utilizando lata temperatura en corto tiempo (HTST) (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 7.420.183). En una realización, el medio de cultivo celular se trata utilizando UV en combinación con filtración (véase, por ejemplo, las Publicaciones WIPO WO 2008/157247; WO 2012/115874; WO 2013/063298 y WO 2013/138159). En otra realización, el medio de cultivo celular se somete a nanofiltración (véase, por ejemplo, Liu et al, (2000) Biotechnol. Prog. 16:425-434). En otra realización, el medio de cultivo celular se trata con productos químicos que inactivan virus, tales como disolventes, detergentes, psoraleno o beta-propiolactona.

#### Células

- 35 Las líneas celulares (a las que también se hace referencia como “células” o “células huésped”) que se utilizan en la invención están modificadas genéticamente para expresar un polipéptido de interés comercial o científico. Las líneas células res se derivan normalmente de un linaje que aparece a partir de un cultivo primario que se puede mantener en cultivo durante un tiempo ilimitado. Las células pueden contener introducido, por ejemplo, mediante transformación, transfección, infección o inyección, vectores (construcciones) de expresión, tales como plásmidos y similares, que llevan secuencias codificantes, o partes de las mis, que codifican las proteínas para la expresión y producción en el procedimiento de cultivo. Dichos vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada. Los métodos que son bien conocidos y practicados por los expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y polipéptidos producidos, así como, los elementos de control de la transcripción y traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en J. Sambrook et al, 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4ª edición Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. o cualquiera de las ediciones previas; F. M. Ausubel et al, 2013, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., o cualquiera de las ediciones previas; Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture. 1990, todos los cuales se incorporan en el presente documento con cualquier fin.

- Las células animales, células de mamífero, células cultivadas, células animales o de mamífero huésped, células huésped, células recombinantes, células huésped recombinantes, y similares, son todas expresiones para las células que se pueden cultivar de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. Dichas células son normalmente líneas celulares que se obtienen o derivan de mamíferos y son capaces de crecer y sobrevivir cuando se colocan en un cultivo monocapa o en cultivo en suspensión en un medio que contiene nutrientes apropiados y/u otros factores, tales como los que se describen en el presente documento. Las células se seleccionan normalmente entre las que puedan expresar y secretar proteínas, o que se puedan modificar molecularmente para que expresen y secreten grandes cantidades de una proteína en particular, más particularmente, una glicoproteína de interés, en el medio de cultivo. Se entenderá que la proteína producida por una célula huésped puede ser endógena u homóloga de la célula huésped. De manera alternativa, la proteína es heteróloga, es decir, ajena a la célula huésped, por ejemplo, una proteína humana producida y secretada por una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO). Adicionalmente, las proteínas de mamífero, es decir, las obtenidas originalmente o derivadas de un organismo mamífero se consiguen por los métodos de la presente invención y se pueden secretar por las células en el medio de cultivo.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para cultivar una variedad de células. En una realización, las células cultivadas son células eucariotas tales como células vegetales y/o animales. Las células pueden ser células de mamífero, células de peces, células de insecto, células de anfibio o células de ave. Una amplia variedad de líneas celulares de mamífero adecuadas para su crecimiento en cultivo está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Va.) y otros depositarios, así como vendedores comerciales. La célula que se puede utilizar en los procedimientos de la invención incluye, pero no se limitan a células MK2.7, células PER-C6, células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al, 1986, Som. Cell Molec. Genet, 12:555-556; Kolkekar et al, 1997, Biochemistry, 36:10901-10909; y documento WO 01/92337 A2), células CHO negativas a dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216), y células dpl2.CHO (Pat. de EE. UU. N.º 5.721.121); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL-70); células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células HEK 293, y células Sp2/0, células de hibridoma 5L8, células Daudi, células EL4, células HeLa, células HL-60, células K562, células Jurkat, células THP-1, células Sp2/0, células epiteliales primarias (por ejemplo, queratinocitos, células epiteliales cervicales, células epiteliales bronquiales, células epiteliales traqueales, células epiteliales renales y células epiteliales retinianas) y líneas celulares establecidas y sus cepas (por ejemplo, células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293, o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al, 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL-10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL-34); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); células MCR 5; células FS4; células retinianas PER-C6, células MDBK (NBL-1), células 911, células CRFK, células MDCK, células BeWo, células Chang, células Detroit 562, células HeLa 229, células HeLa S3, células Hep-2, células KB, células LS 180, células LS 174T, células NCI-H-548, células RPMI 2650, células SW-13, células T24, células WI-28 VA13, 2RA, células WTSH, células BS-C-T, células LLC-MK<sub>2</sub>, Clon de células M-3, células 1-10, células RAG, células TCMK-1, células Y-I, células LLC-PK<sub>1</sub>, células PK(15), células GH<sub>1</sub>, células GH<sub>3</sub>, células L2, células LLC-RC 256, células MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, células XC, células MDOK, células VSW, y células TH-I, B1, o derivadas de las mismas), células fibroblastos de cualquier tejido u órgano (incluyendo pero sin limitarse a corazón, hígado, riñón, colon, intestinos, esófago, estómago, tejido neural (cerebro, médula espinal), pulmón, tejido vascular (arteria, vena, capilar), tejido linfóide, (ganglio linfóide, adenoide, tonsila, médula ósea y sangre), bazo, y líneas celulares de fibroblastos o tipo fibroblastos (por ejemplo, células TRG-2, células IMR-33, células Don, células GHK-21, células de citrulinemia, células de Dempsey, células Detroit 551, células Detroit 510, células Detroit 525, células Detroit 529, células Detroit 532, células Detroit 539, células Detroit 548, células Detroit 573, células HEL 299, células IMR-90, células MRC-5, células WI-38, células WI-26, células Midi, células CV-1, células COS-1, células COS-3, células COS-7, células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células DBS-FrHL-2, células BALB/3T3, células F9, células SV-T2, células M-MSV-BALB/3T3, células K-BALB, células BLO-11, células NOR-10, células C3H/IOTI/2, células HSDMiCs, KLN205, células McCoy, células Mouse L, células de la cepa 2071 (Mouse L), células de la cepa L-M (Mouse L), células L-MTK (Mouse L), células NCTC clones 2472 y 2555, células SCC-PSA1, células Swiss/3T3, células muntac Indias, células SIRC, células Cn, y células Jensen, o derivados de las mismas) o cualquier otro tipo celular conocido por el experto en la técnica.

Las células pueden ser adecuadas para el cultivo adherente, monocapa y/o en suspensión, transfección, y expresión de proteínas, por ejemplo, anticuerpos. Las células se pueden utilizar, por ejemplo, con métodos de cultivo por lotes, semi-continuos y de perfusión o continuos.

#### Tipos de cultivos celulares

Para los fines de comprensión, aunque sin limitación, será apreciado por el facultativo experto que los cultivos celulares y rondas de cultivo para la producción proteica pueden incluir el cultivo por lotes, cultivo semi-continuo, cultivo de perfusión, o combinaciones de los mismos. En el cultivo por lotes, las células si cultivan inicialmente en el medio y este medio no se retira, sustituye ni suplementa, es decir, las células no se "alimentan" con medio reciente, durante o antes del final de la ejecución de cultivo. El cultivo celular completo se recolecta al final de la ejecución de cultivo.

Para los cultivos semi-continuos (fed-batch culture), el tiempo de ejecución del cultivo aumenta suplementando el medio de cultivo periódica o continuamente con medio reciente durante la ejecución, es decir, las células se "alimentan" con medio nuevo ("medio de alimentación") durante la ejecución del cultivo. Los cultivos semi-continuo pueden incluir los distintos regímenes de alimentación y los tiempos como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, diariamente, día sí día no, cada dos días, etc., más de una vez al día, o menos de una vez al día, y así. Adicionalmente, los cultivos semi-continuos se pueden alimentar continuamente con el medio de alimentación. El producto deseado se recolecta entonces al final de la ejecución del cultivo.

El cultivo de perfusión, a veces conocido como cultivo continuo, es uno en el que el cultivo celular recibe la adición de medio reciente ("medio de perfusión") y el medio gastado se retira del biorreactor. La perfusión puede ser continua, por etapas, intermitente, o una combinación de todos y cada uno de estos. Las velocidades de perfusión

pueden ser menores que un volumen de trabajo a muchos volúmenes de trabajo al día. La expresión “caudal de perfusión” es la cantidad de medio que pasa a través (añadido o removido) de un biorreactor, normalmente se expresa como una parte o un múltiplo del volumen de trabajo, en un tiempo determinado. “Volumen de trabajo” se refiere a la cantidad de volumen de biorreactor utilizado para el cultivo celular. En una realización el caudal de perfusión es un volumen de trabajo o menos por día. El medio de alimentación de perfusión se puede formular para maximizar la concentración de nutrientes de perfusión para minimizar la tasa de perfusión.

Preferentemente, las células se retienen en el cultivo y el medio gastado que se retira está sustancialmente libre de células o tiene significativamente menos células que el cultivo celular. Las proteínas recombinantes expresadas por el cultivo celular pueden retenerse o retirarse del cultivo celular, dependiendo del sistema de retención utilizado. A veces es preferible que las células huésped y las proteínas recombinantes expresadas permanezcan en el retenido del biorreactor y para el permeado que sea sustancialmente libre o tenga significativamente menos de cualquiera (“permeado nulo”). Otras veces es preferible retener las células, pero permitir que las proteínas expresadas pasen al permeado (“permeado de cosecha”).

La perfusión se puede conseguir por varios medios que incluyen centrifugación, sedimentación, o filtración, véase, por ejemplo, Voisard et al, (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. En una realización se utiliza un método de filtración. Los filtros incluyen filtros de membrana, filtros cerámicos y filtros metálicos y pueden tener cualquier forma, incluyendo enrollado en espiral o tubular o en forma de lámina. Se pueden conectar uno o más filtros, en comunicación fluida con un biorreactor juntos o independientemente, en serie o en paralelo.

Los filtros de fibra hueca se utilizan en el cultivo de perfusión de células de mamífero para la retención de células y/o producto proteico recombinante. Cuando el cultivo celular, incluyendo el medio de cultivo celular, las células (completas o lisadas), las proteínas recombinantes solubles expresadas, proteínas de las células huésped, productos de desecho y similares, se introducen en el filtro, dependiendo del tamaño de poro o corte de peso molecular (MWCO) el material de fibra hueca puede retener ciertos componentes del cultivo celular en el lado de la luz (interior) y permitir que ciertos componentes pasen a través del filtro (permeado) basándose en el tamaño de poro o corte de peso molecular del material de fibra hueca. El material que se retiene (retenido) se devuelve al biorreactor. La perfusión medio de cultivo reciente se añade al biorreactor y el permeado se retira del filtro a intervalos predeterminados o continuamente para mantener un volumen de biorreactor constante o deseado. El permeado puede desecharse, almacenarse en contenedores de mantenimiento, bolsas o bolsos o se transfiere directamente a otra unidad de operación, tal como filtración, centrifugación y/u otro método de purificación corriente abajo o similares. Las fibras huecas para la microfiltración normalmente tienen un tamaño de poro que varía de 0,1  $\mu\text{m}$  a 5-10  $\mu\text{m}$  o un corte de peso molecular de 500 kDa o más y se puede utilizar para permitir que la proteína pase a través del permeado. Las fibras huecas de ultrafiltración normalmente tienen un tamaño de poro de 0,01  $\mu\text{m}$  a 0,1  $\mu\text{m}$  o un corte de peso molecular de 300 kDa o menos, y puede utilizarse para retener la proteína deseada en el retenido y devolverlo al biorreactor. Esto se puede utilizar, por ejemplo, para concentrar el producto proteico recombinante para la recolección. Dichos filtros están disponibles en el mercado, tal como Xampler UFP-750-E-4MA, Xampler UFP-30-E-4MA, (GE Healthcare, Pittsburg, PA) y Midikros TC Modules T02-E030-10, T02-050-10, T02-E750-05, T02-M10U-06 (Spectrum Laboratories, Tnc, Dominguez, CA).

La invención proporciona que cuando se recolecta el permeado nulo, el filtro es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no permite que el producto proteico recombinante pase en el permeado y en vez de eso se retiene en el biorreactor. La invención también proporciona que cuando se recolecta el permeado de cosecha, el filtro es un filtro de fibra hueca que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que permite a la proteína recombinante pasar a través de la fibra hueca.

El cultivo celular se extrae del biorreactor y en el filtro por un sistema de bombeo, que pasa el cultivo celular a través del lado de la luz de la fibra hueca. Ejemplos de sistemas de bombeo celular incluyen bombas peristálticas, bombas de diafragma doble, bombas de baja cizalladura (Levitronix® pumps, Zurich, Suiza) y sistemas de flujo tangencial alternante (ATF™, Refine Technology, Pine Brook, NJ, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 6.544.424; Furey (2002) *Gen. Eng. News.* 22 (7), 62-63.). El permeado puede extraerse de los filtros mediante el uso de bombas peristálticas.

#### Sistema de Filtro de una sola unidad

La invención proporciona un sistema de filtro de una sola unidad que comprende dos o más componentes del filtro de fibras huecas de diferentes tamaños de poro o cortes de peso molecular combinados en serie en un sistema de filtro de una sola unidad, opcionalmente contenido en una carcasa, que se puede operar mediante un único dispositivo de bombeo celular. Esto mite la recolección en un modo de retención de producto (retirando el permeado nulo) o un modo de recolección de producto (retirando el permeado de cosecha) mediante un sistema de un filtro (Figura 1). El sistema de filtro de una sola unidad ofrece las ventajas de retirar las proteínas de la célula huésped y otros desechos del cultivo celular durante los ciclos de cosecha, prolongando la duración del cultivo celular. El sistema de filtro de una sola unidad tiene potencialmente menos suciedad del filtro y por tanto una mayor eficacia de recolección. El sistema de filtro de una sola unidad puede proporcionar un permeado en múltiples lotes más pequeños para una carga más fácil y eficaz de las columnas de purificación corriente abajo. El sistema de filtro de

una sola unidad se puede utilizar como parte de un procedimiento de fabricación continuo.

La configuración del sistema de filtro de una sola unidad incluye dos o más componentes de filtro de fibra hueca que tienen diferentes tamaños de poro o cortes de peso molecular, configurados en serie, de manera que todos los filtros están en comunicación fluida entre ellos y el biorreactor y se pueden operar por un único dispositivo de bombeo. Dichos componentes del filtro de fibras huecas están disponibles en GE Healthcare y Spectrum Laboratories, Inc., por ejemplo. Mientras el cultivo celular fluye a través de todos los filtros, se puede retirar selectivamente el permeado de uno o más filtros a la vez. El permeado (nulo o de cosecha) se retira retirando el permeado del componente de fibra hueca adecuado basándose en su tamaño de poro o corte de peso molecular. El permeado nulo y el permeado de cosecha se retiran por separado e independientemente mediante el uso de bombas peristálticas individuales. La duración y velocidad de la recolección del permeado se puede controlar mediante sus bombas peristálticas separadas.

Los componentes individuales de filtro de fibras huecas se pueden alinear en cualquier configuración que sea adecuada para la aplicación. En una realización los componentes del filtro de fibras huecas que tienen un tamaño de poro o corte de peso molecular de manera que se retiene el producto de proteína recombinante del cultivo celular en el retenido del biorreactor de cultivo celular se coloca de manera que sea el primero en recibir el flujo del cultivo celular del biorreactor.

La configuración del sistema de filtro de una sola unidad permite que el permeado de cosecha y el permeado nulo se retiren del biorreactor de una manera segregada y de tal manera que la relación volumétrica relativa y el tiempo de retirada se pueda controlar como se desee. El permeado se recolecta desde el sistema de filtro de una sola unidad a la misma velocidad que la velocidad de perfusión.

Además de utilizar componentes de filtro de fibras huecas disponibles en el mercado, el material de fibras huecas se puede construir para que tenga dos zonas separadas en un solo filtro que estén aisladas entre ellas por una zona de retención. También se pueden unir las fibras huecas separadas que tienen un tamaño de poro o corte de peso molecular diferente mediante una zona conectora en medio del área de retención para aislar los dos lados de permeado. Cada dominio de tamaño de poro, a lo largo de la fibra hueca, tendría los lados de cubierta correspondientes aislados de los lados de las cubiertas de los otros dominios de tamaño de poro de manera que el permeado se pueda retirar de cada lado de cubierta del dominio de tamaño de poro independientemente de los otros.

Los filtros se pueden asegurar entre ellos por cualquier método que permita la comunicación fluida entre los componentes del filtro de fibras huecas. Los componentes del filtro se pueden pegar o soldar entre ellos. Los filtros se pueden mantener unidos mediante una abrazadera, tal como una abrazadera tri clamp, u otro dispositivo mecánico que asegure juntas las unidades de filtro y permita la comunicación fluida entre los filtros. La carcasa del filtro se puede proporcionar con regiones internas y externas roscadas que se van a usar para unir las unidades del filtro, sea directamente o mediante un acoplador de rosca. Los filtros también se pueden conectar por cualquier tipo de mecanismo de cierre.

El posicionamiento de dos filtros directamente extremo con extremo puede crear una unión apretada o un ligero mal alineamiento entre las fibras huecas que puede que impida el flujo celular y produzca un daño celular debido al cizallamiento. Como resultado, podría haber una caída de la viabilidad debido al alineamiento de los filtros. Se puede utilizar un espaciador o acoplador que proporciona alguna distancia entre las unidades de filtro adyacentes, permitiría el flujo de las células con una transición más fácil entre la luz de un filtro y la luz de la siguiente fibra hueca entre las unidades de filtro. El espaciador separa las unidades de filtro individuales entre ellas, permitiendo una vía de flujo estéril entre las fibras huecas individuales a la vez que también se mantiene el aislamiento de los respectivos lados de cubierta hueca de los que se retira el permeado.

Dichos espaciadores se pueden fabricar de cualquier material que produzca una conexión segura y estéril entre los filtros y permita una comunicación fluida entre los filtros. Dichos espaciadores pueden ser autosellantes de los filtros. Los espaciadores pueden pegarse o soldarse para que los filtros se mantengan unidos. El espaciador se puede asegurar a los filtros por un dispositivo mecánico que asegure el espaciador a los filtros tales como una abrazadera. El espaciador se puede proporcionar con regiones roscadas internas o externas para usarse para asegurar el espaciador a los filtros directamente o mediante un acoplador roscado. El espaciador también se puede conectar por cualquier tipo de mecanismo de cierre.

