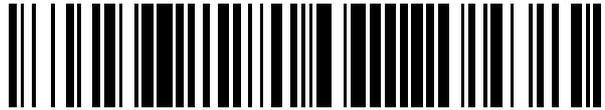


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 927**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/US2014/017785**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14130864**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14709829 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2958989**

54 Título: **Procedimientos de cultivo por perfusión de microportadores y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.02.2013 US 201361768215 P

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

26.06.2019

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**YANG, JIANGUO y
YANG, YANG**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 717 927 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

Procedimientos de cultivo por perfusión de microportadores y usos de los mismos

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Nº de Serie 61/768.215, presentada el 22 de febrero de 2013.

10 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a procedimientos de biología molecular, desarrollo de procedimientos de cultivo de células y la fabricación de proteínas recombinantes.

15 ANTECEDENTES

Las células de mamíferos que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante a menudo se utilizan para producir proteínas terapéutica o comercialmente importantes. Aunque se han utilizado varios sistemas de cultivo celular de alto rendimiento (HT) en la industria de la biotecnología para los procedimientos de alimentación por lotes durante años, no se sabe que exista ningún modelo HT para un cultivo de células basado en la perfusión que utilice tubos de agitación y microportadores.

Los procedimientos previos de cultivo de tejido de mamífero utilizando tubos de agitación para los cultivos por lotes de alimentación o cultivos de perfusión pueden producir proteínas recombinantes en una alta densidad celular; sin embargo, los anteriores procedimientos de cultivo de células utilizando un tubo de agitación y microportadores no han tenido éxito debido a la tensión de cizallamiento infligida a las células de mamífero por los microportadores circulantes, lo que da lugar a una disminución en el crecimiento celular. Además, es difícil recoger una proteína producida de forma recombinante a partir de un cultivo en tubo agitación que contiene microportadores.

En la tesis doctoral de Rosario Scott ("Growth of mesenchymal stromal cells in automated microwell cultures: influence of the engineering environment on cell growth kinetics and non-directed differentiation", University College de Londres, septiembre de 2008), se describió que los cultivos de células estromales mensenquimales humanas en microportadores no conseguían soportar la proliferación de células después de los primeros cuatro días en cultivo.

35 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el cultivo de una célula de mamífero en la forma específica descrita en este documento (incluyendo el uso de un tubo de agitación y una pluralidad de microportadores) da lugar a un crecimiento activo de cultivos de células de mamíferos que replican eficazmente la producción de proteína recombinante conseguida en un biorreactor de perfusión continua a mayor escala que contiene microportadores. De este modo, la presente memoria describe procedimientos de cultivo de una célula de mamífero adherente que incluyen: proporcionar un tubo de agitación que contenía una célula de mamífero dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa, por ejemplo, aproximadamente del 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación, y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de aproximadamente 120 revoluciones por minuto (RPM) a aproximadamente 240 RPM (por ejemplo, de aproximadamente 120 RPM a aproximadamente 160 RPM); y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales. También se proporcionan diversos procedimientos que utilizan estos procedimientos de cultivo.

En el presente documento se proporcionan procedimientos de cultivo de una célula de mamífero adherente. Estos procedimientos de la invención incluyen proporcionar un tubo de agitación que contenía una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales. En algunas realizaciones de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido está sustancialmente libre de los microportadores. En algunas realizaciones de estos procedimientos, al comienzo del periodo de tiempo, el primer medio de cultivo líquido contiene de $0,1 \times 10^6$ células/ml a $0,5 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones de

5 cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula CHO contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante es una inmunoglobulina, una enzima, un factor de crecimiento, un fragmento de proteína o una proteína diseñada. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan de forma simultánea. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan de forma continua. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan periódicamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido se incrementan con el tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido es el mismo que el segundo medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido es diferente del segundo medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el tubo de agitación tiene un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 100 ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente se suspende en de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido y/o el segundo medio de cultivo líquido se seleccionan del grupo que consiste en: un medio de cultivo líquido químicamente definido, un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido que contiene suero, un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animales y un medio libre de proteína. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, en cada período de 24 horas, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segunda medio de cultivo líquido añadido es de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 95% del volumen del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la agitación se dejó durante un periodo de tiempo de al menos 30 segundos antes de extraer el primer volumen del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores tiene un diámetro promedio de entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 800 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores contiene uno o más poros. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, dicho uno o más poros tienen un diámetro promedio de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 35 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incuba el tubo de agitación en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.

35 También se proporcionan procedimientos para el cultivo de una célula de mamífero adherente que incluyen: (a) proporcionar un tubo de agitación que contenía una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido que ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores en una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l;

40 (b) incubar el tubo de agitación durante un primer periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM, y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del primera período de tiempo, en cada periodo de 24 horas posterior, (i) extraer de manera continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de microportadores desde el tubo de agitación, donde el primer volumen es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 95 % del volumen del primer medio de cultivo líquido; y (ii) añadir al tubo de agitación un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primer y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; (c) incubar el tubo de agitación después de que la concentración de células de mamífero adherentes alcance aproximadamente la densidad celular objetivo durante un segundo periodo de tiempo de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días, a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C con agitación rotatoria, y en cada un periodo de 24 horas, realizar las etapas (b)(i) y (b)(ii), donde el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en la etapa (b) son de un tipo sustancialmente diferente de los utilizados en la etapa (c); y

50 (d) incubar el tubo de agitación durante un tercer período de tiempo mayor de 2 días, a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C con agitación rotatoria, y en cada periodo de 24 horas, realizar las etapas (b)(i) y (b)(ii), donde los primero y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en la etapa (c) son del mismo tipo que los utilizados en la etapa (d).

60 En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, al comienzo del primer periodo de tiempo, el primer medio de cultivo líquido contiene de $0,1 \times 10^6$ células/ml a $0,5 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula CHO contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante es una inmunoglobulina secretada, una enzima secretada, un factor de crecimiento secretado, un fragmento de proteína secretado o una proteína diseñada secretada. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo

volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo se realizan de forma simultánea. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo se realizan de forma continua. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo se realizan periódicamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el tubo de agitación tiene un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 100 ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el volumen del primer medio de cultivo líquido es de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido y segundo medio de cultivo líquido utilizados en el primer período de tiempo es un medio de cultivo líquido que contiene suero o un medio de cultivo líquido que contiene un componente derivado de un animal, y el primer medio de cultivo primer y el segundo medio de cultivo líquido utilizados en el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo son un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido libre de componente derivado de un animal, o un medio libre de proteínas. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la agitación se deja de hacer durante al menos 30 segundos antes de extraer el primer volumen del primer medio de cultivo líquido del tubo de agitación durante uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores tiene un diámetro promedio de entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 800 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores contiene uno o más poros. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, dicho uno o más poros tienen un diámetro promedio de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 35 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído durante el tercer período de tiempo contiene un número sustancial de microportadores. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído durante el tercer período de tiempo está sustancialmente libre de microportadores. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo son aproximadamente el 70% del volumen del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incuba el tubo de agitación en una o más de (b), (c), y (d) en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.