El sistema de filtro de una sola unidad se puede incluir opcionalmente en una carcasa externa para facilitar su uso, especialmente cuando se configuran más de dos filtros en serie. La carcasa externa puede estar fabricada de plástico u otro material adecuado que mantenga una barrera estéril para el material de dentro de la unidad de filtro. La carcasa puede ser una segunda cubierta hecha para ajustarse sobre los filtros de fibras huecas disponibles en el mercado, o se puede fabricar la carcasa como la carcasa primaria para los filtros de fibras huecas conectados. La carcasa debería tener suficientes aberturas para permitir la introducción y recolección de alimentación y retenido, así como al menos un puerto de permeado para cada filtro de fibras huecas que tenga diferente tamaño de poro o corte de peso molecular.

El sistema de filtro de una sola unidad se puede utilizar en conjunción con un único sistema de bombeo celular que pasa el cultivo celular a través del lado de la luz de la fibra hueca con un caudal constante, como se ha descrito anteriormente.

5 Procedimiento de cultivo celular

10 El cultivo celular se puede llevar a cabo en condiciones que se acomoden a la producción a pequeña a gran escala de proteínas recombinantes utilizando recipientes de cultivo y/o aparatos de cultivo que se emplean convencionalmente para el cultivo de células animales o de mamífero. Para el cultivo a mayor escala, se puede utilizar un equipamiento tal como sistemas de botellas rotatorias, sistemas de cultivo tipo lecho empaquetado, biorreactores de contenedor tipo fermentador, biorreactores de tipo de elevación de aire, biorreactores de lecho fluidificado, biorreactores de celdas inmovilizadas, biorreactores de fibras huecas, biorreactores de contenedor con agitado, biorreactores multiestadio, biorreactores con centrífuga o cualquier otro dispositivo apropiado conocido por el experto en la técnica. El equipamiento de bioprocesamiento de un solo uso, tal como los biorreactores de un solo uso también se pueden utilizar. También se pueden utilizar microportadores con sistemas de biorreactor. Los sistemas se pueden operar en modo lotes, semi-continuo o de perfusión/continuo. Además, los recipientes de cultivo se pueden equipar con aparatos adicionales tales como separadores celulares utilizando filtros, gravedad, la fuerza centrífuga y similares.

20 La expresión "fase de crecimiento" de un cultivo celular se refiere al periodo de crecimiento celular exponencial (es decir, la fase logarítmica) en el que las células en general se dividen rápidamente. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un periodo de aproximadamente un día, o aproximadamente dos días, o aproximadamente tres días, o aproximadamente cuatro días, o más de cuatro días. La duración de tiempo en el que las células se mantienen en fase de crecimiento variará basándose en el tipo de células, la tasa de crecimiento de las células y/o las condiciones del cultivo, por ejemplo.

30 La expresión "fase de transición" se refiere al periodo entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En general, la fase de transición es el tiempo durante el cual las condiciones del cultivo se pueden controlar para que soporten un cambio de la fase de crecimiento a la fase de producción. Se pueden controlar o modificar distintos parámetros del cultivo celular para controlar el cambio, incluyendo, pero sin limitarse a uno a más de entre la temperatura, osmolalidad, concentraciones de vitaminas, aminoácidos, azúcares, amonio, ácido láctico y sales o similares.

35 La expresión "fase de producción" se refiere al periodo de tiempo en el que el crecimiento celular se aplanan. El crecimiento celular logarítmico normalmente desciende antes o durante esta fase, y la producción de proteína sube. Los procedimientos de cultivo celular semicontinuos y de perfusión suplementan el medio de cultivo celular o proporcionan medio reciente durante esta fase para conseguir y/o mantener la densidad celular, viabilidad y/o título de producto proteico recombinante deseados. Una fase de producción se puede llevar a cabo a gran escala. Los cultivos celulares a gran escala se pueden mantener en un volumen de al menos aproximadamente 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10.000, 15.000, 20.000 litros o más. En una realización preferida la fase de producción se lleva a cabo en biorreactores de 500 l, 1000 l, y/o 2000 l.

45 La producción de proteínas recombinantes se puede llevar a cabo en múltiples fases. En un procedimiento de múltiples fases, las células se cultivan en dos o más fases distintas. Normalmente, las células se cultivan primero en una o más fases de crecimiento, en condiciones ambientales para maximizar la proliferación y viabilidad celular, después tienen una transición a una fase de producción, en condiciones ambientales que maximizan la producción proteica. En un procedimiento comercial para la producción de proteínas recombinantes por células de mamífero, hay comúnmente múltiples, por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fases de crecimiento que se producen en diferentes recipientes de cultivo (N-x a N-1) precediendo el final del cultivo de producción. Las fases de crecimiento y producción pueden estar precedidas, o separadas por una o más fases de transición. Una fase de producción se puede llevar a cabo a gran escala. El método de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para extender la fase de producción de un cultivo celular.

55 Cuando se preparan para la producción comercial de una proteína recombinante, los cultivos celulares que preceden el final de un cultivo de producción normalmente discurren por medio de dos procesamientos, una serie de siembra y una serie de inóculo. La fase de la serie de siembra (N-X) tiene lugar a pequeña escala en la que las células se expanden en número rápidamente. En la fase de la serie de inóculo (N-1), las células se expanden adicionalmente para generar el inóculo para el biorreactor de producción. Las series de siembra y N-1 se pueden producir por cualquier método de cultivo, normalmente cultivos por lotes. Densidades celulares N-1 de  $>15 \times 10^6$  células/ml son típicas para la siembra de biorreactores de producción. Densidades de células N-1 mayores y/o que se ajusten al medio de cultivo celular pueden disminuir o incluso eliminar el tiempo necesario para alcanzar una densidad celular deseada en el biorreactor de producción. En una realización, se consiguen densidades de células N-1 mayores mediante perfusión del cultivo utilizando una filtración de flujo tangencial alternante. Un cultivo de células N-1 cultivado por medio de un procedimiento de perfusión utilizando filtración de flujo tangencial alternante puede proporcionar células con cualquier densidad deseada, se pueden conseguir fácilmente altas densidades celulares tales como densidades de  $>90 \times 10^6$  células/ml o más. El cultivo celular N-1 se puede utilizar para generar un cultivo

de inoculación de única embolada o se puede utilizar como un cultivo de reserva de siembra rotatorio que se mantiene para inocular múltiples biorreactores de producción. La densidad de inoculación puede tener un impacto positivo en el nivel de proteína recombinante producida. Los niveles de producto de proteína recombinante tienen tienden a aumentar con el aumento de la densidad de inoculación. La mejora del título está unida no sólo a la mayor

5 densidad de inoculación, sino que probablemente está influenciada por el estado metabólico y el ciclo celular de las células que se colocan en la producción. Durante el procedimiento N-1 se puede permitir que el cultivo celular entre en la fase de producción antes de la inoculación en el biorreactor de producción. Dicha inoculación permite que la producción comience inmediatamente en el biorreactor de producción.

10 La expresión "densidad celular" se refiere al número de células en un volumen determinado de medio de cultivo. "Densidad celular viable" se refiere al número de células vivas en un volumen determinado de medio de cultivo, como se determina por ensayos de viabilidad convencionales (tales como el método de exclusión por tinción con azul tripano). La expresión "volumen celular empaquetado" (PCV), al que también se hace referencia como "porcentaje de volumen celular empaquetado" (%PCV), es la relación de volumen ocupado por las células, respecto al volumen total de cultivo celular, expresado como un porcentaje (véase Stettler, et al, (2006) Biotechnol Bioeng. Dec 20:95(6): 1228-33). El volumen celular empaquetado es una función de la densidad celular y el diámetro celular; el aumento del volumen celular empaquetado aumenta con el incremento de la densidad celular o diámetro celular o ambos. El volumen celular empaquetado es una medida del contenido sólido del cultivo celular. Como las células huésped variarán de tamaño y los cultivos celulares también contienen células muertas y moribundas y otros desechos celulares, el volumen celular empaquetado puede describir con un grado mayor de precisión el contenido sólido en un cultivo celular. Por ejemplo, un cultivo de 2000 l que tiene una densidad celular de  $50 \times 10^6$  células/ml tendría volúmenes celulares empaquetados muy diferentes dependiendo del tamaño de las células. Además, algunas células aumentarán de tamaño, tal como cuando están en un estado de crecimiento detenido, de manera que los volúmenes celulares empaquetados antes de la detención del crecimiento y después de la detención del

15 crecimiento serán probablemente diferentes debido al aumento en la biomasa como resultado del aumento de tamaño celular. Un volumen celular empaquetado menor durante la fase de producción ayuda a mitigar los problemas de salpicaduras con oxígeno disuelto que dificultar los cultivos de perfusión con densidad celular más alta. El volumen celular empaquetado menor también permite un volumen de medio menos que permita el uso de recipientes de almacenamiento de medio menores y puede combinarse con caudales más lentos. El volumen celular empaquetado menor también tiene menos impacto sobre la recolección y procesamiento corriente abajo, en comparación con cultivos de biomasa celular mayor. Todo lo cual reduce los costes asociados con la fabricación de proteínas terapéuticas recombinantes.

20 En una realización el método comprende adicionalmente que el volumen celular empaquetado durante una fase de producción es menor o igual al 35 %. En una realización relacionada, el volumen célula empaquetado es menor o igual al 30 %.

25 En una realización la densidad celular viable del cultivo de células de mamífero con un volumen celular empaquetado menor o igual al 35 % es de  $10 \times 10^6$  células/ml a  $80 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización relacionada la densidad celular viable del cultivo de células de mamífero es de  $20 \times 10^6$  células viables/ml a  $30 \times 10^6$  células viables/ml.

#### Controles del cultivo celular

30 Las condiciones del cultivo celular adecuadas para los métodos de la presente invención son los que se emplean normalmente y se conocen para el cultivo de células por lotes, semi-continuo, o de perfusión (continuo) o cualquier combinación de estos métodos, prestando atención al pH, oxígeno disuelto ( $O_2$ ), y dióxido de carbono ( $CO_2$ ), agitado y humedad, y temperatura. Durante la producción de proteína recombinante es deseable tener un sistema controlado en el que las células se cultivan durante un tiempo deseado o con una densidad deseada y entonces se cambia el estado fisiológico de las células a un crecimiento limitado o detenido, un estado de alta productividad en el que las células utilizan la energía y sustratos para producir la proteína recombinante en favor del aumento de la densidad celular. Para el cultivo celular a escala comercial y la fabricación de productos terapéuticos biológicos, la capacidad para limitar o detener el crecimiento celular y ser capaz de mantener las células en un estado de crecimiento limitado o detenido durante la fase de producción es muy deseable. Dichos métodos incluyen, por

35 ejemplo, cambios de temperatura, uso de inductores químicos de producción proteica, limitación o privación de nutrientes e inhibidores del ciclo celular, sean solos o en combinación.

Uno de dichos mecanismos para limitar o detener el crecimiento es cambiar la temperatura durante el cultivo celular. Por ejemplo, una fase de crecimiento puede producirse a una temperatura más alta, el cambio a una temperatura más baja puede iniciar y/o mantener una fase de producción. Por ejemplo, una fase de crecimiento puede producirse a un primer punto fijado de temperatura de aproximadamente  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ , una fase de producción se puede producir a un segundo punto fijado de temperatura de aproximadamente  $29 \text{ }^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , opcionalmente desde aproximadamente  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  o desde aproximadamente  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a aproximadamente  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ .

65

El cambio del punto fijado de temperatura se puede hacer manualmente o se puede hacer automáticamente haciendo uso de los sistemas de control del biorreactor. El punto fijado de temperatura se puede cambiar en un momento predeterminado o en respuesta a uno o más parámetros del cultivo celular, tal como la densidad celular, título, o concentración de uno o más de los componentes del medio. Uno de dichos métodos utiliza una herramienta de control de biomasa en línea integrada en el sistema de control de biorreactor para desencadenar el tiempo del punto fijado de temperatura cuando se alcanza una densidad celular deseada. Por ejemplo, se puede utilizar una sonda de biomasa basada en la capacitancia para la estimación de la densidad celular en línea y los datos de las mediciones en línea se pueden utilizar para desencadenar un cambio en la temperatura del biorreactor. Dichas sondas basadas en la capacitancia incluyen el sensor de capacitancia Fogale (DN12-200) (Nimes, Francia).

Además, se pueden añadir inductores químicos de la producción proteica, tal como cafeína, butirato, y/o hexametileno bisacetamida (HMBA), al mismo tiempo, antes, o después del cambio de temperatura. Si se añaden inductores después de un cambio de temperatura, se pueden añadir desde una hora a cinco días después del cambio de temperatura, opcionalmente de uno a dos días después del cambio de temperatura. Los cultivos celulares se pueden mantener durante días o incluso semanas mientras las células producen las proteínas deseadas.

Otro método para mantener las células en un estado fisiológico deseado es inducir la detención del crecimiento celular por la exposición del cultivo celular a condiciones de L-asparagina baja y/o privación de asparagina (véase, por ejemplo, la Publicación WIPO N.º WO 2013/006479). La detención del crecimiento celular se puede conseguir y mantener mediante un medio de cultivo que contenga una concentración limitante de L-asparagina y manteniendo una concentración baja de L-asparagina en el cultivo celular. El mantenimiento de la concentración de L-asparagina a 5 mM o menos se puede utilizar para inducir y mantener células en un estado de detención del crecimiento, aumentando de esta manera la productividad.

Los inhibidores del ciclo celular, compuestos conocidos o que se sospecha que regulan la progresión del ciclo celular y los procesos asociados a la transcripción, reparación de ADN, diferenciación, senescencia y apoptosis relacionados con esto, también son útiles para detener el crecimiento celular. Los inhibidores del ciclo celular que interactúan con la maquinaria del ciclo, como las quinasas dependientes de ciclina (CDK), son útiles, al igual que las moléculas que interactúan con proteínas de otras vías (pathways), como AKT, mTOR y otras vías que afectan, directa o indirectamente, al ciclo celular.

#### Recolección y purificación

Las proteínas recombinantes que se expresan se pueden secretar en el medio de cultivo del que se pueden recuperar y/o recolectar. Las proteínas recombinantes se pueden someter entonces en una o más etapas de procesamiento que incluyen la recolección, purificación, inactivación/filtración de endotoxinas y/o virus, ultrafiltración/diafiltración en una formulación farmacéutica adecuada y/o almacenamiento.

Las proteínas recombinantes expresadas se pueden capturar en el permeado de cosecha. Las proteínas se pueden purificar, o purificarse parcialmente, a partir de los permeados de cosecha utilizando procedimientos y productos disponibles en el mercado conocidos en la técnica y/o disponibles en vendedores comerciales. Dichos métodos incluyen floculación; centrifugación; precipitación; métodos de filtración tales como filtración profunda; métodos de cromatografía que incluye, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía con hidroxiapatita, entre otros métodos disponibles.

Las proteínas purificadas pueden entonces "formularse", que significa intercambiar el tampón, esterilizadas, empaquetadas en volumen, y/o empaquetados para un usuario final. Las formulaciones adecuadas para las composiciones farmacéuticas incluyen los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

#### Técnicas de procesamiento analítico

Las tecnologías del procesamiento analítico y los métodos están disponibles para controlar y evaluar las muestras que se toman durante el cultivo celular y los procedimientos de purificación para controlar cuantitativa y/o cualitativamente las características de la proteína recombinante y el procedimiento de producción. Esta información en tiempo real o en línea se puede utilizar para verificar y/o controlar el producto y los parámetros de producción, tal como el título, densidad celular; atributos de calidad de producto tal como modificaciones de la traducción; variabilidad del producto o procesamiento tal como impurezas y similares, para tomar decisiones a punto y modificar los procesamientos según sea necesario. Por ejemplo, los atributos de calidad del producto tal como distribución de especies de glicano, niveles de oxidación o desamidación se pueden verificar y/o controlar.

Cada etapa de un procesamiento de cultivo celular corriente arriba o un procedimiento de purificación corriente abajo se puede controlar para proporcionar la información acerca de la cantidad de un atributo de calidad de producto particular (PQA) y para controlar este PQA con una diana e intervalo determinados.

Las muestras se pueden tomar intermitentemente, a frecuencias deseadas, o continuamente. Las muestras se pueden analizar en tiempo real o casi en tiempo real o almacenarse para su análisis posterior. Esta información se puede utilizar para hacer cambios durante los procedimientos corriente arriba y corriente abajo.

- 5 La detección de un atributo de calidad de producto se puede hacer utilizando una espectrometría de masas, cromatografía líquida con UV y/o detección espectrométrica y electroforesis de capilaridad y similares.

Estos procesamientos son adaptables para el control continuo con ajustes manuales o automáticos del procedimiento tales como las alimentaciones, temperatura, duración del procedimiento como se determina por el nivel de un atributo de calidad del producto especificado.

El análisis de masa intacta para detectar la presencia de modificaciones postraduccionales tales como el procesamiento de aminoácidos y la glicosilación se puede hacer utilizando una columna de polihidroxietil aspartamida operada en modo de exclusión por tamaño y acoplada con una ESI-MS (Brady et al, (2008) J Am Soc Mass Spectro, 19: 502-509).

Control del eluido en tiempo real de la cromatografía de intercambio iónico controlando una relación LS/UV normalizada para cada fracción utilizando un detector de dispersión de luz láser y una absorbancia de UV, véase la Publicación de patente de EE. UU. N.º 2013-0303732.

Los métodos multi atributo utilizan cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LC/MS) para buscar y caracterizar los datos de MS en tándem utilizando distintas plataformas de búsqueda y bases de datos tales como Sequest (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA), XI Tandem (The Global Proteome Machine Organization) o Mascot (Matrix Science, Boston, MA). Las muestras se pueden desnaturar a pH alto o mantener las isoformas disulfuro y proteger las variantes succinimida, a pH bajo. La muestra se reduce y se alquila entonces seguido por la digestión con tripsina. La muestra se inyecta entonces en una MS (tal como un Espectrómetro de Masas híbrido Orbitrap-Tetrapolar, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) y se lleva a cabo el análisis utilizando el software Pinpoint (Thermo Fischer Scientific). Los atributos que se pueden identificar, cuantificar y controlar incluyen la isomerización, desaminación, reducción de disulfuro, contaminación con proteínas de la célula huésped, mutaciones, malas incorporaciones, hidroxilisina, tioéter, cadenas pesadas no glicosiladas, amidación del extremo C, Proteína A residual, caracterizar glicanos y proporcionar una identidad de molécula. La precisión de masa de cada atributo controlado se puede fijar a menos de 5 ppm de la masa prevista. La identificación del péptido/atributo se confirma por métodos de fragmentación MS2 y caracterización ortogonal (HILIC-MS para la glicosilación, por ejemplo). La distribución isotópica experimental debe tener un punto de puntuación del producto mejor de 0,95 cuando se compara con la distribución isotópica teórica. Se fija una ventana de tiempo de retención para cada atributo y se consideran todos los estados de carga detectables para cada atributo para la cuantificación. Se definen criterios que detectarán cambios en el atributo. Por ejemplo, se puede controlar la desaminación determinado un valor de desaminación (péptido desaminado dividido por la suma del péptido desaminado y el péptido parental sin modificar multiplicado por 100. La glicosilación se puede controlar comparando cada glicano específico con la suma de todos los glicanos detectables.

En algunas realizaciones las tecnologías de procesamiento analítico pueden incluir también el “control de atributos del producto” (PAC). El PAB combina múltiples elementos PAT con un modelo del bioprocesamiento para actuar como un control de retroalimentación en tiempo real de uno o más CQA. Este nuevo procedimiento de PAC es un ejemplo de la implementación de la producción QbD de biofarmacéuticos. El procedimiento PAC se basa en el uso de una palanca de control que puede tener impacto sobre el CQA. La palanca de control se incorpora en un bucle de control basado en un modelo para mantener el CQA en la diana deseada como se especifica en el QTPP. Específicamente, una palanca de control es un ajuste de un parámetro del procesamiento que tiene un impacto sobre un CQA de una manera que se puede modelar matemáticamente. Por ejemplo, los niveles de un inhibidor o activador se pueden ajustar dinámicamente para regular la actividad de la glicosilación enzimática para regular el perfil de glicosilación de un producto, a condición de que su impacto se pueda modelar matemáticamente. Al igual se podría ajustar la temperatura o el pH durante una ejecución a condición de que su impacto sobre los CQA también se pueda modelar de manera fiable.

## 55 Proteínas

Como se utiliza a lo largo del presente documento “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable y se refiere a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos entre ellos por enlaces peptídicos. Los péptidos, polipéptidos y proteínas también incluyen las modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, unión de lípidos, sulfación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP- ribosilación.

Las proteínas pueden ser de interés científico o comercial, incluyendo los fármacos basados en proteínas. Las proteínas incluyen, entre otras cosas, anticuerpos, proteínas de fusión, y citocinas. Los péptidos, polipéptidos y proteínas pueden producirse por líneas celulares procariontas o eucariotas utilizando métodos de cultivo celular y se puede hacer referencia a los mismos como “péptido recombinante”, “polipéptido recombinante”, “proteína

recombinante”, “producto proteico recombinante” y “producto”. Las proteínas expresadas se pueden producir intracelularmente o se secretan en el medio de cultivo del que se recuperan y/o recolectan.

Ejemplos no limitantes de proteínas de mamífero que se pueden producir ventajosamente por los métodos de la presente invención incluyen las proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares en todo o en parte de las siguientes proteínas: factor de necrosis tumoral (TNF), ligando flt3 (documento WO 94/28391), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, IL-2, angiopoyetina-2 (Maisonpierre et al. (1997), Science 277(5322): 55-60), ligando del activador receptor de NF-kappa B (RANKL, WO 01/36637), ligando inducido por apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, WO 97/01633), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, Patente australiana N.º 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (Patente de EE. UU. N.º 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de desarrollo y crecimiento de megacariocitos, RANTES, proteína 2 tipo fibrinógeno humano (FGL2; n.º de registro de NCBI NM\_00682; Riiegg y Pytela (1995), Gene 160:257-62), hormona de crecimiento, insulina, insulintropina, factores de crecimiento tipo insulina, hormona paratiroidea, interferones incluyendo, interferones  $\alpha$ , interferones  $\gamma$  e interferones de consenso (Patentes de EE. UU. N.º 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento de nervios, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas tipo sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas, factores estimulantes de colonias, linfotóxina- $\beta$ , factor inhibidor de leucemia, y oncostatina-M. Las descripciones de las proteínas que se pueden producir de acuerdo con los métodos inventivos se pueden encontrar en, por ejemplo, Citocinas Humanas: Handbook for Basic and Clinical Research, Volúmenes 1-3 (Aggarwal y Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Factores de Crecimiento: A Practical Approach (McKay y Brown, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1998) todas las ediciones; y The Cytokine Handbook, Vols. 1 y 2 (Thompson y Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

De manera adicional, los métodos de la invención serían útiles para producir proteínas que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista de dicho receptor o cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y/o proteínas sustancialmente similares a dichos receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, a los que se hace referencia como p55 y p75, Patente de EE. UU. N.º 5.395.760 y Patente de EE. UU. N.º 5.610.279), receptores de Interleucina-1 (IL-1) (tipos I y II; Patente EP No. 0460846, Patente de EE. UU. N.º 4.968.607, y Patente de EE. UU. N.º 5.767.064.), antagonistas del receptor IL-1 (Patente de EE. UU. N.º 6.337.072), antagonistas o inhibidores de la IL-1 (Patente de EE. UU. N.º 5.981.713, 6.096.728, y 5.075.222) receptores de la IL-2, receptores de la IL-4 (Patente EP N.º 0 367 566 y Patente de EE. UU. N.º 5.856.296), receptores de la IL-15, receptores de la IL-17, receptores de la IL-18, receptores de Fc, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor del factor estimulante de colonias, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos, receptores para la oncostatina-M y factor inhibidor de leucemia, receptor del activador del NF-kappa B (RANK, documento WO 01/36637 y Patente de EE. UU. N.º 6.271.349), osteoprotegerina (Patente de EE. UU. N.º 6.015.938), receptores para TRAIL (incluyendo los receptores de TRAIL 1, 2, 3, y 4), y receptores que comprenden dominios de muerte tal como Fas o el receptor inductor de apoptosis (Apoptosis Inducing Receptor, AIR).

Otras proteínas que se pueden producir utilizando la invención incluye proteínas que comprenden toda o parte de las secuencias de aminoácidos de antígenos de diferenciación (a los que se hace referencia como proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de estas. Dichos antígenos se desvelan en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japón, 1996). De manera similar, las proteínas CD se desvelan en talleres posteriores. Ejemplos de dichos antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos de los mismos (ligando de CD27, Ligando de C30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia del receptor de NTF, que también incluyen 41BB y OX40. Los ligandos son a menudo miembros de la familia del TNF, como son el ligando 41BB y OX40.

Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden producir utilizando la invención. Ejemplos incluyen las proteínas que comprenden todo o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a una de estas: una desintegrina y miembros de la familia con un dominio de metaloproteína incluyendo la enzima convertidora del TNF-alfa, distintas cinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, antitripsina alfa-1, ligando de cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente, y otras numerosas enzimas y sus ligandos.

El término “anticuerpo” incluye la referencia a inmunoglobulinas glicosiladas y no glicosiladas de un isotipo o subclase o una región de unión al antígeno que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos de que se especifique otra cosa, incluyendo humanos, humanizados, quiméricos, multispecíficos, monoclonales, policlonales, y oligómeros o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. También se incluyen proteínas que tienen un fragmento de unión al antígeno o región tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, diacuerpos, Fd, dAb, maxicuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contiene al menos una porción de una inmunoglobulina que sea suficiente para conferir una unión específica del antígeno a un polipéptido diana. El término “anticuerpo” es inclusivo, pero no se limita a, los que se preparan, expresan, crean o aíslan por

medos recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para expresar el anticuerpo.

5 Ejemplos de anticuerpos incluyen, por no se limitan a, los que reconocen una cualquiera o una combinación de proteínas que incluyen, pero no se limitan a, las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD 11 a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, subunidades del receptor de la IL-2, receptor de la IL-4, receptor de la IL-6, receptor de la IL-13, receptor de la IL-18, FGL2, PDGF- $\beta$  y análogos del mismo (véase Patente de EE. UU. N.º 5.272.064 y 5.149.792), VEGF, TGF, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 1, EGF receptor (véase Patente de EE. UU. N.º 6.235.883) receptor del VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gama, estimulador de linfocitos B (BlyS, también conocido como BAFF, THANK, TALL-1, y zTNF4; véase Do y Chen-Kiang (2002), *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(1): 19-25), complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto genético que se expresa en asociación con el cáncer de pulmón), HER-2, HER-3, una glicoproteína asociada a tumores TAG-72, el antígeno SK-1, epítomos asociados con tumores que están presentes con niveles elevados en el suero de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos asociados con el cáncer o proteínas que se expresan en células cancerosas de mama, colon, células escamosas, próstata, páncreas, pulmón, y/o riñón y/o células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el centro necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores TRAIL 1, 2, 3, y 4, RANK, ligando RANK, TNF- $\alpha$ , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), molécula-3 de adhesión intercelular (ICAM-3), adhesina leucointegrina, glicoproteínas de plaquetas gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor tisular VIIa), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor Fc- $\gamma$ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, esclerostina, L-selectina, Virus sincitial respiratorio, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutatis*, y *Staphylococcus aureus*. Ejemplos específicos de anticuerpos conocidos que se pueden producir utilizando los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, adalimumab, bevacizumab, infliximab, abciximab, alemtuzumab, bapineuzumab, basiliximab, belimumab, briakinumab, canakinumab, certolizumab pegol, cetuximab, conatumumab, denosumab, eculizumab, gemtuzumab ozogamicin, golimumab, ibritumomab tiuxetan, labetuzumab, mapatumumab, matuzumab, mepolizumab, mepolizumab, motavizumab, muromonab-CD3, natalizumab, nimotuzumab, ofatumumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pentumomab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, rovelizumab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizomab, zalutumumab, y zanolimumab.

35 La invención también se puede utilizar para producir proteínas de fusión que comprenden, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas mencionadas anteriormente más un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucina, un superenrollamiento, una parte Fc o una inmunoglobulina, o una proteína sustancialmente similar, se pueden producir utilizando los métodos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento WO 94/10308; Lovejoy et al. (1993), *Science* 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), *Science* 262:1401-05; Harbury et al. (1994), *Nature* 371:80-83; Hakansson et al. (1999), *Structure* 7:255-64. Específicamente se incluyen entre dichas proteínas de fusión recombinantes proteínas en los que una parte de un receptor se fusiona con una porción Fc de un anticuerpo tal como el etanercept (un p75 TNFR: Fc) y belatacept (CTLA4: Fc). Las proteínas y polipéptidos quiméricos, así como los fragmentos o porciones, o mutantes, variantes, o análogos de cualquiera de las proteínas y polipéptidos mencionados anteriormente también se incluyen entre las proteínas, polipéptidos y péptidos adecuados que se pueden producir por los métodos de la presente invención.

50 Aunque la terminología utilizada en la presente solicitud es convencional en la técnica, se proporcionan en el presente documento definiciones de ciertos términos para asegurar la claridad y definición del significado de las reivindicaciones. Las unidades, prefijos y símbolos se pueden denotar en su forma del SI aceptada. Los intervalos numéricos mencionados en el presente documento son inclusivos de los números que definen el intervalo e incluyen y comprenden cada uno de los números enteros en el intervalo definido. Los métodos y técnicas descritos en el presente documento se llevan a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en distintas referencias generales y más específicas que se citan y exponen a lo largo de la presente especificación a menos de que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1995), y Greenfield, *Antibodies: A Laboratory Manual* 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2013), o cualquier edición anterior.

## 60 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Procedimiento de cultivo celular periódico extendido

65 Este experimento describe un procedimiento de cultivo celular con recolección periódica extendida (X-PH) en comparación con un procedimiento de cultivo con ultrafiltración (UF). Para el procedimiento periódico extendido, se

llevó a cabo la perfusión utilizando un sistema de filtro de una sola unidad que comprendía un ultrafiltro que tenía un tamaño de poro o MWCO de manera que el producto proteico recombinante del cultivo celular se retenía en el retenido del biorreactor de cultivo celular conectado a un microfiltro que tenía un tamaño de poro o corte de peso molecular de manera que la proteína recombinante de interés se llevaba en el permeado y se recolectaba como producto cosechado. La perfusión se llevó a cabo extrayendo el permeado libre de proteína, o permeado nulo, del componente de ultrafiltro hasta que se alcanzaba un parámetro determinado, en este caso días de cultivo, en cuyo momento se llevó a cabo la perfusión extrayendo el permeado que contenía la proteína recombinante, o permeado de cosecha, del componente de microfiltro, durante un tiempo predeterminado. Después de que el tiempo predeterminado terminaba, se repetía el procedimiento. Este ciclo de retención y recolección del producto proteico se repetía hasta que terminaba el cultivo.

Para el procedimiento de ultrafiltración del cultivo, se cultivaron las células en un sistema de perfusión utilizando un ultrafiltro con un tamaño de poro o corte de peso molecular de manera que el producto proteico recombinante se retenía en el retenido del biorreactor de cultivo celular y se recolectaba un permeado libre de proteína recombinante. El producto proteico recombinante se recuperaba como una cosecha del biorreactor cuando se terminaba el cultivo.

#### Procedimiento de cultivo con recolección periódica extendida (X-PH)

El día 0, se inocularon células CHO que expresaban un anticuerpo recombinante en dos biorreactores de 2 litros (Applikon, Foster City, CA) a  $1 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml de un medio por lotes definido químicamente libre de suero. Los cultivos se mantuvieron a 36 °C, una DO a 48,0 mm de Hg, agitado a 350 RPM.

Los cultivos celulares se iniciaron en modo de lotes, se comenzó la perfusión el día 2 utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial alternante ATF-2™ (Refine Technologies, Hanover, NJ) utilizando un filtro de fibras huecas de 30 cm 20 kDa (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Pittsburg, PA) conectado en serie con un filtro de fibras huecas 30 cm con 750 kDa (Xampler UFP-750-E-4MA, GE Healthcare). Los filtros se unieron con una pieza conectora de bobina sanitaria de aproximadamente 2,5 cm de longitud utilizando abrazaderas sanitarias. El medio era un medio de perfusión definido químicamente libre de suero que contenía 1,5 g/l de pluronic (Kolliphor P188 SAFC Biosciences, ST. Louis, MO).

La velocidad de perfusión se aumentó gradualmente desde 0,5 a 1,0 volúmenes de trabajo del biorreactor/día durante la ejecución del cultivo celular y era uniforme a través de la unidad de filtro. Se recolectaron los permeados nulos y de cosecha, mediante bombas de perfusión independientes, a la misma velocidad que la velocidad de perfusión. Se tomaron muestras diarias del biorreactor para evaluar el cultivo. La densidad celular viable (VCD) y la viabilidad se determinaron utilizando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). El título se midió por análisis HPLC.

Para el análisis de glicanos, se recolectaron muestras que contenían proteína y se purificaron por Proteína A. Las muestras purificadas se trataron con PNGasa-F y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para liberar los glicanos unidos a N. Los glicanos liberados enzimáticamente se marcaron con ácido 2-aminobenzoico (2-AA) a 80 °C durante 75 minutos. El escaso de marcador 2-AA se retiró con un cartucho Glycoclean S. Las muestras se evaporaron durante una noche y el aglomerado seco resultante se reconstituyó con agua para el análisis HILIC (cromatografía líquida de interacción hidrófila) posterior. Los glicanos se inyectaron y unieron a la columna en condiciones orgánicas altas y se eluyeron con un gradiente creciente de un tampón de formato amónico. La detección de fluorescencia se utilizó para controlar la elución de glicano y se calculó el porcentaje relativo de las especies de glicano mayores y menores.

Antes del día 11, el permeado nulo, o permeado que no contenía producto, se recolectó continuamente extrayendo el permeado desde el ultrafiltro de 75 kDa utilizando una bomba peristáltica (Watson Marlow 120U/DV Falmouth, Cornwall, RU) y se desechó. Debido al tamaño del filtro, el producto proteico del cultivo celular se retuvo en el retenido del biorreactor de cultivo celular.

El permeado de cosecha, o permeado que contiene el producto, se recolectó en cinco veces separadas predeterminadas durante la ejecución del cultivo celular, de acuerdo con la programación proporcionada en la Tabla 1. El permeado de cosecha se recolectó extrayendo el permeado del microfiltro de 30 kDa utilizando una bomba peristáltica (Watson Marlow 120U/DV Falmouth, Cornwall, RU). El producto proteico del cultivo celular se llevaba en el permeado y se recolectó como parte del permeado de cosecha. El permeado de cosecha se evaluó en cuanto al título y calidad del producto como se ha descrito anteriormente. El permeado de cosecha se almacenó en bolsas de permeado (RCBB-300, RIM Bio Inc., Seattle, WA).

Tabla 1. Programación de recolección del permeado de cosecha

Cosecha	Día	Tiempo de recolección (horas)
1	11 a 12	22
2	14 a 15	23
3	17 a 18	25
4	20 a 21	26
5	23 a 24	25

5 Inmediatamente después de completar la recolección de cada uno de los permeados de cosecha, se recolectó de nuevo un permeado nulo continuamente desde el filtro ultrafiltro de 750 kDa y se desechó. El cultivo se terminó después de la recolección del permeado de cosecha el día 24.

#### Procedimiento de cultivo ultrafiltro (UF)

10 El día 0, se inocularon células CHO que expresaban el mismo anticuerpo recombinante como anteriormente en cuatro biorreactores de 2 litros (Applikon, Foster City, CA) a  $1 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml de un medio por lotes definido químicamente libre de suero. Los cultivos se mantuvieron a 36 °C, una DO a 48,0 mm de Hg, agitado a 350 RPM.

15 Los cultivos celulares se iniciaron en modo de lotes, se comenzó la perfusión el día 2 utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial alternante ATF-2™ (Refine Technologies, Hanover, NJ) equipado con un filtro de fibras huecas de 60 kDa (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Pittsburg, PA). El medio era un medio de perfusión definido químicamente libre de suero que contenía 1 g/l de pluronic (Kolliphor P188 SAFB Biosciences, ST. Louis, MO).

20 La velocidad de perfusión se aumentó gradualmente desde 0,5 a 1,0 volúmenes de trabajo /día durante la ejecución del cultivo celular. Se tomaron muestras diarias para evaluar el cultivo. La densidad celular viable (VCD) y la viabilidad se determinaron utilizando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). El título se midió por análisis HPLC.

25 El permeado se recolectó a la misma velocidad que la velocidad de perfusión. Debido al tamaño del filtro, el producto proteico del cultivo celular se retuvo en el retenido en el biorreactor de cultivo celular hasta la recolección cuando el cultivo se terminó el día 15.

30 El perfil de título del procedimiento X-PH era consistente con el título del procedimiento de cultivo UF hasta el día 11 (Figura 2). Los perfiles de título separados cuando el primer ciclo de cosecha de 750 kDa se introduce en el procedimiento X-PH. Se observó una correspondencia similar en la densidad celular viable (Figura 3) y el % de viabilidad (Figura 4).

35 Se utilizó un periodo de producción en el biorreactor de cincuenta y un días para permitir la comparación del procedimiento X-PH con el procedimiento UF con un periodo de carga y descarga asignado de tres días del biorreactor de producción entre ejecuciones. Con este criterio, se harían dos ejecuciones de procedimiento X-PH de 24 días y tres ejecuciones de procedimiento UF en un periodo comparable de cincuenta y un días.