También se proporcionan procedimientos de producción de una proteína recombinante. Estos procedimientos incluyen: proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante dispuesto en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; y recuperar la proteína recombinante a partir de la célula de mamífero adherente o del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se recupera a partir de la célula de mamífero adherente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se recupera del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído está sustancialmente libre de microportadores. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, al comienzo del período de tiempo, el primer medio de cultivo líquido contiene de $0,1 \times 10^6$ células/ml a $0,5 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante es una inmunoglobulina, una enzima, un factor de crecimiento, un fragmento de proteína o una proteína diseñada. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se secreta en el primer y/o segundo medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan de forma simultánea. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan continuamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan periódicamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido eliminado y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido se incrementan con el tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido es el mismo que el segundo medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio

de cultivo líquido es diferente del segundo medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el tubo de agitación tiene un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 100 ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente se suspende en de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido y/o el segundo medio de cultivo líquido se seleccionan del grupo de: un medio de cultivo líquido químicamente definido, un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido que contiene suero, un medio de cultivo líquido libre de un componente derivado de un animal y un medio libre de proteína. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, en cada período de 24 horas, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido son de aproximadamente 30% a aproximadamente 95% del volumen del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la agitación se deja de realizar durante un periodo de tiempo de al menos 30 segundos antes de extraer el primer volumen del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores tiene un diámetro promedio de entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 800 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores contiene uno o más poros. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, dicho uno o más poros tienen un diámetro promedio de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 35 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incuba el tubo de agitación en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.

También se proporcionan procedimientos de producción de una proteína recombinante que incluyen: (a) proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante dispuesto en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores en una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l;

(b) incubar el tubo de agitación durante un primer periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM, y después de aproximadamente las primeras 48 horas a 96 horas del primer periodo de tiempo, en cada periodo de 24 horas posterior, (i) extraer de manera continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de microportadores del tubo de agitación, donde el primer volumen es de aproximadamente el 10% a aproximadamente 95% del volumen del primer medio de cultivo líquido; y (ii) añadir al tubo de agitación un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primer y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; (c) incubar el tubo de agitación después de que la concentración de células de mamífero adherentes alcance aproximadamente la densidad celular objetivo durante un segundo periodo de tiempo de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días, a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C con agitación rotatoria, y en cada un periodo de 24 horas, realizar las etapas (b)(i) y (b)(ii), donde el primero y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en la etapa (b) son de un tipo sustancialmente diferentes de los utilizados en la etapa (c);

(d) incubar el tubo de agitación durante un tercer período de tiempo mayor de 2 días, a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C con agitación rotatoria, y en cada período de 24 horas, la realización de las etapas (b)(i) y (b)(ii), donde el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en la etapa (c) son del mismo tipo que los utilizados en la etapa (d); y (e) recuperar la proteína recombinante a partir de la célula de mamífero adherente o del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados durante el primer, segundo y/o tercer períodos de tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se recupera de la célula de mamífero adherente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se recupera del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados durante uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, al comienzo del primer periodo de tiempo, el primer medio de cultivo líquido contiene de $0,1 \times 10^6$ células/ml a $0,5 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante es una inmunoglobulina, una enzima, un factor de crecimiento, un fragmento de proteína o una proteína diseñada. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se secreta en el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados durante uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo se realizan de forma simultánea. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo se realizan continuamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo, y el tercer período de tiempo se realizan periódicamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el tubo de agitación tiene un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente

100 ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el volumen del primer medio de cultivo líquido es de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido utilizados en el primer periodo de tiempo es medio de cultivo líquido que contiene suero o un medio de cultivo líquido que contiene un componente derivado de un animal, y el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido utilizados en el segundo periodo de tiempo y el tercer periodo de tiempo son un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido libre de un componente derivado de animal o un medio libre de proteínas. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la agitación se deja de realizar durante al menos 30 segundos antes de extraer el primer volumen del primer medio de cultivo líquido del tubo de agitación durante uno o más del primer periodo de tiempo, el segundo periodo de tiempo y el tercer periodo de tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores tiene un diámetro promedio de entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 800 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la pluralidad de microportadores contiene uno o más poros. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, dicho uno o más poros tienen un diámetro promedio de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 35 μm . En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del medio de cultivo líquido extraído durante el tercer periodo de tiempo contiene un número sustancial de microportadores. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del medio de cultivo líquido extraído durante el tercer periodo de tiempo está sustancialmente libre de microportadores. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido en uno o más del primer periodo de tiempo, el segundo periodo de tiempo y el tercer periodo de tiempo son de aproximadamente el 70% del volumen del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incuba el tubo de agitación en una o más de (b), (c), y (d) en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.

También se proporcionan procedimientos para ensayar un procedimiento de fabricación para la fabricación de una proteína recombinante. Estos procedimientos incluyen: proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante dispuesto en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; detectar la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo; y comparar la cantidad de proteína recombinante presente en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo con un nivel de referencia de la proteína recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido está sustancialmente libre de células de mamífero adherentes. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el nivel de referencia de la proteína recombinante es un nivel de proteína recombinante producida usando un procedimiento de cultivo diferente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el procedimiento de cultivo diferente utiliza un primer o segundo medios de cultivo líquidos diferentes, una célula de mamífero adherente diferente, una temperatura diferente, un nivel de agitación diferente, un tubo de agitación diferente o un microportador diferente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el procedimiento de cultivo diferente utiliza una materia prima diferente, un agente antiaglomerante diferente o un medio de cultivo líquido definido químicamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se utiliza el procedimiento para realizar experimentos de cultivo celular de alto rendimiento para llevar a cabo un diseño de experimento (DOE) o un estudio de calidad por diseño (QBD). En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el tubo de agitación tiene un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 100 ml. En algunas realizaciones de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente se suspende en de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml del primer medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la célula de mamífero adherente es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante es una inmunoglobulina secretada, una enzima secretada, un factor de crecimiento secretada, un fragmento de proteína secretado o una proteína diseñada secretada, y donde la proteína recombinante se recupera del primer o segundo medios de cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante se recupera a partir de la célula de mamífero adherente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la proteína recombinante es una inmunoglobulina, una enzima, un factor de crecimiento, un fragmento de proteína o una proteína diseñada. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan de forma simultánea. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan continuamente. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan periódicamente. En algunas realizaciones de