40 El procedimiento X-PH proporcionaría un 98 % más de producto recuperado en comparación con el procedimiento UF durante un periodo de producción de 51 días (Tabla 2). Esto comprende principalmente un 26 % de aumento en la densidad celular viable integrada (IVCD) y un 46 % de aumento en la productividad específica. El procedimiento X-PH utilizaría un 27 % más de medio en dos ejecuciones con respecto a las tres ejecuciones del procedimiento UF, pero esto se traduce en un ~36 % de reducción de las necesidades de medio (coste del medio) por gramo de producto producido por el procedimiento X-PH en comparación con el procedimiento UF.

45

50

Tabla 2. Producto recuperado durante el periodo de fabricación de 51 días en un biorreactor de 2 l con un volumen de trabajo de 1,5 l

Procedimiento	Ejecuciones en 51 días	IVCD (x 10 <sup>6</sup> células-día/ml)	Productividad específica (pg/célula -día)	Total de producto producido (g)	Producto recuperado		Producto total recuperado (g)
					Bolsas de cosecha PX-MF (g)	Cosecha del biorreactor (g)	
UF	Ejecución única	689,9	~27,9	28,9	-	23,1	23,1
	Tres ejecuciones	2069,7		86,6		69,3	69,3
X-PH	Ejecución única	1302,8	~41,3	80,7	65,1	3,7	68,8
	Dos ejecuciones	2605,6		161,3	130,2	7,3	137,5

- 5 La calidad del producto del procedimiento X-PH se evaluó por mapeo de glicano por HILIC y se comparó con una referencia generada utilizando un procedimiento UF de 15 días (Tabla 3). Los atributos del mapa de glicano del procedimiento X-PH son consistentes con la referencia que utiliza el procedimiento UF.

Tabla 3. Análisis de glicano por HILIC

Procedimientos		Con manosa alta (%)	Total fucosilados (%)	Total Galactosidos (%)	Desconocido (%)
X-PH	Cosecha 1 Ejecución nº 1	8,0	86,3	17,2	5,2
	Cosecha 1 Ejecución nº 2	9,5	84,3	18,4	5,7
	Cosecha 2 Ejecución nº 1	7,5	87,3	15,8	4,6
	Cosecha 2 Ejecución nº 2	7,9	86,5	16,1	4,9
	Cosecha 3 Ejecución nº 1	7,7	86,5	15,9	4,9
	Cosecha 3 Ejecución nº 2	8,3	85,8	15,0	4,9
	Cosecha 4 Ejecución nº 1	7,3	87,4	15,5	4,5
	Cosecha 4 Ejecución nº 2	7,8	86,6	14,9	4,9
	Cosecha 5 Ejecución nº 1	9,4	84,1	16,8	5,4
	Cosecha 5 Ejecución nº 2	8,9	84,5	14,8	5,5
		Media ± Desv. Típ.	8,2 ±0,8	85,9 ±1,2	16,0 ± 1,1
UF	Referencia	7,2	86,0	16,4	5,7

10

## Ejemplo 2

El presente experimento compara el impacto de concentraciones bajas y altas del copolímero polioxipropileno-polioxietileno, Lutrol® F68, y filtros de 30 kDa frente a 750 kDa en un sistema de cultivo de perfusión.

15

El día 0, se inoculó una línea celular CHO que expresaba un anticuerpo recombinante en cuatro biorreactores de 2 l (Applikon Biotechnology, Foster City, CA) a  $2 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml de un medio de perfusión definido químicamente que contenía 1 g/l de Lutrol® F68 (BASF, Mt Olive, NJ). Los cultivos se mantenían a 36 °C, concentración de oxígeno disuelto del 48 %, pH 6,9, agitado a 350 RPM.

20

Las ejecuciones de cultivo celular se iniciaron en modo por lotes; la perfusión comenzó el día 2 cuando las densidades celulares alcanzaban  $4-5 \times 10^6$  células/ml. La perfusión se consiguió utilizando un sistema de filtración y

perfusión de flujo tangencial alternante ATF-2™ (Refine Technologies, Hanover, NJ). Se hacía circular al cultivo celular continuamente a través del lado de la luz de un filtro externo orientado verticalmente, entrando por la parte superior. El permeado se retiraba continuamente mediante una bomba peristáltica. Se equiparon dos reactores con filtros de fibras huecas de 30 kDa (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Pittsburg, PA). Se equiparon dos reactores con filtros de fibras huecas de 750 kDa (Xampler UFP-750-E-4MA, GE Healthcare, Pittsburg, PA).

La velocidad de perfusión se aumentaba gradualmente de 0,5 a 3 ml/minuto durante la ejecución del cultivo celular. Las muestras de permeado se recolectaron a la misma velocidad que la velocidad de perfusión. Las muestras se tomaron una vez al día del biorreactor y la línea de permeado. La densidad celular, viabilidad y diámetro celular se midieron mediante CEDEX (Roche, Nutley, NJ) después de la dilución con solución salina de tampón de fosfato para obtener una densidad celular de  $<10^7$  células/ml. El pH y la presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) y O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) se midieron utilizando un analizador de gases sanguíneos; concentración de glucosa, lactato, glutamina, amonio y concentraciones de iones de K y Na se mantuvieron con un instrumento NovaFLEX (Nova Biomedical, Waltham, MA).

En los reactores equipados con un filtro de 750 kDa, la viabilidad celular disminuía hasta el 80 % el Día 6. La disminución no era tan pronunciada en los reactores equipados con los filtros de 30 kDa en los que la viabilidad se mantenía por encima del 80 % durante 14 días (Figura 5).

Se veía una acumulación de hasta 7 g/l de Lutrol® F68 en el sobrenadante de los reactores equipados con el filtro de fibras huecas de 30 kDa. En estas condiciones el Lutrol® F68 era menor que los niveles detectables en las muestras de permeado. En los reactores equipados con el filtro de 750 kDa, los niveles de Lutrol® F68 en el sobrenadante del biorreactor y el permeado se mantenía relativamente constante y similar a los niveles en el medio de perfusión, varando de 1-1,5 g/l, sugiriendo que no había acumulación (Figura 6). La masa molar media de Lutrol® F68 es de 8.400 Da y teóricamente debería fluir a través del filtro de 30 kDa. La formación de micelas de Lutrol® F68 puede producirse a concentraciones muchos menores de 1 g/l (0,04 mM a 20-25 °C, de acuerdo con el fabricante). Es probable que la concentración de Lutrol® F68 aumentaba debido a la formación de micelas en el reactor o el filtro.

### 30 Estudios de toxicidad de Lutrol® F68

Para ensayar el efecto de la toxicidad de la alta concentración de Lutrol® F68 sobre las células, se llevaron a cabo 10 pasajes (de 3 días por pasaje) con dos líneas celulares de CHO (Línea célula A y Línea celular B) que expresaban diferentes anticuerpos monoclonales, con una densidad de siembra inicial de  $8 \times 10^5$  células/ml en recipientes de 250 ml con agitado con un medio de cultivo que contenía 1, 2, 3, 4 o 5 g/l de Lutrol® F68.

Se observó un aumento total de la densidad celular ( $3,4-6,5 \times 10^6$  células/ml) después de 3 días. La densidad celular viable se normalizó a la condición de 1 g/l para hacer posible la comparación entre las diferentes concentraciones de Lutrol® F68.

Las células crecían en un medio que contenía 3, 4, o 5 g/l de Lutrol® F68 eran consistentemente mayores sobre los pasajes, en los cuales se midió un aumento del 10 % de densidad celular en comparación con la condición de 1 g/l ( $p < 0,01$ ) (Figura 7A). La viabilidad también era mayor para los cultivos con Lutrol® F68 más alto (media  $>95$  %) (Figura 7B). También se descubrió que el diámetro celular había aumentado ligeramente en todas las condiciones en comparación con la condición de 1 g/l ( $15,42 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 7C). La variación de la densidad celular viable, % de viabilidad y diámetro en las condiciones de Lutrol® F68 más alto eran debidas a un cambio de características sobre el pasaje continuo.

El efecto de la toxicidad de la alta concentración de Lutrol® F68 en las células también se llevó a cabo en un cultivo semi-continuo de 2 l utilizando dos líneas celulares de CHO que expresaban anticuerpos monoclonales. De nuevo, el Lutrol® F68 alto no tenía un impacto en la densidad celular viable, viabilidad, diámetro celular o título (Figura 8).

### Suplementación de cultivos de perfusión de ATF con 5 g/l de Lutrol® F68

Se llevó a cabo un experimento que comparaba 1 g/l y 5 g/l de Lutrol® F68. El día 0, se inoculó una línea celular de CHO que expresaba un anticuerpo recombinante en seis biorreactores de 2 l (Applikon Biotechnology, Foster City, CA) a  $2 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml. Dos reactores recibieron un medio de perfusión definido libre de suero que contenía 1 g/l de Lutrol® F68 y dos reactores recibieron un medio de perfusión definido libre de suero que contenía 5 g/l de Lutrol® F68. Los cultivos se mantuvieron a 36 °C, una concentración de oxígeno disuelto al 48 %, pH 6,9, y agitado a 350 RPM.

Las ejecuciones de cultivo celular se iniciaron en modo de lotes; la perfusión comenzó el día 2. La perfusión se consiguió utilizando un sistema de flujo tangencial alternante ATF-2™ (Refine Technologies, Hanover, NJ) equipado con filtros de fibras huecas de 750 kDa (Xampler UFP-750-E-4MA, GE Healthcare, Pittsburg, PA). La velocidad de perfusión era de 3 volúmenes de trabajo/día.

Se tomaron muestras una vez al día del biorreactor y la línea de permeado y se ensayaron como se ha descrito anteriormente.

5 El aumento de la concentración de Lutrol® F68 a 5 g/l daba como resultado una viabilidad extendida de >95 % durante 14 días y >90 % hasta el día 25 (Figura 9).

#### Recuperación de baja concentración de Lutrol® F68 en cultivos con Lutrol® F68 alta

10 El día 0, se inoculó una línea celular de CHO que expresaba un anticuerpo recombinante en cuatro biorreactores de producción (Applikon Biotechnology, Foster City, CA) a  $2 \times 10^6$  células/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml. Las ejecuciones de cultivo celular se iniciaron en modo por lotes; la perfusión comenzó el día 2. La perfusión se consiguió utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial alternante ATF-2™ (Refine Technologies, Hanover, NJ) equipado con filtros de fibras huecas de 750 kDa (Xampler UFP-750-E-4MA, GE Healthcare, Pittsburg, PA). Los reactores se dividieron en dos grupos de dos, recibiendo cada grupo una formulación de medio de cultivo celular de perfusión diferente (Medio A y Medio B). Ambas formulaciones de medio contenían 1 g/l de Lutrol® F68. Los cultivos se mantuvieron a 36 °C, con una concentración de oxígeno disuelto del 48 %, pH 6,9, y agitado a 350 RPM. Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones hasta que el porcentaje de viabilidad celular caía hasta el 80 %. En este momento, los medios de ambos grupos se suplementaron con 4 g/l de Lutrol® F68 adicionales (para dar un total de 5 g/l). Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones altas en pluronic hasta el día 30. La recuperación de la viabilidad celular por adición de una concentración más alta de Lutrol® F68 se muestra en la Figura 10. Después de la suplementación, el porcentaje de viabilidad aumentó hasta en un 15%. El efecto protector de la mayor concentración de pluronic en un cultivo con una disminución de la viabilidad celular fue evidente independientemente de la formulación del medio del cultivo celular.

#### **Ejemplo 3**

25 Este experimento demuestra la aplicación satisfactoria a escala piloto de elementos de calidad múltiple por diseño (QbD) en un procedimiento PAC para suministrar un perfil de producto diana de calidad (QTPP) predefinida. El CQA controlado en este experimento era la glicosilación unida a N con manosa alta sobre el dominio Fc de un anticuerpo monoclonal ("con manosa alta").

30 El nivel de manosa alta en el producto se controló por la adición o retirada de manosa (la palanca de control) al medio de cultivo celular. Sin embargo, se podrían utilizar también precursores de metabolitos, inhibidores metabólicos, moléculas pequeñas, cofactores enzimáticos y promotores inducibles. Estudios recientes han de mostrado que los diferentes azúcares pueden tener un impacto sobre el nivel de manosa alta en un producto de anticuerpo. Específicamente, la alimentación con manosa ha demostrado aumentar el nivel de manosa alta sin tener un impacto en la productividad del cultivo. A través de estudios empíricos, se ha desarrollado un entendimiento del impacto de la concentración de manosa en el medio de cultivo celular sobre los niveles de IgG con manosa alta y se estudió su relación con el procedimiento de cultivo celular. El conocimiento adquirido de los estudios a pequeña escala y una ejecución de producción de entrenamiento a escala piloto se incorporó para desarrollar un algoritmo de PAC basado en el principio de Modelo de control predictivo (MPC). El MPC es un esquema de control en que se utiliza un modelo matemático del procedimiento para predecir su trayectoria futura. La naturaleza transitoria de un procedimiento de biorreactor con CHO típico, la probabilidad de interacciones entre CQA múltiples y sus palancas de control, y las decaídas asociadas con la analítica compleja pueden proporcionar una fuerte motivación para el MPC. Las tecnologías PAT incluyendo la analítica por espectrometría de masas casi en tiempo real combinada con el control del biorreactor convencional se utilizaron para proporcionar datos puntuales para informar al modelo utilizado por el MPC. Los datos de múltiples ensayos se incorporaron en el sistema MPC que determinaban la cantidad de manosa a añadir al biorreactor para mantener el CQA con manosa alta en el intervalo diana.

#### *Ensayo en placas de cultivo celular de la relación de glucosa respecto a manosa*

50 La línea celular era una línea celular de CHO recombinante que expresaba un anticuerpo monoclonal. Las células se sembraron a  $7,5 \times 10^5$  células/ml en un medio definido químicamente (CD) que contenía 12 g/l de glucosa en un volumen de trabajo de 2 ml en placas de pocillos profundos. Las células se incubaron en un agitador orbital a 36,0 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub> a 220 rpm (diámetro orbital de 50 mm). Los días 3-4, se midió la concentración de glucosa mediante un Ensayo en Placa de Reactivo de Glucosa Polychem (MedTest DX, Canton, MI) y los cultivos se centrifugaron para reponer un 26 % del medio gastado con medio CD nuevo. De manera similar, el día 5, se repuso el 100 % del medio gastado con medio CD nuevo que no contenía glucosa. La concentración de hexosa total se ajustó posteriormente a 10 g/l utilizando diferentes relaciones de glucosa respecto a manosa mediante la adición a partir de soluciones de hexosa de reserva. Las células se dejaron crecer durante 24 horas. Se retiraron los sobrenadantes, se purificó la IgG y se midió el % con manosa alta mediante un ensayo de cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC).

#### Ensayo de GC-MS de hexosas

65 Se cuantificaron las concentraciones de glucosa y manosa en el medio de cultivo celular por GC-MS. Una muestra de 1 ml del cultivo celular se centrifugó para aglomerar las células y se filtró el sobrenadante (0,2 µM). El sobrenadante

filtrado se diluyó 1 a 10 en agua DI y se añadieron 10 µl de esta dilución a 1,5 µl en un tubo de centrífuga. Se añadió una alícuota de 5 µl de una solución de hexosa de referencia interna que contenía 10 mM de D-[UL-13C6] manosa al 99,9 % (Omicron Biochemicals) y 10 mM de D-[U-13C6] glucosa al 99,9 % (Cambridge Isotope Labs). La muestra se secó (SpeedVac) durante 30 min. Las hexosas se derivaron por adición de 20 µl de piridina anhidra y 30 µl de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) con un 1 % de trimetilclorosilano (TMCS) incubados a 40 °C durante 30 min. Inmediatamente después de la derivación, se analizaron las muestras en un sistema Agilent GC 6890N MSD 5973. Una muestra de 1 µl se inyectó en una columna Agilent DB-35 GC (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) con una división de 1 en 50. Se mantuvo Helio a un flujo constante de 1 ml/min. Se mantuvo la temperatura del horno a 190 °C durante 2 min y se aumentó hasta 202 °C a una velocidad de 4 °C/min.

La temperatura se aumentó adicionalmente hasta 280 °C a una velocidad de 60 °C/min. El tiempo de ejecución total era de 6,3 min. Cada hexosa dio dos picos que representaban ambas formas isoméricas abierta y cerrada. La manosa se eluía a los 2,7 min y 3,34 min; la glucosa se eluía a los 3,5 min y 4,18 min (Figura 11(A)). El área del pico de 3,34 min se utiliza para la cuantificación de manosa y el pico de 4,18 min para la cuantificación de glucosa. Las hexosas se cuantificaron utilizando la característica TMS del fragmento de carbohidrato m/z = 20416 y la dilución del isótopo de referencia en el que el área del pico m/z = 204 del azúcar de 12 C se comparó con el área del pico de m/z = 206 del azúcar de 13C (Figura 11 (B)).

#### Ensayo MS-PAT de proteólisis limitada IdeS (FabRICATOR®)

Las muestras de medio de cultivo celular filtrado se analizaron sin una purificación adicional. Aproximadamente 60 µg de cada muestra se digirió con 60 unidades de la enzima IdeS (FabRICATOR, Genovis, Lund, Suecia) a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras digeridas se redujeron entonces en 4 M de hidrocloreuro de guanidina con 50 mM de Ditiotreitól (DTT) a 55 °C durante 10 minutos. Después, las muestras digeridas y reducidas se analizaron mediante RP-HPLC/MS.

Se llevó a cabo el análisis RP-HPLC/MS utilizando la cromatografía líquida de altas prestaciones Waters Acquity (UPLC) (Milford, MA) acoplado a un espectrofotómetro de masas con tiempo de vuelo (TOF) MST Agilent (Santa Clara, CA). Las muestras preparadas se separaron en una columna de fenilo BEH Waters de fase invertida (1,7 µm, 2,1 x 150 mm; Milford, MA) mantenida a 80 °C. Los picos se controlaron por UV a 220 nm y TOF-MS. Los datos de masa se extrajeron de la corriente iónica total (TIC) de los picos, seguido por desconvolución y cuantificación utilizando un software MassHunter.