- 5 cualquiera de estos procedimientos, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido se incrementan con el tiempo. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el primer medio de cultivo líquido y/o el segundo medio de cultivo líquido se seleccionan del grupo que consiste en: un medio de cultivo líquido químicamente definido, un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido que contiene suero, un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animales y un medio libre de proteína. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el tubo de agitación se incuba en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.
- 10 También se proporcionan procedimientos de control de la eficacia de un primer o segundo medios de cultivo líquidos, un ingrediente crudo o complemento presente en un primer o segundo medios de cultivo líquidos, o una fuente de una célula de mamífero adherente para su uso en un procedimiento para producir una proteína recombinante. Estos procedimientos incluyen: proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores en una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; detectar la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios cultivo; comparar la cantidad de proteína recombinante presente en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo con un nivel de referencia de la proteína recombinante producida mediante un procedimiento diferente que utiliza uno o más de un primer o segundo medio de cultivo líquido diferentes, un ingrediente crudo o complemento presente en el primero o segundo medio de cultivo líquido diferentes o una fuente diferente de una célula de mamífero adherente; e
- 25 identificar el primer o segundo medio de cultivo líquido, el ingrediente crudo o complemento presente en el primero o segundo medio de cultivo líquido, o la fuente de la célula de mamífero adherente que se asocia con una mayor cantidad de proteína recombinante en comparación con el nivel de referencia como eficaz para usar en un procedimiento de producción de una proteína recombinante. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incuba el tubo de agitación en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.
- 30 También se proporcionan procedimientos de optimización de un procedimiento de fabricación de producción de una proteína recombinante. Estos procedimientos incluyen: proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores en una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; detectar la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios cultivo; comparar la cantidad de proteína recombinante presente en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo con un nivel de referencia de la proteína recombinante producida mediante un procedimiento diferente; e identificar y eliminar o alterar en un procedimiento de fabricación cualquiera de los componentes de cultivo o de los parámetros que están asociados con una disminución en la cantidad de proteína recombinante producida en comparación con el nivel de referencia, o identificar y añadir a un procedimiento de fabricación cualquiera de los componentes de cultivo o parámetros que están asociados con un aumento en la cantidad de proteína recombinante producida en comparación con el nivel de referencia. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incuba el tubo de agitación en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.
- 55 También se describen procedimientos de ensayo para la presencia de un contaminante en un primer o segundo medio de cultivo líquido, una materia prima usada para generar un primer o segundo medio de cultivo líquido, o una fuente de una célula de mamífero. Estos procedimientos incluyen: proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, donde el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de aproximadamente 120 revoluciones por minuto (RPM) a aproximadamente 240 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, donde el primero y segundo volúmenes son

- aproximadamente iguales; detectar la proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo; comparar la cantidad de proteína recombinante presente en la célula o en el primer y/o segundo medio de cultivo con un nivel de referencia de la proteína recombinante producida mediante un procedimiento diferente que utiliza uno o más de un primer o segundo medio de cultivo líquido diferente, una materia prima diferente para generar el primer o segundo medio de cultivo líquido, o una fuente diferente de la célula de mamífero; e identificar el primer o segundo medio de cultivo líquido, la materia prima utilizada para generar el primer o segundo medio de cultivo líquido o la fuente de una célula de mamífero que contienen un contaminante cuando el nivel de proteína recombinante producida es menor que el nivel de referencia. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el contaminante es un contaminante biológico. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, el contaminante biológico se selecciona del grupo de: mycobacterium, un hongo, una bacteria, un virus y una célula de mamífero no deseada. En algunas realizaciones de cualquiera de estos procedimientos, se incubaba el tubo de agitación en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.
- 5 Tal como se usa en el presente documento, la palabra "un/una" o "pluralidad" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo particular. Por ejemplo, la frase "una célula de mamífero" representa "una o más células de mamífero", y la frase "pluralidad de microportadores" significa "uno o más microportadores."
- 10 El término "célula de mamífero" significa cualquier célula de o derivada de cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca o un conejo). En algunas realizaciones, la célula de mamífero puede ser, por ejemplo, una célula inmortalizada, una célula diferenciada, o una célula indiferenciada.
- 15 El término "densidad celular objetivo" significa una concentración específica de células por volumen de medio de cultivo para producir una proteína recombinante en cultivo. La densidad celular objetivo puede variar dependiendo de la célula de mamífero específica cultivada. Por ejemplo, la densidad celular objetivo puede ser de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente 50×10^6 células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/ml, de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml, o entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/ml).
- 20 El término "sustancialmente libre" significa una composición (por ejemplo, un medio de cultivo líquido) que está al menos o aproximadamente el 90% libre (por ejemplo, al menos o aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos o aproximadamente 99% libre, o aproximadamente 100% libre) de una sustancia específica (por ejemplo, una célula de mamífero o microportadores).
- 25 El término "cultivo" o "cultivo celular" se entiende el mantenimiento o crecimiento de una célula de mamífero en un medio de cultivo líquido bajo un conjunto controlado de condiciones físicas.
- 30 El término "tubo de agitación" se entiende un recipiente (por ejemplo, un recipiente estéril) que puede retener el medio de cultivo líquido que tiene al menos una superficie permeable a gases (por ejemplo, un extremo que tiene en un elemento permeable a los gases, por ejemplo, una membrana, que también pueden actuar como una barrera estéril) y/o al menos una tapón de ventilación, y es capaz de retener el medio líquido de cultivo dentro del recipiente en agitación (por ejemplo, agitación giratorio) y, al menos una parte de su forma es aproximadamente cilíndrica. Por ejemplo, un tubo de agitación puede ser un tubo (por ejemplo, un tubo Eppendorf™ de 50 ml o 15 ml), o cualquier equivalente reconocido en la técnica o versión modificada del mismo.
- 35 El término "medio de cultivo líquido" significa un fluido que contiene suficientes nutrientes para permitir que una célula de mamífero crezca en el medio in vitro. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido puede contener uno o más de: aminoácidos (por ejemplo, 20 aminoácidos), una purina (por ejemplo, hipoxantina), una pirimidina (por ejemplo, timidina), colina, inositol, tiamina, ácido fólico, biotina, calcio, niacinamida, piridoxina, riboflavina, timidina, cianocobalamina, piruvato, ácido lipoico, magnesio, glucosa, sodio, potasio, hierro, cobre, zinc, selenio y otros metales traza necesarios, y bicarbonato de sodio. Un medio de cultivo líquido puede contener suero de un mamífero. En algunos casos, un medio de cultivo líquido no contiene suero u otro extracto de un mamífero (un medio de cultivo líquido definido). Un medio de cultivo líquido puede contener trazas de metales, una hormona de crecimiento de mamífero y/o un factor de crecimiento de los mamíferos. Los ejemplos no limitantes de medio de cultivo líquido se describen en el presente documento y los ejemplos adicionales se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente.
- 40 La frase "un tipo sustancialmente diferente de medio de cultivo líquido" significa un medio de cultivo líquido que contiene un perfil de nutrientes sustancialmente diferente de otro medio de cultivo líquido. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido que contiene uno o más de un suero de mamífero, proteína de mamífero o una fracción o extracto de proteína de mamífero (por ejemplo, un medio de cultivo líquido que contiene suero) es un tipo sustancialmente diferente de medio de cultivo líquido que uno que no contiene ninguno de un suero de mamífero, proteína de mamífero o fracción o extracto de proteína de mamífero (por ejemplo, un medio de cultivo líquido libre
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

decomponentes derivados de animal, un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido químicamente definido, y un medio de cultivo líquido libre de proteínas).

La frase "sustancialmente el mismo tipo de medio de cultivo líquido" significa un medio de cultivo líquido que contiene aproximadamente el mismo perfil de nutrientes en comparación con otro medio de cultivo líquido. Por ejemplo, si el medio de cultivo líquido A y el medio de cultivo líquido B contienen ambos uno o más de un suero de mamífero, proteína de mamífero y una fracción o extracto de proteína de mamífero (por ejemplo, un medio de cultivo líquido que contiene suero), son sustancialmente iguales. En otro ejemplo, si el medio de cultivo líquido A y el medio de cultivo líquido B no contienen ninguno de un suero de mamífero, proteína de mamífero y fracción o extracto de proteína de mamífero (por ejemplo, un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animal, un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido químicamente definido y un medio de cultivo líquido libre de proteína), son sustancialmente iguales.

El término "microportador" significa una partícula (por ejemplo, un polímero orgánico) que tiene un tamaño de entre 20 µm y aproximadamente 1000 µm que contiene una superficie que es permisiva o promueve la unión de una célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero que se describen en este documento o se conocen en la técnica). Un microportador puede contener uno o más poros (por ejemplo, poros con un diámetro promedio de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 100 µm). Los ejemplos no limitantes de microportadores se describen en este documento. Ejemplos adicionales de microportadores son conocidos en la técnica. Un microportador puede contener, por ejemplo, un polímero (por ejemplo, celulosa, polietilenglicol, o poli(ácido láctico-co-glicólico)).

El término "medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animal" significa un medio de cultivo líquido que no contiene ningún componente (por ejemplo, proteínas o suero) derivados de un animal.

El término "medio de cultivo líquido libre de suero" se refiere a un medio de cultivo líquido que no contiene suero animal.

El término "medio de cultivo líquido que contiene suero" significa un medio de cultivo líquido que contiene suero animal.

El término "medio de cultivo líquido definido químicamente" significa un medio de cultivo líquido en el que sustancialmente todos los componentes químicos son conocidos. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido químicamente definido no contiene suero fetal bovino, albúmina de suero bovino, o albúmina de suero humano, ya que estas preparaciones contienen típicamente una mezcla compleja de albúminas y lípidos.

El término "medio de cultivo líquido libre de proteína" significa un medio de cultivo líquido que no contiene ninguna proteína (por ejemplo, ninguna proteína detectable).

"Agitación rotatoria" es un término bien conocido en la técnica y se refiere al movimiento de un tubo de agitación de una manera generalmente circular, por ejemplo, en sentido horario o en sentido antihorario, con el fin de, por ejemplo, aumentar la concentración de O₂ disuelto en un medio de cultivo líquido contenido en el mismo. La agitación se puede realizar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, un instrumento que mueve el tubo de agitación en un movimiento circular o elipsoidal, tal como un agitador rotatorio. En este documento se describen dispositivos a modo de ejemplo que se pueden utilizar para llevar a cabo la agitación rotatoria. Ejemplos adicionales de tales dispositivos también son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

El término "inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 15 aminoácidos (por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 aminoácidos) de una proteína inmunoglobulina (por ejemplo, una secuencia de dominio variable, una secuencia de marco o una secuencia de dominio constante). La inmunoglobulina puede incluir, por ejemplo, al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena ligera y/o al menos 15 aminoácidos de una cadena pesada de inmunoglobulina. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo aislado (por ejemplo, una IgG, IgE, IgD, IgA, o IgM). La inmunoglobulina puede ser una subclase de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4). La inmunoglobulina puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento scFv. La inmunoglobulina puede ser también un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo trispecífico, o un anticuerpo dímero, trímero o multímero, o un dímero, un Affibody® o Nanobodies®. La inmunoglobulina puede ser también una proteína diseñada que contiene al menos un dominio de inmunoglobulina (por ejemplo, una proteína de fusión). Ejemplos no limitantes de inmunoglobulinas se describen en el presente documento y los ejemplos adicionales de inmunoglobulinas se conocen en la técnica.

El término "fragmento de proteína" o "fragmento de polipéptido" significa una porción de una secuencia de polipéptido que tiene al menos o aproximadamente 4 aminoácidos, por ejemplo, al menos o aproximadamente 5 aminoácidos, al menos o aproximadamente 6 aminoácidos, al menos o aproximadamente 7 aminoácidos, al menos o aproximadamente 8 aminoácidos, al menos o aproximadamente 9 aminoácidos, al menos o aproximadamente 10 aminoácidos, al menos o aproximadamente 11 aminoácidos, al menos o aproximadamente 12 aminoácidos, al menos o aproximadamente 13 aminoácidos, al menos o aproximadamente 14 aminoácidos, al menos o

aproximadamente 15 aminoácidos, al menos o aproximadamente 16 aminoácidos, al menos o aproximadamente 17 aminoácidos, al menos o aproximadamente 18 aminoácidos, al menos o aproximadamente 19 aminoácidos, o al menos o aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, o más de 20 aminoácidos de longitud. Puede producirse un fragmento de la proteína recombinante usando cualquiera de los procedimientos descritos en este documento.

El término "proteína diseñada" significa un polipéptido que no está codificado de forma natural por un ácido nucleico presente endógeno dentro de un organismo (por ejemplo, un mamífero). Los ejemplos de proteínas diseñadas incluyen enzimas (por ejemplo, con una o más sustituciones, deleciones, inserciones, o adiciones de aminoácidos que resultan en un aumento de la estabilidad y/o actividad catalítica de la enzima diseñada), proteínas de fusión, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos divalentes, anticuerpos trivalentes o un diacuerpo), y proteínas de unión a antígenos que contienen al menos una secuencia de andamio estructural recombinante.