#### Ensayo de mapeo de glicano por cromatografía de interacción hidrófila (HILIC)

Se digirieron 100 µg de anticuerpo purificado con PNGase F (New England Biolabs) seguido por la adición de 50 µl de solución marcadora fluorescente que contenía 12 mg/ml de ácido 2-aminobenzoico (2-AA) con 0,04 M de cianoborohidruro. Esta mezcla se incubó a 80 °C durante 75 minutos. Los glicanos marcados se analizaron por una UPLC Acquity equipado con un detector de fluorescencia (Milford, MA). Aproximadamente 3 µl de glicanos marcados se inyectaron en una columna de glicano BEH UPLC Acquity (n° 186004741, Milford, MA) seguido por el detector de fluorescencia utilizando una emisión a 360 nm y una detección a 425 nm. Las especies de glicano marcados con 2AA se identificaron mediante una técnica de MS/MS.

La generación de datos para ajustarse a los parámetros modelo, y la demostración posterior del MPC para el control del % con manosa alta se llevaron a cabo en biorreactores. Se añadió manosas (Sigma M6020) el primer día de cultivo hasta una concentración en el cultivo de 1 g/l utilizando una solución de reserva del 25 %. Se inició la perfusión el día dos de cultivo. El medio de perfusión se suministró en volúmenes crecientes desde 0,5 a 1,0 volúmenes de biorreactor por día. El biorreactor se controló utilizando un automatismo Delta V (Emerson). La toma de muestras del biorreactor se llevó a cabo cada cuatro horas utilizando la válvula MAST SP200 de toma de muestras automática (Bend Research) para la medición del título, hexosa y producto de glicano. Después de la recolección de muestras automáticas, las muestras se centrifugaron manualmente y se filtró con 0,2 µm para retirar las células y desechos. Las muestras diarias para las mediciones de crecimiento, viabilidad, osmolalidad y lactato se recolectaron manualmente o utilizando la MAT SP200. La densidad celular viable (VCD) y el % de viabilidad del cultivo se midieron utilizando Nova CDV (Nova Biomedical). Las concentraciones de lactato se determinaron utilizando un analizador Nova Bioprofile Basic (Nova Biomedical).

#### Modelo de control predictivo

La programación para el modelo de control predictivo (MPC) y para ajustar los parámetros modelo se hicieron en MATLAB (versión R2014a, Mathworks) y el código está disponible en los materiales suplementarios. Los parámetros modelo se determinaron por regresión de mínimos cuadrados de las ecuaciones modelo para los datos de una única ejecución de entrenamiento en el biorreactor. Para el control de manosa alta por las alimentaciones con manosa (mediante MPC) el cambio de velocidad de cada día se calculó mediante las siguientes etapas:

1. Cálculo de la compensación del modelo actual. La historia operativa del reactor combinada con los valores medidos diariamente (si están disponibles) se utilizaron como entradas para generar una solución numérica de

las ecuaciones del modelo diferencial. La diferencia entre el modelo y la medición más reciente se podría calcular entonces. Esta diferencia se utilizó como una estimación de la compensación futura.

$H_k$  = valor del modelo en el momento  $k = f(t_k)$

5  $H'_k$  = valor medido en el momento  $k$

$H_{k+1}$  = valor previsto ajustado en el momento  $k+1 = F(t_{k+1}) + (H_k - H'_k)$

2. Determinación de las velocidades óptimas futuras mediante MPC. Se utilizó el método 17 de alejamiento de horizonte de MPC de referencia cada día una vez que se inició el control. El conjunto óptimo de cinco cambios de velocidad se determinó minimizando la suma del error cuadrado entre el perfil de calidad del producto previsto por el modelo y el nominal de la diana. Aunque se calcularon cinco cambios de velocidad, solo se utilizó el primero. En el momento de que se tuviera que implementar el siguiente cambio de velocidad, estaban disponibles nuevos datos que se utilizaban entonces para recalculer el conjunto óptimo de velocidades óptimas.

15 La velocidad de la alimentación con manosa se encontró tratándola como la variable independiente en la minimización de la función objetivo (que en este caso es la suma de cuadrados de la diferencia entre el nivel con manosa alta en la molécula y que se encontró mediante integración de las ecuaciones diferenciales gobernantes). Las ecuaciones anteriores se comportaban suficientemente bien para que la solución obtenida por los disolventes MATLAB era suficiente para controlar a +/- un 1 % de especies con manosa alta en el anticuerpo. El método para controlar la manosa alta es un apoyo de que la adición de manosa al reactor aumenta el % con manosa alta en el anticuerpo. La reducción de producción de % con manosa alta se consigue reduciendo la concentración de manosa (mediante dilución por perfusión después de disminuir la velocidad de alimentación con manosa).

#### Cuantificación de hexosa por GC-MS

25 La cuantificación en tiempo real de manosa era una entrada necesaria para el MPC. Se utilizó una GC-MS para distinguir las hexosas (glucosa y manosa) en el medio de cultivo celular. Las hexosas se cuantificaron por dilución de isótopo como se ha descrito anteriormente. La Figura 11(A) muestra la separación basal por GC de manosa del medio de cultivo celular durante una ejecución típica. La Figura 11 (B) muestra el patrón de fragmentación de hexosa (idéntico entre manosa y glucosa), en el que el pico de  $m/z$  204 se cuantificó utilizando el pico de  $m/z$  206 de la referencia interna marcada de  $^{13}C$ . El límite de detección para la glucosa y la manosa era de 0,02 g/l y se demostró un alineamiento para la cuantificación de hasta 6 g/l de hexosa (Figura 11(C)).

#### Ensayo de las relaciones de glucosa respecto a manosa en placa de cultivo celular

35 Las células se cultivaron con una hexosa total de 10 g/l pero aumentando la concentración de manosa para dar lugar a relaciones glucosa: manosa de 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 y 0:10. Las células se cultivaron durante 24 horas con las diferentes relaciones de hexosa. Los sobrenadantes se retiraron, la IgG se purificó y se midió el % con manosa alta por un ensayo HILIC. La Figura 12(A) demuestra una relación lineal entre la concentración de manosa en el medio de cultivo celular y el nivel total con manosa alta, en el que la manosa alta era como mínimo del 10 % en el medio que contenía solo glucosa y como máximo del 37 % en el medio que contenía solo manosa.

45 Para establecer si el aumento en manosa alta era debido al aumento de concentración en azúcar manosa o la disminución de concentración en azúcar glucosa, las células se cultivaron como en el primer experimente en placa, con la excepción del día 5, en el que el medio se intercambió por medio nuevo que contenía 1, 3, 5, 7 o 10 g/l de manosa. Se añadieron cinco concentraciones diferentes de glucosa (1, 3, 5, 7 o 9 g/l) se añadieron a cada uno de los cultivos que contenían manosa. Esto hace un total de 25 cultivos diferentes siendo la menor cantidad de hexosa de 2 g/l (1 g/l de glucosa y 1 g/l de manosa, Figura 12(B)) y la mayor 19 g/l (9 g/l de glucosa y 10 g/l de manosa; Figura 12 (B)). Se permitió que las células crecieran durante 24 horas. Los sobrenadantes se retiraron entonces, se purificó la IgG y se midió el % con manosa alta por el ensayo HILIC. La Figura 12 (B) indica que el aumento lineal de manosa alta es independiente de la concentración de glucosa y solo depende de la concentración de manosa en el medio. Esta relación se utilizó para desarrollar un bucle de control MPC.

#### Desarrollo del bucle de control: Modelo de control predictivo

55 Para el desarrollo del bucle de control, el biorreactor se conectó al dispositivo de toma de muestras automático MAST SP200 y una bomba de alimentación de solución de manosa además de los controles de rutina del biorreactor y las analíticas fuera de línea (Figura 13). Se llevó a cabo una ejecución de perfusión en el biorreactor de 15 días para generar los datos de entrenamiento para desarrollar el bucle de retroalimentación de MPC para un control apoyado de manosa alta utilizando alimentaciones de manosa. Los datos para el % con manosa alta (Figura 14(A)), la concentración de manosa en el reactor (Figura 14(B)), crecimiento celular (Figura 14 (C)) y acumulación de título (Figura 14 (D)) se recolectaron a intervalos de tiempo de 4 horas con la excepción de los datos de glicano que no se recolectaron durante los días 9-11. El modelo MPC se desarrolló a partir de este conjunto de datos, excepto los parámetros de crecimiento que, debido a un error, se calcularon a partir de una ejecución similar. Las predicciones del modelo utilizando ambos conjuntos de parámetros de crecimiento se muestran en la Figura 14 y son virtualmente idénticas.

Desarrollo del bucle de control: Ecuaciones del modelo

Las ecuaciones diferenciales ordinarias se construyeron para describir la velocidad de cambio del número de células, producto, concentración de manosa, y especies con manosa alta.

5

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu N(N_m - N)}{N_m}$$

Aquí N es la densidad celular,  $\mu$  es la velocidad de crecimiento máxima, y  $N_m$  es la densidad celular máxima. La densidad celular puede ser en células/volumen o volumen celular/volumen. En este trabajo se calculó un volumen escalado y calculado arbitrariamente a partir del recuento celular y el diámetro medico en el Nova CDV. Para el título se asumió que la productividad era constante y la retención del producto variable (que depende del filtro de perfusión utilizado) se tiene en cuenta por:

10

$$\frac{dP}{dt} = q_p N - S D P$$

15

La concentración del producto es P, y  $q_p$  es la productividad específica, S es el coeficiente de filtrado que es la fracción de producto que pasa a través del filtro de perfusión, y D es la velocidad de perfusión en volúmenes del reactor/día. La velocidad de cambio de manosa:

20

$$\frac{dM}{dt} = D(M_r - M) - q_M N$$

La concentración de manosa en el reactor es M,  $M_r$  es la concentración efectiva de manosa en el medio de perfusión y  $q_M$  es la velocidad de consumo de manosa específica. Se asume que la velocidad de consumo de manosa sigue la cinética de Michaelis-Menton:

25

$$q_M = \frac{V_M M}{K_M + M}$$

La tasa de reacción máxima es  $V_M$  y la  $K_M$  es la constante de Michaelis-Menton. Los datos de las placas de cultivo celular sugerían que la tasa de producción relativa de especies con manosa alta era proporcional a la concentración de manosa (Figura 12(B)):

30

$$\frac{dH}{dP} = F_H M$$

Aquí H es la concentración de especies con manosa alta y  $F_H$  es el factor de proporcionalidad de manosa alta. El examen de los datos previos (no mostrados) sugerían que  $F_H$  variaba con la densidad celular de manera que se utilizó la siguiente ecuación puramente empírica para  $F_H$ :

35

$$F_H = K_1 * (K_2 + N)$$

40

$K_1$  y  $K_2$  son constantes empíricas. Finalmente, la velocidad de cambio de manosa alta se encuentra mediante la regla de cadena:

$$\frac{dH}{dt} = \frac{dH}{dP} \frac{dP}{dt} = q_p K_1 (K_2 + N) M N$$

45

Todos los parámetros del modelo se determinaron mediante regresión de mínimos cuadrados de los datos de entrenamiento que se muestran en la Figura 14. Los parámetros se encontraron ajustando el perfil de crecimiento celular que se muestra en la Figura 14(C). El valor para  $q_p$  se encontró por ajuste de la curva de título que se muestra en la Figura 14 (D). El declive del título después del día 12 es debido a un cambio de una membrana de ultrafiltración (para cuyo coeficiente de filtrado, S, es cero) a una membrana de microfiltración (que da un coeficiente de filtración en el intervalo de 0,76 a 0,78. Los parámetros restantes se encontraron ajustando las ecuaciones a los datos de la Figura 14(A) y Figura 14(B) simultáneamente.

50

Los valores de los parámetros utilizados en el modelo y sus límites del 95 % de confianza se muestran en la Tabla 4. Los valores numéricos de los parámetros del modelo y los límites de confianza obtenidos a partir de los datos de

entrenamiento y que se utilizaron para los Gráficos MPC del ajuste del modelo resultante a los datos de entrenamiento se muestran en la Figura 14 (líneas discontinuas A-D), mientras que los ajustes con los parámetros de crecimiento utilizados para el MPC son líneas de puntos. El parámetro ajustado para la manosa, constante de Michaelis-Menton,  $K_M$ , es mucho mayor que las concentraciones utilizadas, de manera que la cinética de consumo de manosa eran eficazmente de primer orden. Los datos de entrenamiento y la demostración posterior de MPC se llevó a cabo en idénticas condiciones con la excepción de que la concentración de manosa que servía como la palanca de control para la manosa alta.

Tabla 4. Valores numéricos de parámetros del modelo y límites de confianza obtenidos a partir de los datos de entrenamiento y utilizados para el MPC

Parámetro	Valor	Intervalo del 95 % de confianza	Unidades
$\mu$	0,7415 (0,7048) <sup>1</sup>	[0,67, 0,83]	1/día
$N_M$	13,8 (14,2) <sup>1</sup>	[12,5,15,1]	SCV/l
$q_p$	0,1705	[0,167,0,179]	g/SCV/día
$V_M$	102,5	N/A <sup>2</sup>	g/l/día
$K_M$	$1,47 \times 10^3$	N/A <sup>2</sup>	g/l
$V_M/K_M^2$	0,695	[0,062,0,077]	1/día
$K_1$	0,00332	[0,0029,0,0038]	l <sup>2</sup> /g/SCV
$K_2$	4,2	[2,57, 5,84]	SCV/l

NOTA: SCV es el volumen celular escalado y se calcula a partir de la densidad celular y el diámetro medio

Demostración de MPC para el control del nivel con manosa alta

Posteriormente a la derivación de los valores del parámetro, se utilizó el bucle de vuelta Teed en una ejecución de biorreactor para controlar activamente el nivel de % con manosa lata a un 6 % +/- 1 % para el Anticuerpo A. La perfusión y alimentación con manosa se inició el día 2 del cultivo de producción. La alimentación inicial con manosa se fijó a una velocidad que mantendría su concentración más o menos constante en el reactor. Esta velocidad de alimentación con manosa inicial se estimó basándose en la experiencia previa con el proceso y no era parte del bucle de control. El bucle de control se comenzó el día 5 de producción. Se tomaron muestras diariamente y se analizaron para determinar las entradas en el modelo MPC. La disminución ente la muestra del reactor y el cambio de velocidad variaba entre 5 y 14 horas, con una media de 8,5 horas. Una vez que todos los datos necesarios estuvieron disponibles, se introdujeron manualmente en el modelo MATLAB para calcular la siguiente velocidad de alimentación con manosa. La trayectoria resultante del % con manosa alta, las demás cantidades modeladas, y las concentraciones de alimentación basadas en el MPC resultante (calculado a partir de las velocidades de alimentación) se muestran en la Figura 15. Una vez que se inició el control, el % con manosa alta, medido y modelado aumentaba rápidamente y se mantuvo en el 1 % del 6 % diana (Figura 15(A)). Los perfiles de concentración de manosa modelados y medidos aumentaban y caían como se esperaba en respuesta a la alimentación con manosa (Figura 15(B)). El crecimiento celular seguía sobre todo la curva logística asumida con la excepción de desviaciones claramente significativas los días 6 y 12 (Figura 15 (C)). El título medido coincidía con el modelo, aunque las discontinuidades en los últimos días del cultivo eran una prueba de que el modelo estaba bajo la estimación de producción proteica (Figura 15(D)). El ajuste del estado del modelo MPC para las mediciones coincidentes hacía posible un buen control de la manosa alta a pesar de las desviaciones observadas. En la Figura 16 se muestra una comparación entre el procedimiento PAC y las ejecuciones históricas en planta piloto. Se llevaron a cabo las ejecuciones históricas utilizando un procedimiento convencional que es similar en diseño y ejecución al procedimiento PAC, pero sin el bucle de control activo. En vez de esto, el proceso convencional depende de parámetros del procedimiento estáticos para ejecución con un margen de error para cada lote para suministrar el producto deseado, que necesitará pasar un control de calidad para su almacenamiento. Con el procedimiento PAC, se mide la PQ casi en tiempo real y, debido al control activo durante la ejecución de producción, no será necesario una caracterización analítica posterior antes del almacenamiento.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la recolección de una proteína recombinante que comprende:
  - 5 i. el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante,
  - 10 ii. el mantenimiento del cultivo celular perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular fresco formulado o suplementado para que alcance una concentración de al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico,
  - 15 iii. el pasaje del cultivo celular a través de un filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retenga la proteína recombinante en el biorreactor, y
  - iv. la recolección de un permeado que contiene la proteína recombinante.
2. Un método para la recolección de una proteína recombinante que comprende:
  - 20 i. el establecimiento de un cultivo celular inoculando un biorreactor con células de mamífero que expresan una proteína recombinante,
  - 25 ii. el mantenimiento del cultivo celular perfundiendo el cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para que alcance una concentración de al menos 1 g/l de un copolímero en bloque no iónico y el pasaje del cultivo celular a través de un filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retenga la proteína recombinante en el reactor, y recolectar el permeado,
  - 30 iii. una vez que se alcanza un parámetro predeterminado la perfusión del cultivo celular con medio de cultivo celular reciente formulado o suplementado para que alcance una concentración de al menos 5 g/l de un copolímero en bloque no iónico y el pasaje del cultivo celular a través de un filtro de fibras huecas que tenga un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retenga la proteína recombinante en el biorreactor, y
  - iv. recolectar un permeado que contenga la proteína recombinante.
- 35 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor y el filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor son componentes de un sistema de filtro de una sola unidad.
- 40 4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que el filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que no retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un microfiltro.
- 45 5. El método de la reivindicación 4, en el que el corte de peso molecular del microfiltro es al menos de 500 kDa.
6. El método de la reivindicación 4, en el que el corte de peso molecular del microfiltro es de 750 kDa.
7. El método de la reivindicación 4, en el que el tamaño de poro del microfiltro es desde 0,1 micrómetros a 10 micrómetros.
- 50 8. El método de las reivindicaciones 2-3, en el que el filtro de fibras huecas que tiene un tamaño de poro o corte de peso molecular que retiene la proteína recombinante en el biorreactor es un ultrafiltro.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el corte de peso molecular del ultrafiltro es de 300 kDa o menos.
- 55 10. El método de la reivindicación 8, en el que el corte de peso molecular del ultrafiltro es de 30 kDa.
11. El método de la reivindicación 8, en el que el tamaño de poro del ultrafiltro es desde 0,01 micrómetros a 0,1 micrómetros.
- 60 12. El método de la reivindicación 3, en el que el sistema de filtro de una sola unidad está contenido en una carcasa.
13. El método de la reivindicación 3, en el que el sistema de filtro de una sola unidad comprende además un espaciador entre al menos dos de los componentes de filtro de fibras huecas.
- 65 14. El método de las reivindicaciones 1-3, en el que el copolímero en bloque no iónico es un copolímero en bloque de polioxipropileno-polioxietileno.