El término "recuperar" o "que recupera" en ciertos contextos significa purificar o aislar al menos parcialmente (por ejemplo, al menos o aproximadamente 5%, por ejemplo, al menos o aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos o aproximadamente el 95% de pureza en peso) una proteína recombinante a partir de uno o más de otros componentes presentes en el medio de cultivo celular (por ejemplo, células de mamíferos o proteínas del medio de cultivo) o uno o más de otros componentes (por ejemplo, ADN, ARN, u otras proteínas) presentes en un lisado celular de mamífero. Los procedimientos no restrictivos para la recuperación de una proteína a partir de un medio de cultivo líquido o de un lisado de células de mamíferos se describen en este documento y otros son conocidos en la técnica.

El término "proteína secretada" o "proteína recombinante secretada" significa una proteína o una proteína recombinante que contenía originalmente al menos una secuencia señal de secreción cuando se traduce dentro de una célula de mamífero, y a través de, al menos en parte, de escisión enzimática de la secuencia señal de secreción en la célula de mamífero, se libera al menos parcialmente en el espacio extracelular (por ejemplo, un medio de cultivo líquido).

La frase "perfusión en gradiente" es conocida en la técnica y se refiere al cambio incremental (por ejemplo, aumento o disminución) en el volumen del medio de cultivo extraído y añadido a un volumen de cultivo inicial durante periodos incrementales (por ejemplo, un período de aproximadamente 24 horas, un período de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas, o un período de más de 24 horas) durante el periodo de cultivo (por ejemplo, la velocidad de realimentación del medio de cultivo sobre una base diaria). La fracción de los medios extraída y reemplazada cada día puede variar dependiendo de las células particular que se cultivan, la densidad de siembra inicial y la densidad celular en un momento particular.

El término "cultivo de alimentación por lotes" significa la adición incremental o continua de un segundo medio de cultivo líquido a un cultivo de células inicial sin extracción sustancial o significativa del primer medio de cultivo líquido del cultivo celular. En algunos casos, el segundo medio de cultivo líquido es el mismo que el primer medio de cultivo líquido. En otros casos, el segundo medio de cultivo líquido es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido y/o se añade como un polvo seco.

El término "ángulo de reactor" se refiere al ángulo de desviación desde la posición horizontal que se coloca el tubo de agitación que contiene una célula de mamífero durante los procedimientos de cultivo descritos en este documento. Por ejemplo, cuando el tubo de agitación que contiene una célula de mamífero es un tubo cónico de 50 ml y se está de pie vertical relativo a la mesa de laboratorio o suelo, el ángulo del reactor es de 90°, y cuando el tubo de agitación que contiene una célula de mamífero es un tubo cónico de 50 ml y se coloca en relación horizontal a la mesa de laboratorio o suelo, el ángulo de reactor es de 0°. En otro ejemplo, cuando un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero es un tubo cónico de 50 ml y se coloca equidistante entre las posiciones vertical y horizontal (con respecto a la mesa de laboratorio o suelo), el ángulo de reactor es de 45°.

"Tasa de productividad específica" o "SPR" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la actividad de masas o enzimática de una proteína recombinante producida por células de mamífero por día. La SPR para un anticuerpo recombinante se mide generalmente como masa/célula/día. La SPR para una enzima recombinante se mide generalmente como unidades/célula/día o (unidades/masa)/célula/día.

"Tasa de productividad en volumen" o "VPR" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la actividad de masas o enzimática de la proteína recombinante producida por volumen de cultivo (por ejemplo, por litro de biorreactor, recipiente, o volumen de tubo) por día. La VPR para un anticuerpo recombinante se mide generalmente como masa/l/día. La VPR para una enzima recombinante se mide generalmente como unidades/l/día o masa/l/día.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Los procedimientos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; también se pueden utilizar otros procedimientos y materiales conocidos en la técnica adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

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

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 es un gráfico de la concentración de células viables con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 120 RPM (n = 3) o 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

10 La Figura 2 es un gráfico de la concentración de células viables con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

15 La Figura 3 es un gráfico de la productividad volumétrica acumulada (unidades/l) con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

20 La Figura 4 es un gráfico de la velocidad de consumo de glucosa (gramos de glucosa/l/día) con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

25 La Figura 5 es un gráfico de la velocidad de producción de lactato (gramos de lactato/l/día) con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

30 La Figura 6 es un gráfico de la velocidad de consumo de glutamina (mM/día) con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

35 La Figura 7 es un gráfico del valor de pH con el tiempo con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

40 La Figura 8 es un gráfico de la presión parcial de O₂ (pO₂) (mmHg) con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

45 La Figura 9 es un gráfico de la presión parcial de CO₂ (pCO₂) (mmHg) con el tiempo en las series del procedimiento de cultivo celular con el tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 rpm (n = 3), y en las series del procedimiento de cultivo celular con el matraz de agitación (n = 3). Se muestra el promedio de los datos \pm desviación estándar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 En el presente documento se proporcionan procedimientos de cultivo de una célula de mamífero en un tubo de agitación utilizando una pluralidad de microportadores y perfusión de realimentación por lotes. Los procedimientos de cultivo descritos en este documento pueden lograr altos niveles de concentración de células de mamíferos, mejorando así la eficiencia global de un procedimiento de cultivo y proporcionando altos rendimientos de productos celulares deseables, tales como proteínas recombinantes. Por ejemplo, los procedimientos pueden proporcionar una concentración de células de mamífero viables (por ejemplo, en el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, o el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos en una o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo) mayor de 2 x 10⁶ células por ml, mayor de 3 x 10⁶ células/ml, mayor de 4 x 10⁶ células/ml, mayor de 5 x 10⁶ células/ml, mayor de 6 x 10⁶ células/ml, mayor de 7 x 10⁶ células/ml, mayor de 8 x 10⁶ células/ml, mayor de 9 x 10⁶ células/ml, mayor de 10 x 10⁶ células/ml, mayor de 12 x 10⁶ células/ml, mayor de 14 x 10⁶ células/ml, mayor de 16 x 10⁶ células/ml, mayor de 18 x 10⁶ células/ml, mayor de 20 x 10⁶ células/ml, mayor de 25 x 10⁶ células/ml, mayor de 30 x 10⁶ células/ml, mayor de 35 x 10⁶ células/ml, mayor de 40 x 10⁶ células/ml, mayor de 45 x 10⁶ células/ml, o mayor de 50 x 10⁶ células/mL. Por ejemplo, el procedimiento de cultivo puede dar lugar a una concentración de células de mamífero viables de entre 1 x 10⁶ células/ml y 3 x 10⁶ células/ml, entre 3 x 10⁶ células/ml y 5 x 10⁶