15. El método de las reivindicaciones 1-3, en el que el copolímero en bloque no iónico es poloxamer 188.

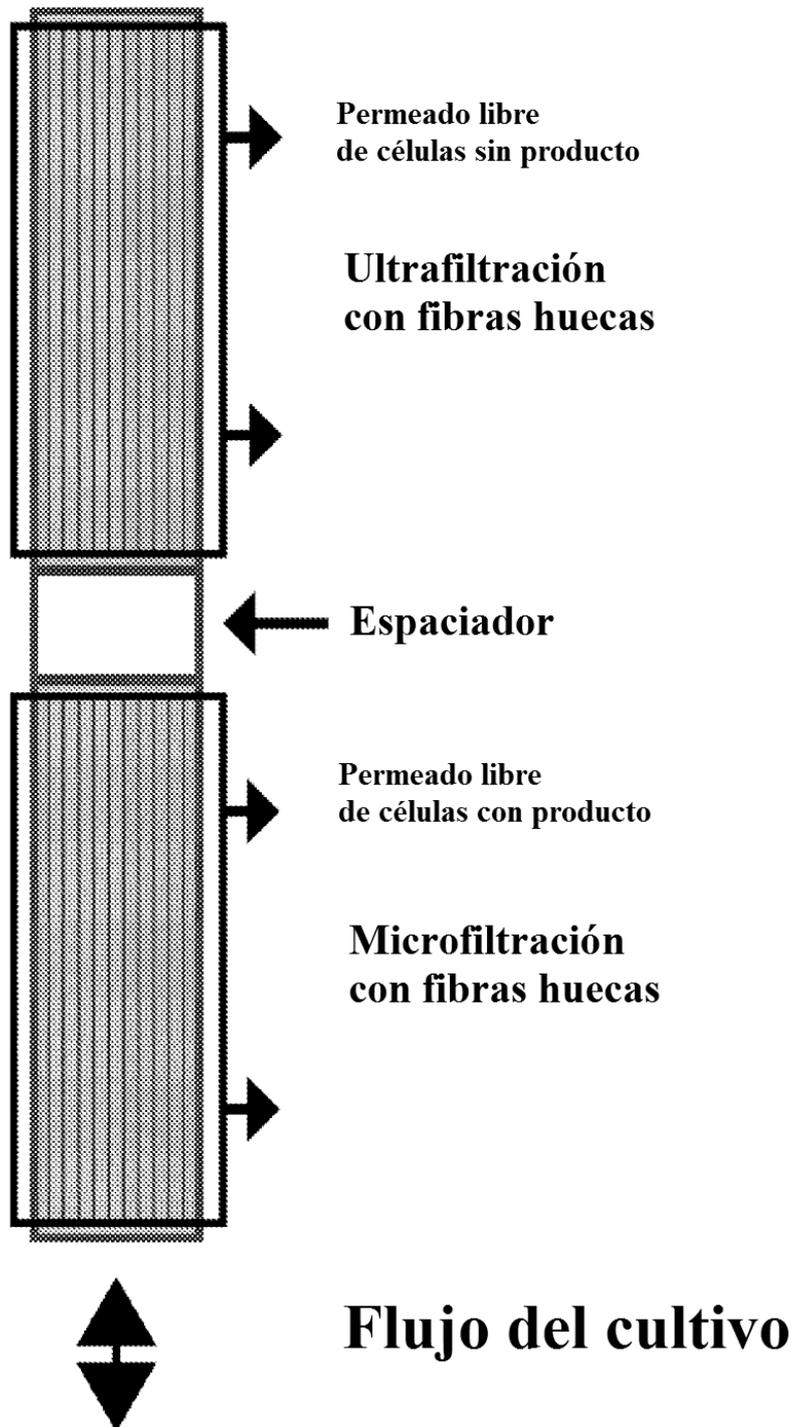


Figura 1

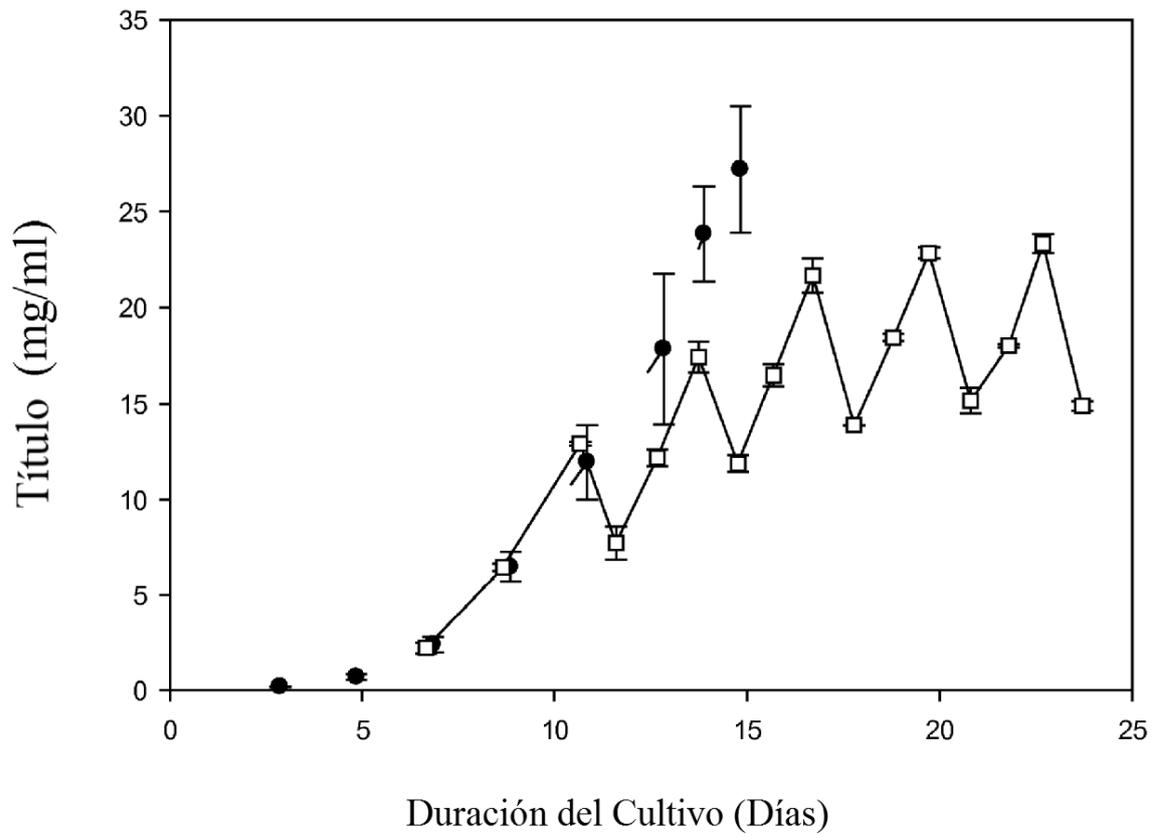


Figura 2

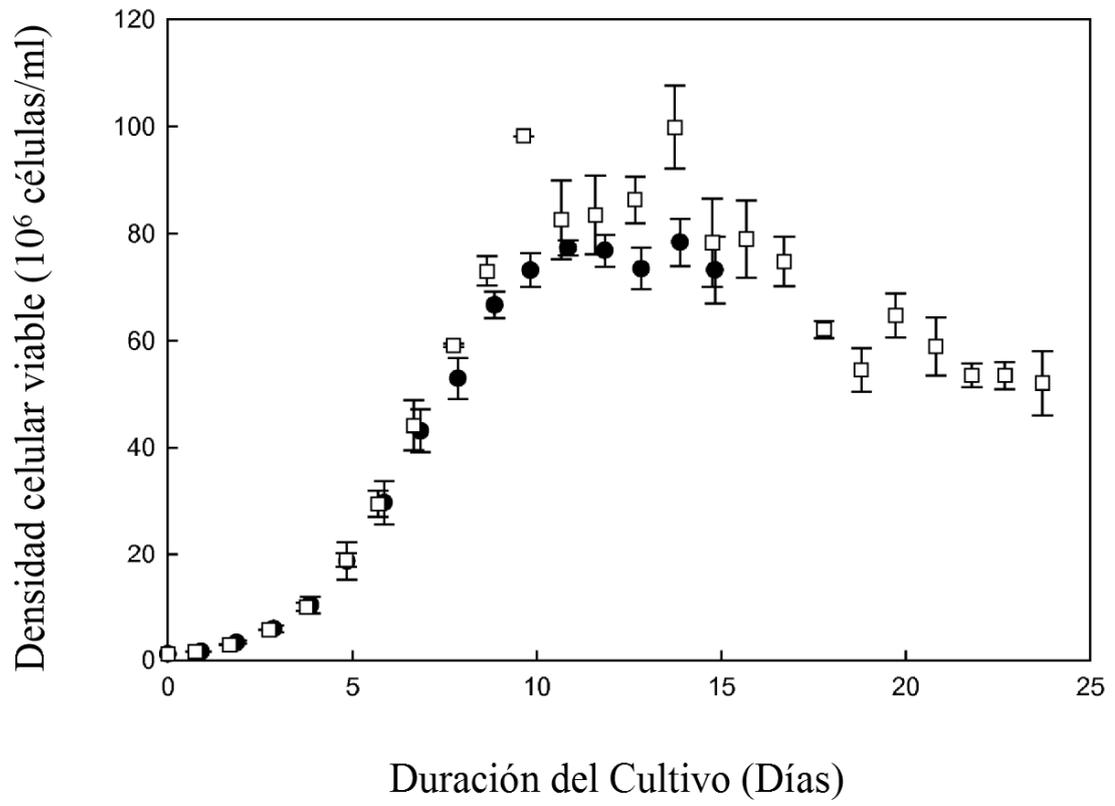


Figura 3

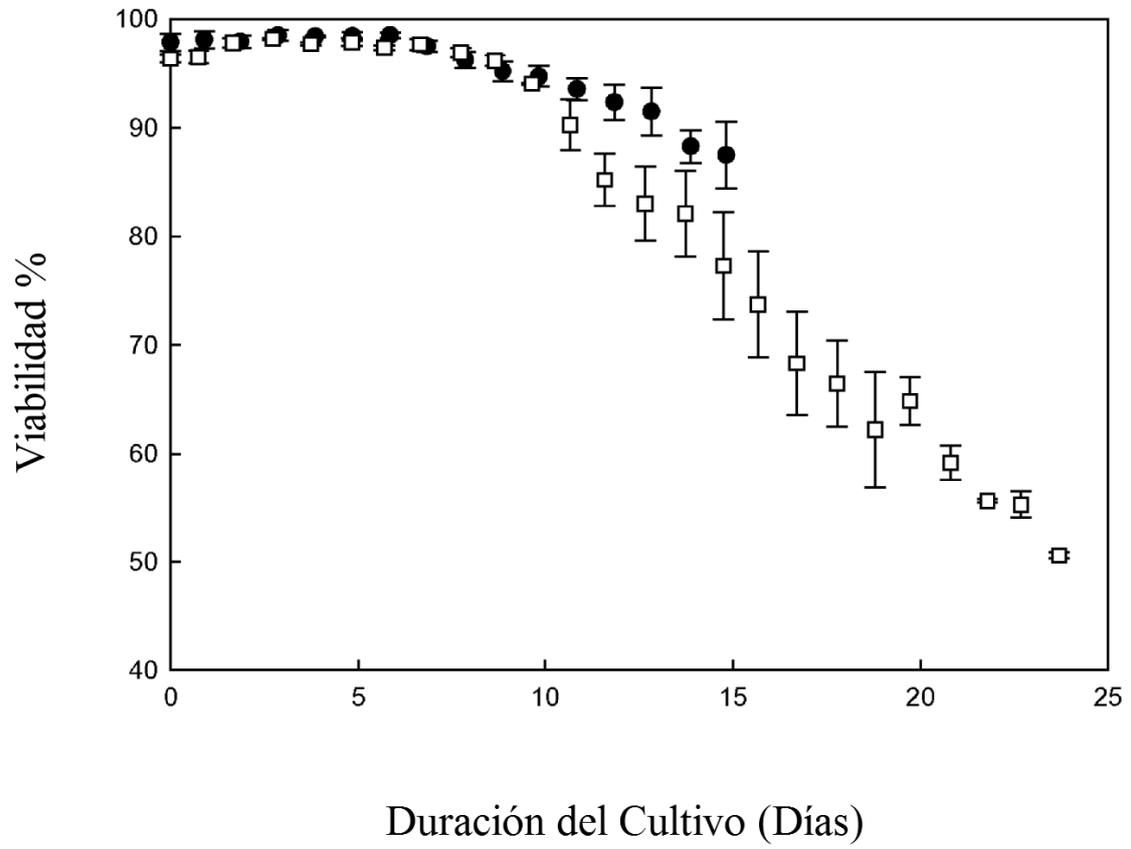


Figura 4

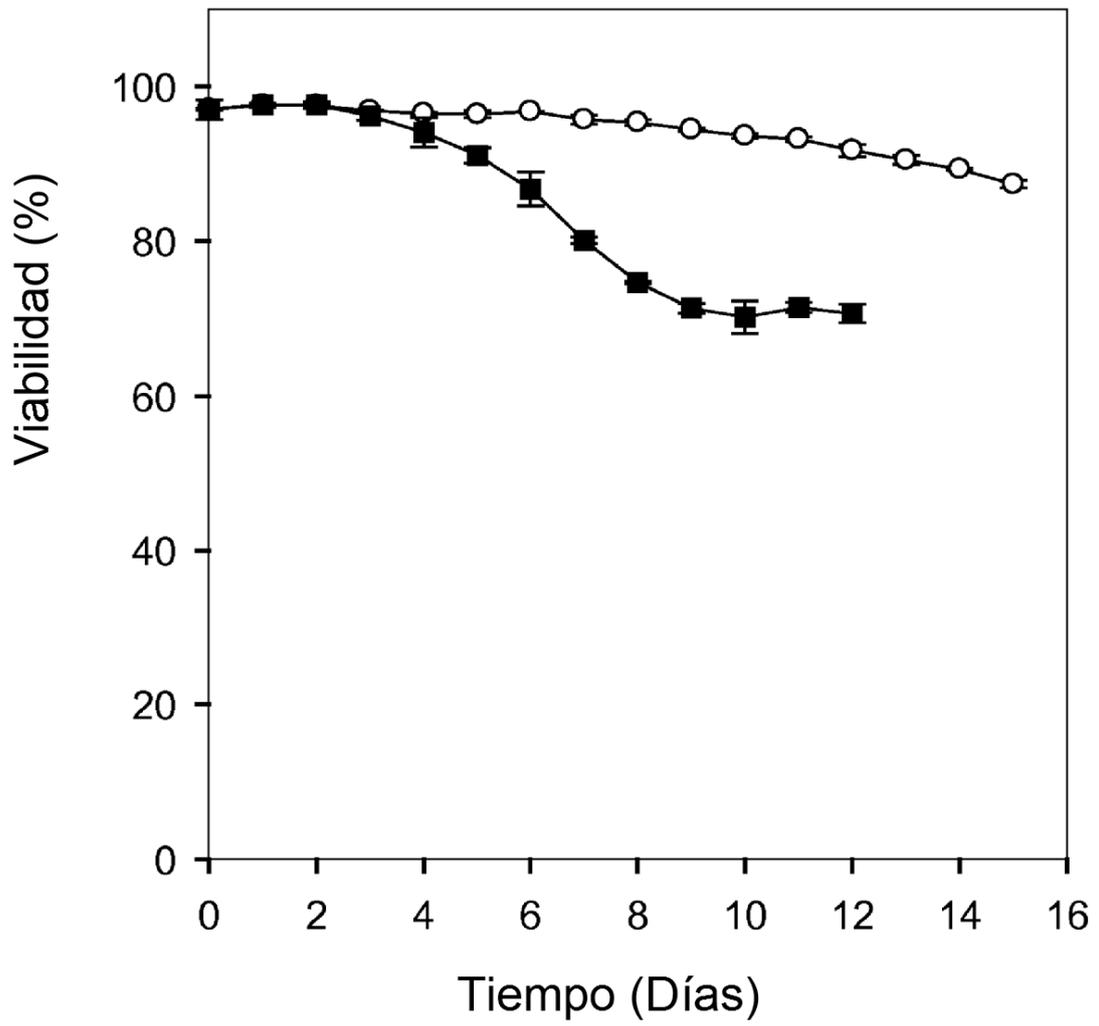


Figura 5

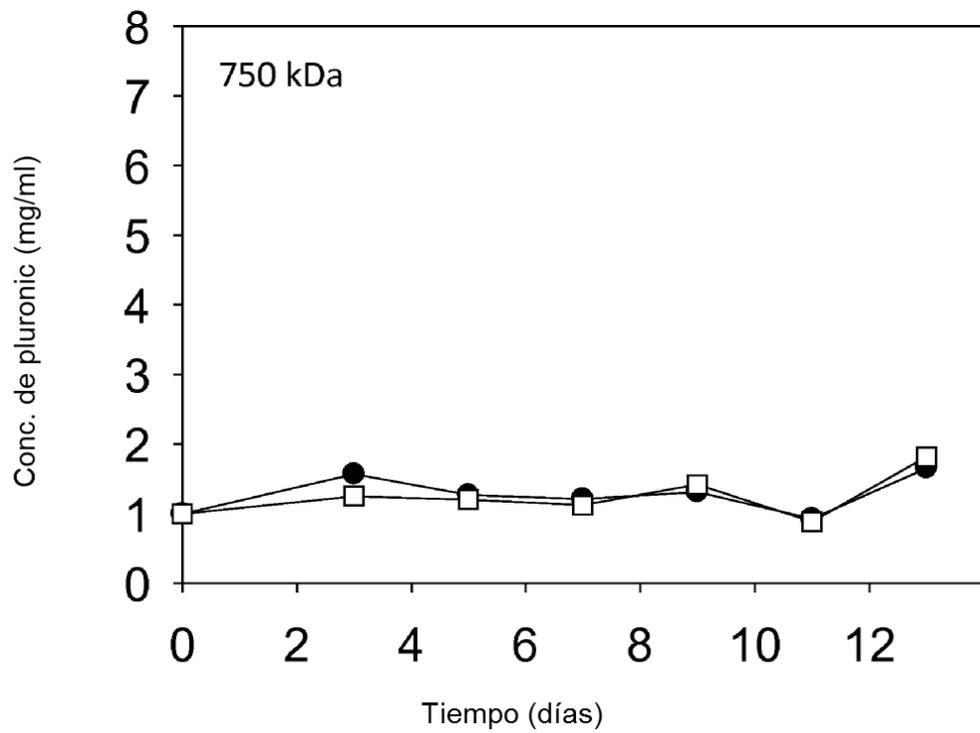
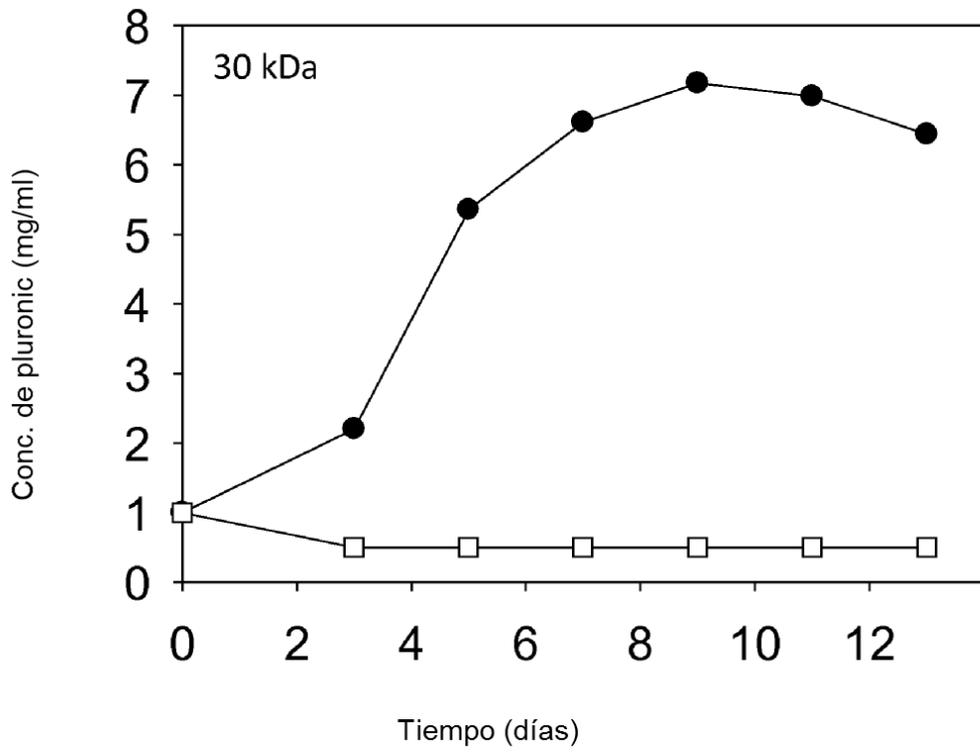