5 células/ml, entre 5 x 10⁶ células/ml y 7 x 10⁶ células/ml, entre 7 x 10⁶ células/ml y 9 x 10⁶ células/ml, entre 9 x 10⁶ células/ml y 11 x 10⁶ células/ml, entre 10 x 10⁶ células/ml y 12 x 10⁶ células/ml, entre 11 x 10⁶ células/ml y 13 x 10⁶ células/ml, entre 12 x 10⁶ células/ml y 14 x 10⁶ células/ml, entre 14 x 10⁶ células/ml y 16 x 10⁶ células/ml, entre 16 x 10⁶ células/ml y 18 x 10⁶ células/ml, entre 18 x 10⁶ células/ml y 20 x 10⁶ células/ml, entre 20 x 10⁶ células/ml y 25 x 10⁶ células/ml, entre 25 x 10⁶ células/ml y 30 x 10⁶ células/ml, entre 30 x 10⁶ células/ml y 35 x 10⁶ células/ml, entre 35 x 10⁶ células/ml y 40 x 10⁶ células/ml, entre 40 x 10⁶ células/ml y 45 x 10⁶ células/ml, entre 45 x 10⁶ células/ml y 50 x 10⁶ células/ml, o mayor de 50 x 10⁶ células/ml. En algunos casos, los procedimientos descritos en el presente documento dan como resultado un aumento en la actividad biológica de una proteína recombinante (por ejemplo, en comparación con la actividad biológica de una proteína recombinante producida por un procedimiento diferente).

15 Se puede utilizar una variedad de diferentes procedimientos para determinar la densidad celular o la densidad de células viables, y son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una muestra del cultivo celular que contiene microportadores puede ser tratada para liberar las células de la superficie de los microportadores, y las células liberadas opcionalmente pueden diluirse en tampón fisiológico, y la suspensión de células (por ejemplo, suspensión diluida de células) se coloca en un hemocitómetro y se cuentan usando microscopía óptica. En otro procedimiento, la densidad de células viables se puede determinar usando un procedimiento similar, pero incluyendo en el tampón fisiológico un colorante que es captado selectivamente por las células no viables (por ejemplo, azul de tripano, tal como el procedimiento Vi-CELL de Beckman Coulter (véase el sitio web de Beckman Coulter)). En aún otro ejemplo, la densidad celular o la densidad de células viables pueden determinarse usando citometría de flujo asistida con fluorescencia (por ejemplo, GUAVA de Merck Millipore (ver sitio web Millipore), y otros procedimientos de recuento de células.

25 En algunos casos, el procedimiento de cultivo da como resultado una tasa de productividad específica mejorada significativamente. Por ejemplo, la tasa de productividad específica alcanzada por los procedimientos proporcionados en este documento puede ser al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 110 veces, 120 veces, 130 veces, 140 veces, 150 veces, 160 veces, 170 veces, 180 veces, 190 veces, o 200 veces mayor que la tasa de productividad específica conseguida utilizando un procedimiento de cultivo conocido en la técnica (por ejemplo, un procedimiento de cultivo con tubo de agitación diferente). La tasa de productividad en volumen alcanzada por los presentes procedimientos puede ser de al menos 200 unidades/l/día, al menos 300 unidades/l/día, al menos 400 unidades/l/día, al menos 500 unidades/l/día, al menos 600 unidades/l/día, al menos aproximadamente 800 unidades/l/día, al menos aproximadamente 1.000 unidades/l/día, al menos aproximadamente 1.200 unidades/l/día, al menos aproximadamente 1.400 unidades/l/día, al menos aproximadamente 1.600 unidades/l/día, al menos aproximadamente 1.800 unidades/l/día, al menos aproximadamente 2.000 unidades/l/día, al menos aproximadamente 2.200 unidades/l/día, al menos aproximadamente 2.400 unidades/l/día, al menos aproximadamente 2.600 unidades/l/día, al menos aproximadamente 2.800 unidades/l/día, al menos aproximadamente 3.000 unidades/l/día, al menos 4.000 unidades/l/día, al menos 5.000 unidades/l/día, al menos 6.000 unidades/l/día, al menos 7.000 unidades/l/día, al menos 8.000 unidades/l/día, al menos 9.000 unidades/l/día, al menos 10.000 unidades/l/día, superior a 1.000 unidades/l/día, o superior a 10.000 unidades/l/día (por ejemplo, en el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, o el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo). En algunas realizaciones, la productividad alcanzada por los presentes procedimientos puede ser de al menos 0,1 g/l, al menos 0,2 g/l, al menos 0,5 g/l, al menos 0,75 g/l, al menos 1,0 g/l, al menos 1,25 g/l, al menos 1,5 g/l, al menos 1,75 g/l, al menos 2,0 g/l, al menos 2,5 g/l, al menos 3,0 g/l, al menos 3,5 g/l, al menos 4,0 g/l, al menos 4,5 g/l, o por los menos 5,0 g/l (por ejemplo, en el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, o el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer, segundo y tercer períodos de tiempo).

50 La actividad biológica de una proteína recombinante se puede evaluar usando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, y dependerá de la actividad de la proteína recombinante específica. Por ejemplo, la actividad biológica de una proteína recombinante que es una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) se puede determinar mediante la medición de la afinidad del anticuerpo para unirse a su epítipo específico (por ejemplo, usando Biocore o ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima competitivos). La proteína recombinante puede ser una enzima (por ejemplo, una galactosidasa recombinante, por ejemplo, una alfa-galactosidasa A humana recombinante) y la actividad biológica puede determinarse mediante la medición de la actividad de la enzima (por ejemplo, la determinación de la constante de velocidad catalítica de la enzima mediante la medición de una disminución en la concentración de un sustrato detectable o un aumento en la concentración de un producto detectable (por ejemplo, mediante espectrofotometría o emisión de luz). por ejemplo, la actividad biológica de una galactosidasa recombinante puede detectarse midiendo una disminución en el nivel de globotriasilceramida (GL-3) o galabiosilceramida, o un aumento en el nivel de ceramida dihexosido o galactosa.

60 Procedimientos de cultivo de una célula de mamífero

65 En un procedimiento que es un ejemplo de los descritos en el presente documento, se proporciona un tubo de agitación. Un primer medio de cultivo líquido se añade al tubo de agitación de tal manera que el medio ocupa, por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% (por ejemplo, de aproximadamente 10% a

aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 12%, de aproximadamente 12% a aproximadamente 14%, de aproximadamente 14% a aproximadamente 16%, de aproximadamente 16% a aproximadamente 18%, de aproximadamente 18% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 22%, de aproximadamente 22% a aproximadamente 24%, de aproximadamente 24% a aproximadamente 26%, de aproximadamente 26% a aproximadamente 28%, de aproximadamente 28% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 15% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, o de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%) del volumen del tubo de agitación. Al menos una célula de mamífero adherente y una pluralidad de microportadores (una concentración final en el tubo de agitación de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l, por ejemplo, una concentración final en el tubo de agitación de entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 2,0 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 1,75 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 1,5 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 1,25 g/l, de aproximadamente 2,5 g/l a 5,0 g/l, de aproximadamente 5,0 g/l a aproximadamente 7,5 g/l, de aproximadamente 7,5 g/l a aproximadamente 10,0 g/l, de aproximadamente 10,0 g/l a aproximadamente 12,5 g/l, de aproximadamente 12,5 g/l a aproximadamente 15,0 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 5,0 g/l, de aproximadamente 5,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l, de aproximadamente 10,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l, de aproximadamente 2,5 g/l a aproximadamente 3,5 g/l, de aproximadamente 3,0 g/l a aproximadamente 4,0 g/l, de aproximadamente 4,0 g/l a aproximadamente 5,0 g/l, de aproximadamente 5,0 g/l a aproximadamente 6,0 g/l, de aproximadamente 6,0 g/l a aproximadamente 7,0 g/l, de aproximadamente 7,0 g/l a aproximadamente 8,0 g/l, de aproximadamente 8,0 g/l a aproximadamente 9,0 g/l, de aproximadamente 9,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l, de aproximadamente 10,0 g/l a aproximadamente 11,0 g/l, de aproximadamente 11,0 g/l a aproximadamente 12,0 g/l, de aproximadamente 12,0 g/l a aproximadamente 13,0 g/l, de aproximadamente 13,0 g/l a aproximadamente 14,0 g/l, o de aproximadamente 14,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l) se añaden al primer medio de cultivo líquido, es decir, antes de añadir el medio al tubo de agitación o después. Como un experto en la técnica puede entender, las etapas de la adición del medio líquido de cultivo, una célula de mamífero y el medio de cultivo líquido al tubo de agitación pueden tener lugar en cualquier orden. El tubo de agitación se incuba durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C (por ejemplo, de 32°C a 34°C, de 32°C a 37°C, de 34°C a 37°C, de 37°C a 39°C) y se agita, por ejemplo, en un dispositivo de agitación rotatorio, a de 130 RPM a 150 RPM (por ejemplo, 130 RPM, 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM). Las células de mamífero adherentes pueden incubarse, por ejemplo, en una incubadora, tal como una incubadora de agitación con un diámetro de aspa (órbita) de 25 mm o de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 50 mm, mientras se cambian las RPM en consecuencia. Después de las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo de incubación, de forma continua o periódicamente durante el período de tiempo, se extrae un primer volumen del primer medio de cultivo líquido (por ejemplo, que contiene cualquier concentración de células de mamífero adherentes, por ejemplo, un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido que es o se produce sustancialmente libre de células y/o microportadores) y se añade un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido al primer medio de cultivo líquido. Habitualmente, el primer y el segundo volúmenes son aproximadamente iguales, pero pueden variar en una pequeña cantidad, por ejemplo, en hasta aproximadamente el 10% cuando se comparan el primer y segundo volúmenes. En algunas realizaciones, el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido es menor (por ejemplo, como máximo, aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% menor) o mayor (por ejemplo, como máximo, aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% mayor) que el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído. Tal como se conoce en la técnica, el término incubación puede incluir períodos cortos de tiempo (por ejemplo, entre 10 segundos y aproximadamente 10 minutos, entre 10 segundos y aproximadamente 20 minutos, entre 10 segundos y aproximadamente 30 minutos, entre 10 segundos y aproximadamente 40 minutos, entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 50 minutos, o entre 10 segundos y aproximadamente 1 hora) en los que se extrae un tubo de agitación que contiene la célula de mamífero y medio de cultivo líquido de una incubadora con el fin de extraer el primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido. En algunas realizaciones, se puede utilizar un muestreador automático para extraer el primer volumen del primer medio de cultivo y añadir el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido al tubo de agitación mientras el tubo de agitación permanece en la incubadora.

En otro procedimiento de ejemplo, se proporciona primero un tubo de agitación. Un primer medio de cultivo líquido se añade al tubo de agitación de tal manera que el medio ocupa, por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% (por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 12%, de aproximadamente 12% a aproximadamente 14%, de aproximadamente 14% a aproximadamente 16%, de aproximadamente 16% a aproximadamente 18%, de aproximadamente 18% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 22%, de aproximadamente 22% a aproximadamente 24%, de aproximadamente 24% a aproximadamente 26%, de aproximadamente 26% a aproximadamente 28%, de aproximadamente 28% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, de aproximadamente 15% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 25%, o de aproximadamente 25% a aproximadamente 30%) del volumen del tubo de agitación. Al menos una célula de mamífero adherente y una pluralidad de microportadores (una concentración final en el tubo de agitación de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l, por ejemplo, una concentración final en el tubo de agitación de entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 2,0 g/l, de aproximadamente 1,0