Figura 6

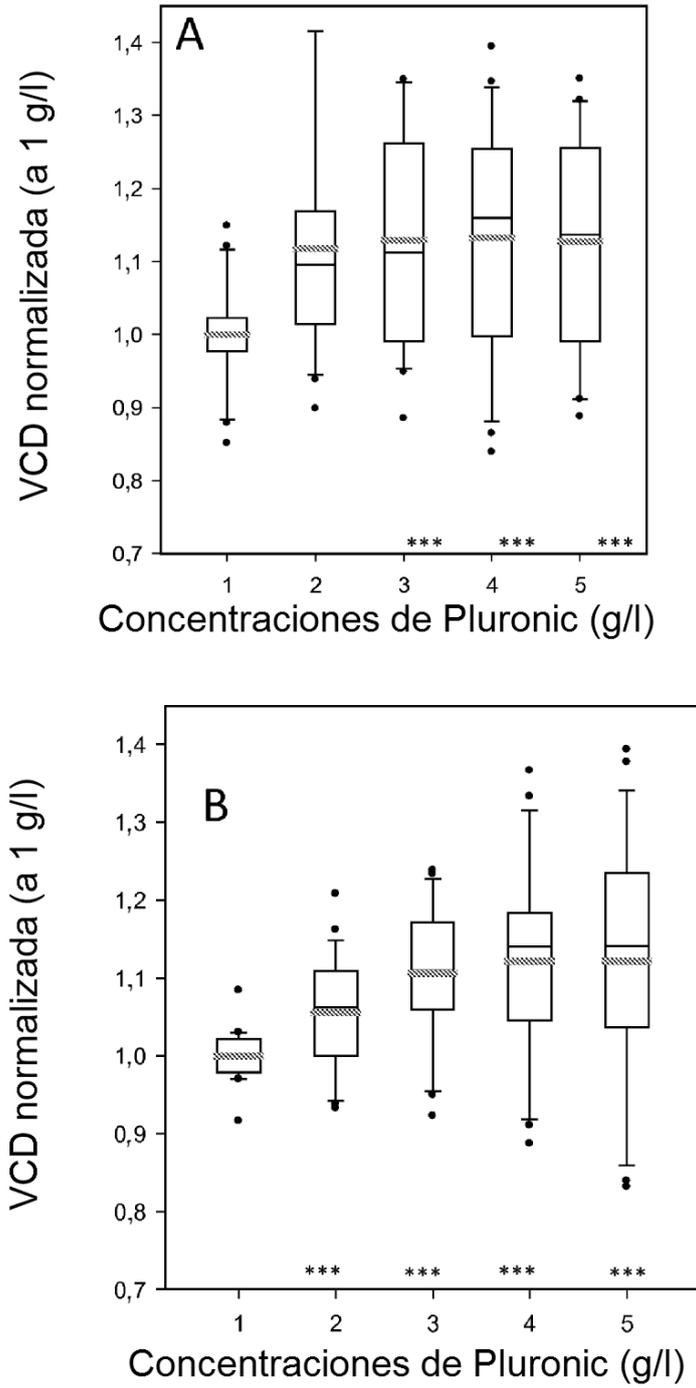


Figura 7A

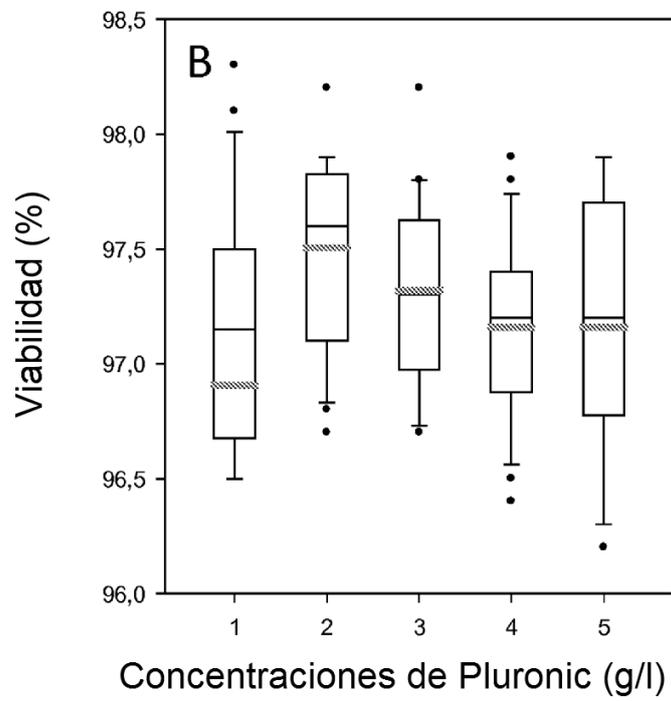
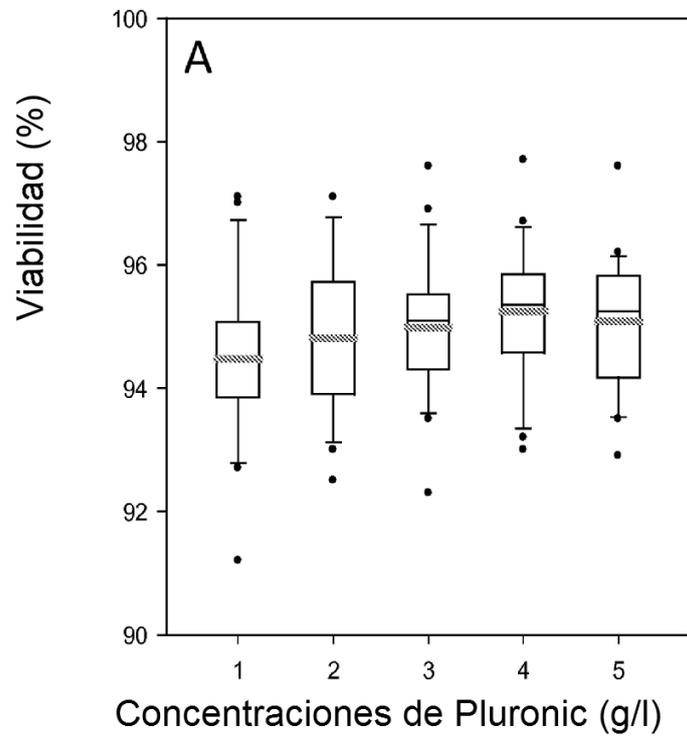


Figura 7B

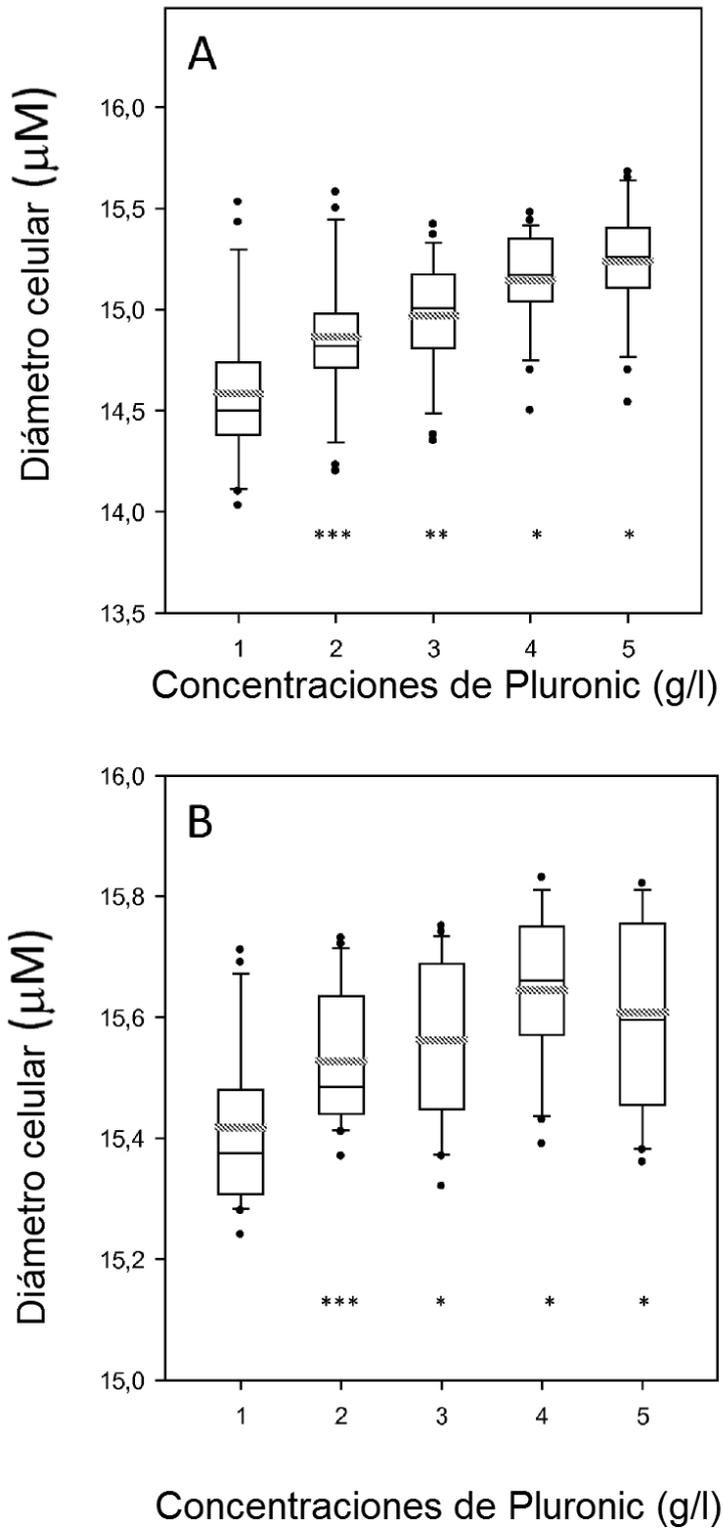


Figura 7C

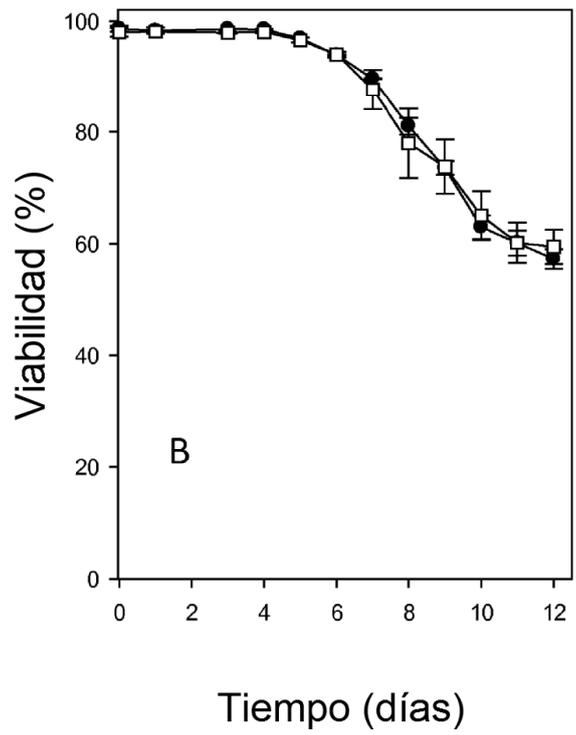
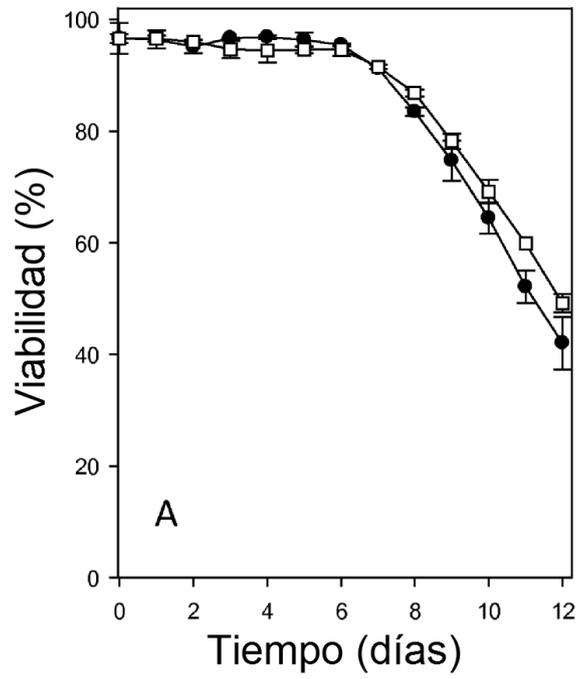


Figura 8

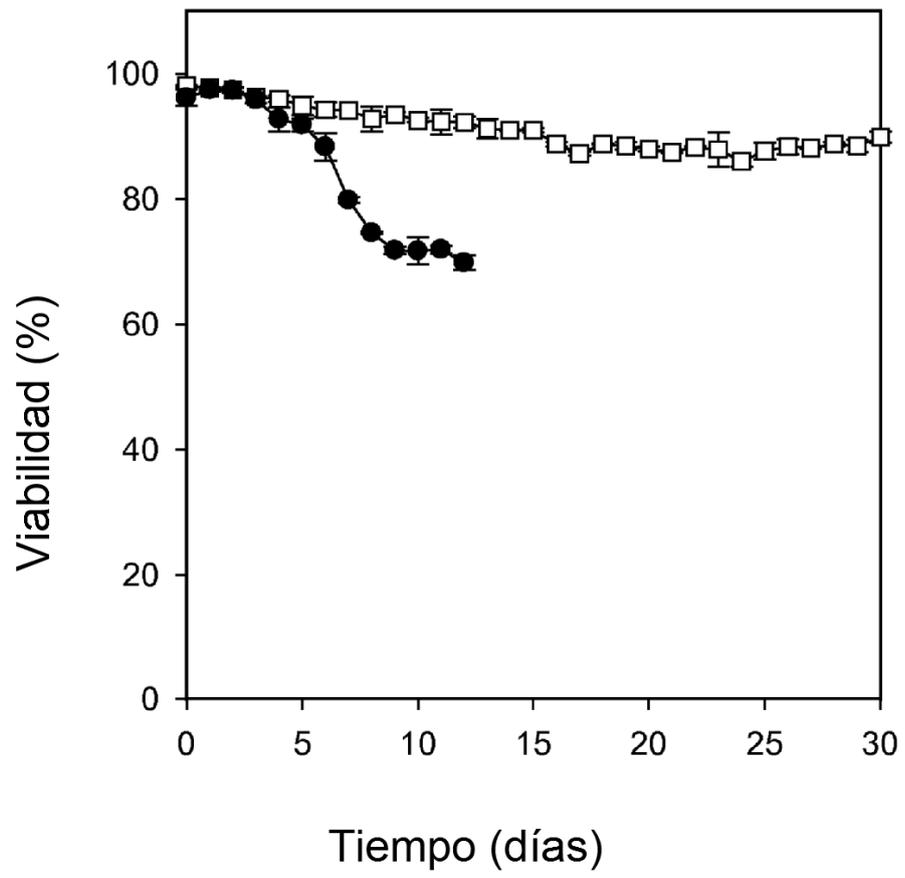


Figura 9

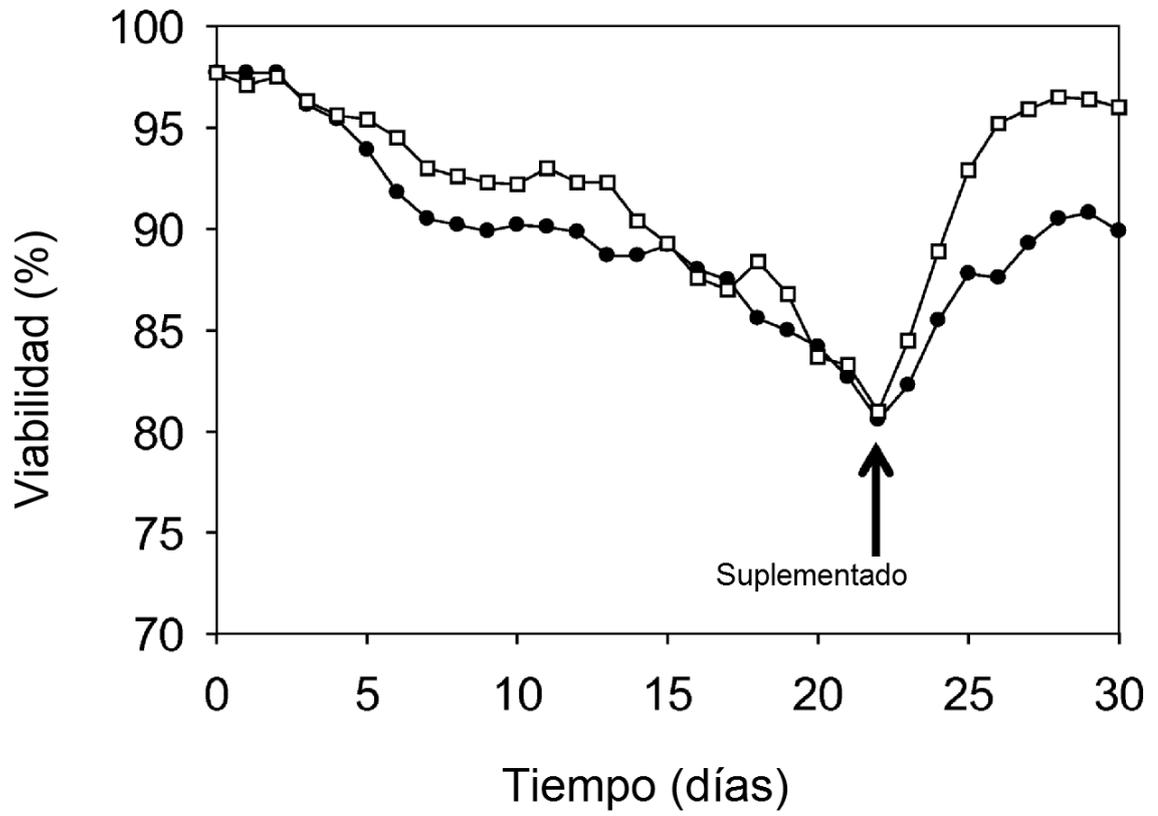


Figura 10

FIG.11B

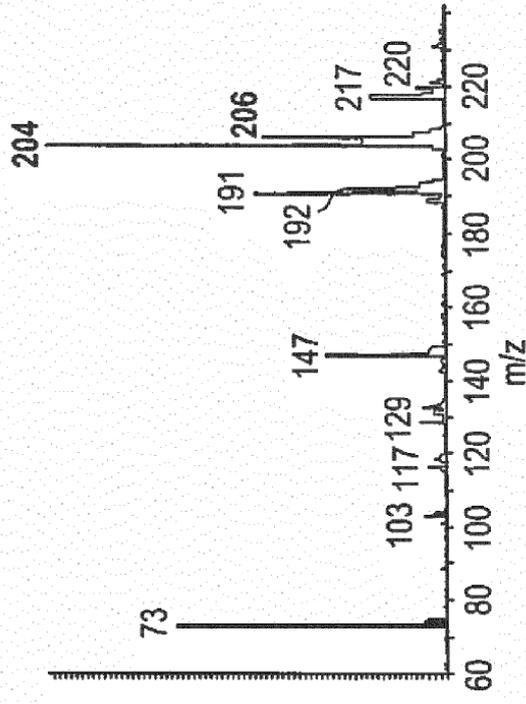


FIG.11A

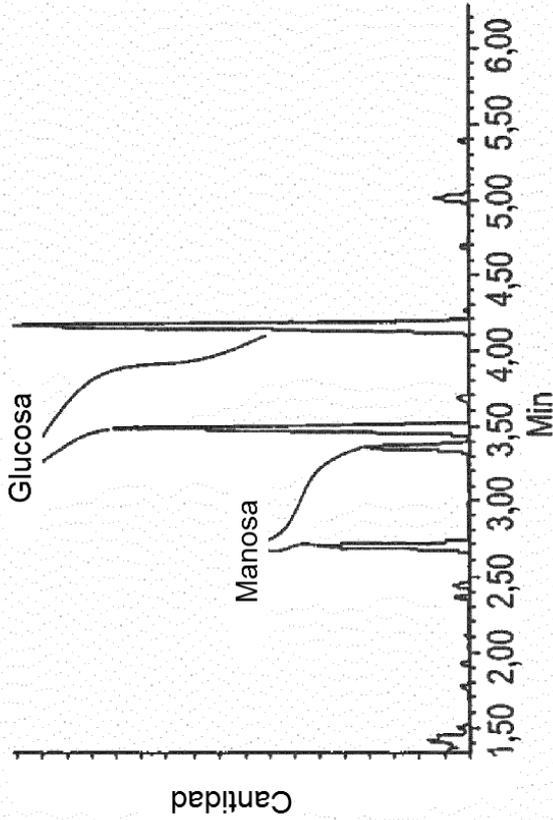


FIG.11C

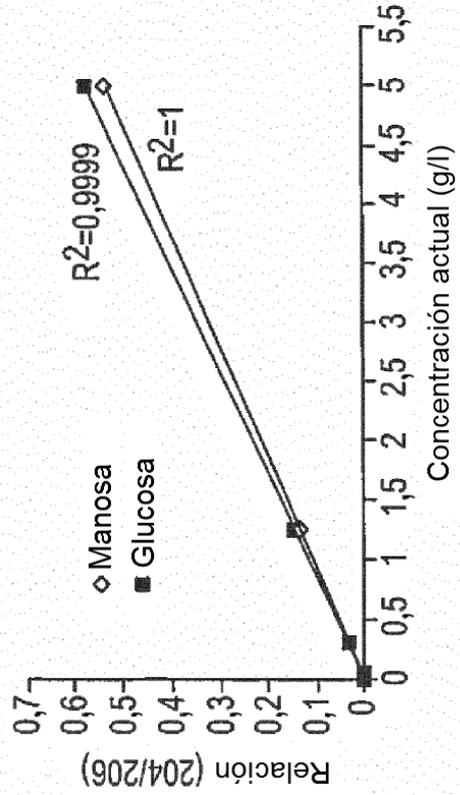


FIG. 12A

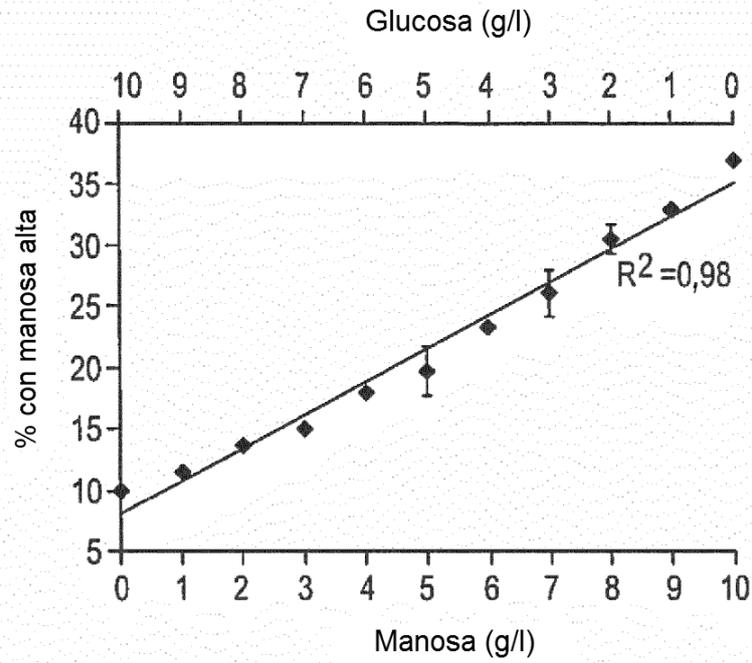


FIG. 12B

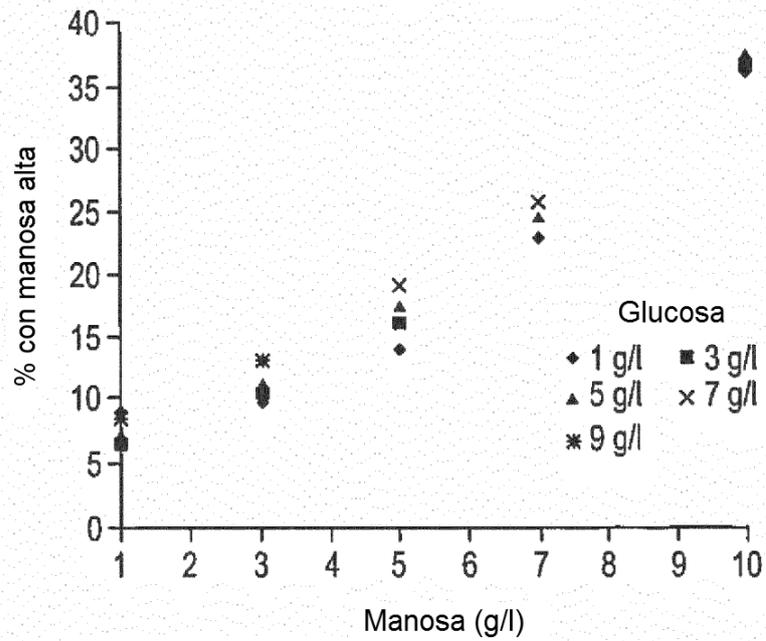
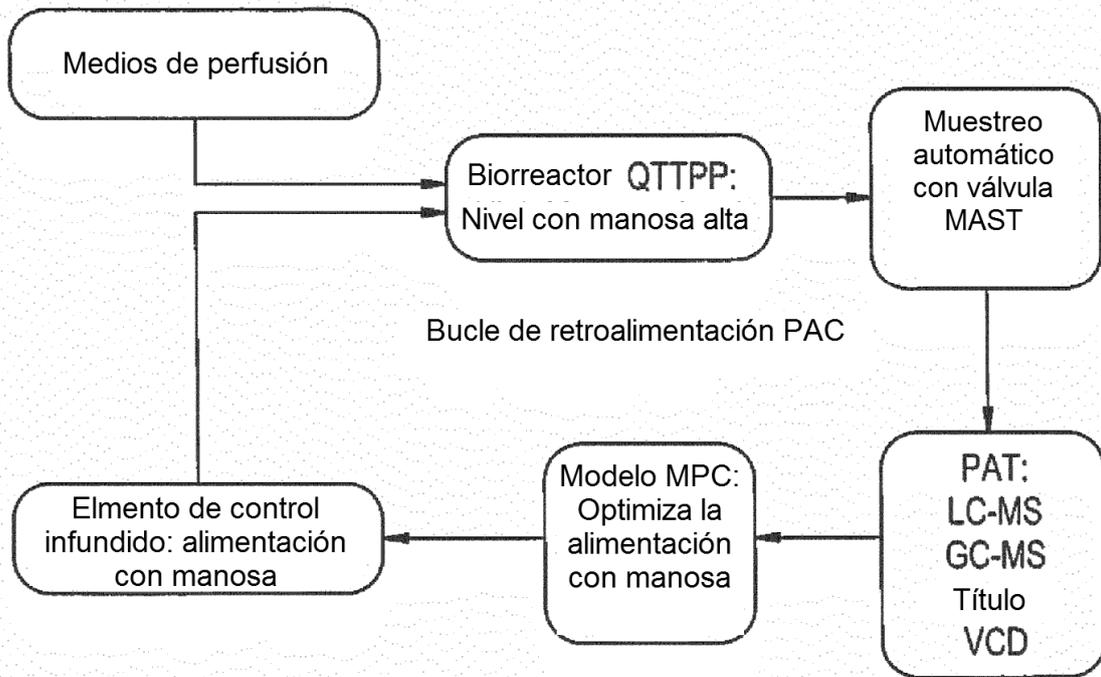


FIG. 13



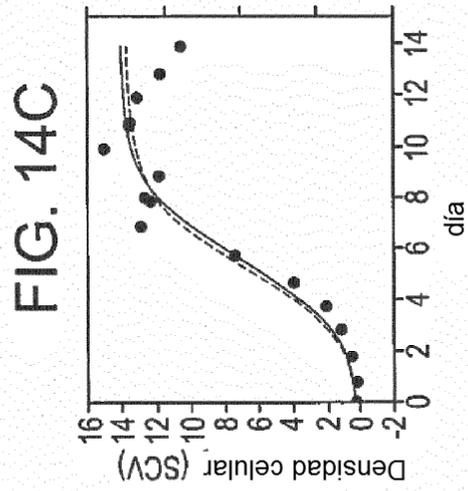
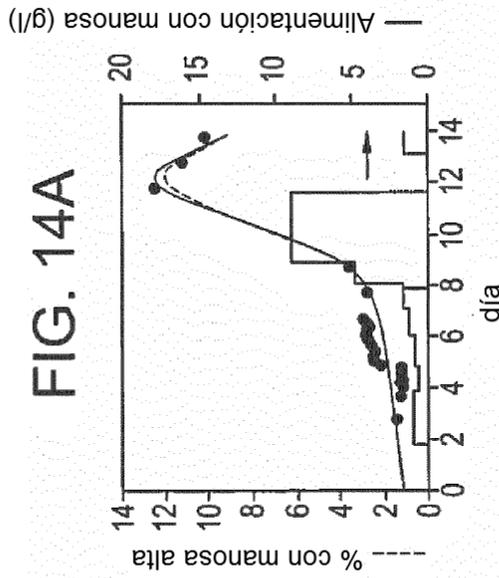
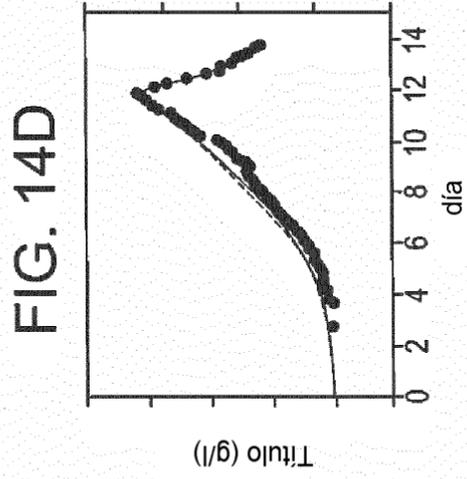
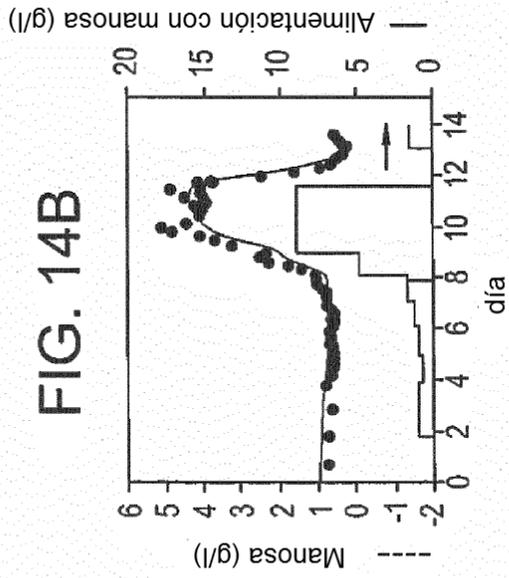


FIG. 15B

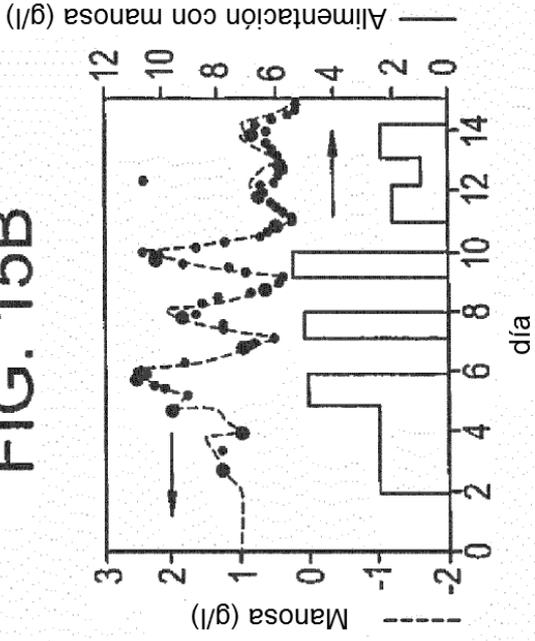


FIG. 15D

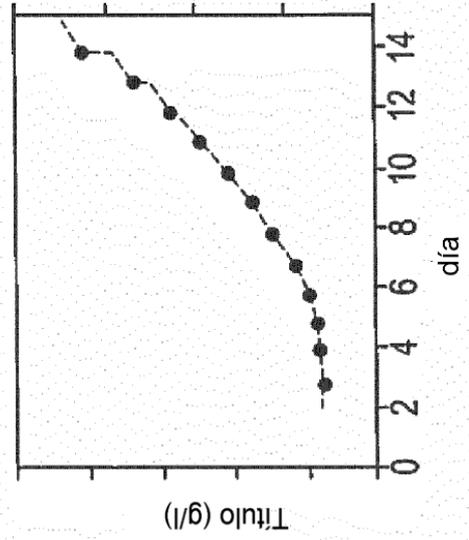


FIG. 15A

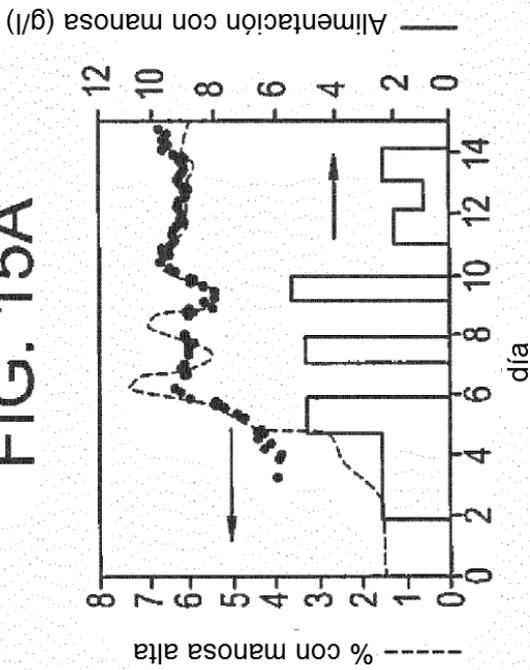


FIG. 15C

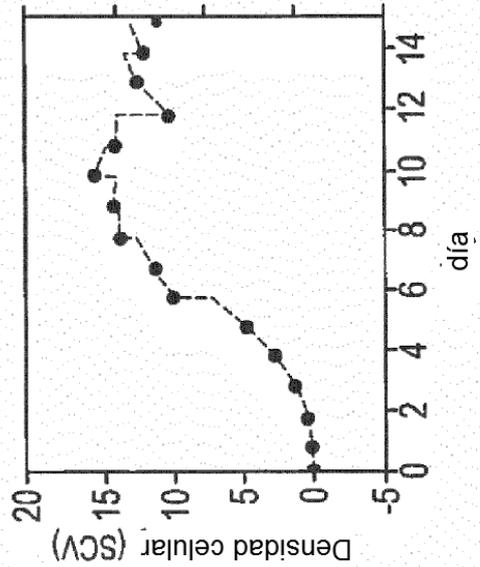


FIG. 16