g/l a aproximadamente 1,75 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 1,5 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 1,25 g/l, de aproximadamente 2,5 g/l a 5,0 g/l, de aproximadamente 5,0 g/l a aproximadamente 7,5 g/l, de aproximadamente 7,5 g/l a aproximadamente 10,0 g/l, de aproximadamente 10,0 g/l a aproximadamente 12,5 g/l, de aproximadamente 12,5 g/l a aproximadamente 15,0 g/l, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 5,0 g/l, de aproximadamente 5,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l, de aproximadamente 10,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l, de aproximadamente 2,5 g/l a aproximadamente 3,5 g/l, de aproximadamente 3,0 g/l a aproximadamente 4,0 g/l, de aproximadamente 4,0 g/l a aproximadamente 5,0 g/l, de aproximadamente 5,0 g/l a aproximadamente 6,0 g/l, de aproximadamente 6,0 g/l a aproximadamente 7,0 g/l, de aproximadamente 7,0 g/l a aproximadamente 8,0 g/l, de aproximadamente 8,0 g/l a aproximadamente 9,0 g/l, de aproximadamente 9,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l, de aproximadamente 10,0 g/l a aproximadamente 11,0 g/l, de aproximadamente 11,0 g/l a aproximadamente 12,0 g/l, de aproximadamente 12,0 g/l a aproximadamente 13,0 g/l, de aproximadamente 13,0 g/l a aproximadamente 14,0 g/l, o de aproximadamente 14,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l) se añaden al primer medio de cultivo líquido, es decir, antes de añadir el medio al tubo de agitación o después. Tal como se señaló anteriormente, la adición del medio de cultivo líquido, una célula de mamífero y el medio de cultivo líquido al tubo de agitación puede tener lugar en cualquier orden. A continuación, en un primer periodo de tiempo, se incuba el tubo de agitación a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C (por ejemplo, de 35°C a 37°C, de 36°C a 39°C, o de 37°C a 39°C) con una agitación de rotación de 130 rpm a 150 RPM (por ejemplo, de 130 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM). Las células de mamífero adherentes pueden incubarse, por ejemplo, en una incubadora, tal como una incubadora de agitación con un diámetro de aspa (órbita) de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 50 mm. Después de aproximadamente los primeros 48 a 96 horas del primer período de tiempo, en cada periodo de 24 horas posterior, (i) extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de microportadores del tubo de agitación, en el que el primer volumen es de aproximadamente 10% a aproximadamente 95% (por ejemplo, de aproximadamente 10% a 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, o de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%) del volumen del primer medio de cultivo líquido; y (ii) añadir al tubo de agitación un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primer y segundo volúmenes son aproximadamente iguales. Tal como se señaló anteriormente, el primer y el segundo volúmenes son aproximadamente iguales, pero pueden variar en una pequeña cantidad, por ejemplo, en hasta aproximadamente el 10% cuando se comparan el primer y segundo volúmenes. Una vez que la concentración de células de mamífero adherentes alcanza aproximadamente la densidad celular objetivo (por ejemplo, aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,2 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,4 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,6 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,8 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $3,2 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $3,4 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $3,6 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $3,8 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml a $4,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml a $4,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml a $4,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml a $6,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $6,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $8,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $8,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $10,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $10,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $15,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $15,0 \times 10^6$ a aproximadamente $20,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $20,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $25,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $25,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $30,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $30,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $35,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $35,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $40,0 \times 10^6$ células/ml, de aproximadamente $40,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $45,0 \times 10^6$ células/ml, o de aproximadamente $45,0 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente $50,0 \times 10^6$ células/ml) se incuba el tubo de agitación durante un segundo periodo de tiempo de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días (por ejemplo, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 5 días, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 6 días, y de aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días), a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C (por ejemplo, de aproximadamente 32°C a aproximadamente 35°C, de aproximadamente 32°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 32°C a aproximadamente 38°C, de aproximadamente 34°C a aproximadamente 39°C, de aproximadamente 34°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 38°C, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, de aproximadamente 36°C a aproximadamente 39°C, o de aproximadamente 37°C a aproximadamente 39°C) con la agitación rotatoria, y en cada periodo de 24 horas, realizar las etapas (i) y (ii) descritas anteriormente, donde el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo son de un tipo sustancialmente diferentes de los utilizados en el segundo periodo de tiempo. A continuación, en un tercer periodo de tiempo de más de 2 días (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 días, más de 100 días, 110 días, 120 días, 130 días, 140 días, 150 días, 160 días, 170 días, 180 días, 190 días, o 200 días, o, como máximo, 100 días, 125 días, 150 días, 175 días, 200 días, 225 días, 250 días, 275 días, o 300 días) incubar el tubo de agitación a una

temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C (por ejemplo, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 37°C, de 36°C a aproximadamente 38°C, de aproximadamente 37°C a aproximadamente 39°C, o de aproximadamente 36°C a aproximadamente 39°C) con la agitación rotatoria, y en cada período de 24 horas, realizar las etapas (i) y (ii) indicadas anteriormente, donde el primera y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo periodo de tiempo son del mismo tipo que los utilizados en el tercer período de tiempo.

Varios ejemplos no limitativos de cada aspecto de estos procedimientos de cultivo se describen a continuación. Los aspectos de ejemplo de los procedimientos proporcionados en este documento pueden usarse en cualquier combinación sin limitación.

Células de mamífero

Los procedimientos proporcionados en este documento se pueden utilizar para el cultivo de una variedad de diferentes células de mamífero adherentes. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero adherentes que pueden cultivarse usando cualquiera de los procedimientos descritos en este documento incluyen: células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células CHO DG44, células CHO-K1S, SP2.0, células de mieloma (por ejemplo, NS/O), células B, células de hibridoma, células T, células de riñón embrionario humano (HEK) (por ejemplo, HEK 293E y HEK 293F), células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero) y células epiteliales de riñón canino Madin-Darby (Cocker Spaniel) (células MDCK). Células de mamífero adherentes adicionales que se pueden cultivar utilizando los procedimientos descritos en el presente documento son conocidas en la técnica.

La célula de mamífero adherente puede contener un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma de la célula de mamífero) que codifica una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína recombinante que es secretada por la célula de mamífero adherente). Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos recombinantes que codifican proteínas recombinantes de ejemplo se describen más adelante, ya que son proteínas recombinantes que son producidas utilizando los procedimientos descritos en el presente documento. En algunos casos, la célula de mamífero adherente dispuesta en el tubo de agitación para el cultivo deriva de un cultivo más grande. Por ejemplo, la célula de mamífero adherente en el tubo de agitación se puede derivar de un cultivo en biorreactor a gran escala, es decir, se puede preparar un cultivo satélite utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en este documento.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo líquidos son conocidos en la técnica. El primer y/o segundo medios de cultivo tisular (por ejemplo, el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo o el segundo y tercer periodos de tiempo) pueden ser complementados con un suero de mamífero (por ejemplo, suero de ternera fetal y suero bovino), y/o una hormona del crecimiento o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico). Alternativamente, o además, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos en el primer periodo de tiempo o el segundo y tercer periodos de tiempo) pueden ser un medio de cultivo líquido definido químicamente, un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animal, un medio de cultivo líquido libre de suero o un medio de cultivo líquido que contiene suero. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo líquidos químicamente definidos, medios de cultivo líquidos libres de componentes derivados de animales, medios de cultivo líquidos libre de suero y medios de cultivo líquidos que contienen suero están disponibles comercialmente.

Un medio de cultivo líquido contiene típicamente una fuente de energía (por ejemplo, un hidrato de carbono, tal como glucosa), aminoácidos esenciales (por ejemplo, el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína), vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones, ácidos grasos libres, elementos y/o trazas. El primer y/o segundo medios de cultivo líquidos (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo o el segundo y tercer periodo de tiempo) pueden, si se desea, complementarse con, por ejemplo, una hormona o factor de crecimiento de mamífero (por ejemplo, insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales y tampones (por ejemplo, sales de calcio, magnesio y fosfato), nucleósidos y bases (por ejemplo, adenosina, timidina e hipoxantina), hidrolizados de proteína y del tejido, y/o cualquier combinación de estos u otros aditivos.

Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos que son particularmente útiles en los procedimientos actualmente descritos incluyen, por ejemplo, CD CHO, Opti CHO y Forti CHO (todos disponibles de Life Technologies; Grand Island, NY), medio Hycell CHO (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), medio Excell CD CHO Fusion (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO), y medio PowerCHO (Lonza Group, Ltd.; Basilea, Suiza). Los componentes del medio que también pueden ser útiles en los presentes procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hidrolizados químicamente definidos (CD), por ejemplo, CD de peptona, CD de polipéptidos (dos o más aminoácidos) y CD de factores de crecimiento. Los ejemplos adicionales de los componentes del medio de cultivo de tejido líquido y componentes del medio son conocidos en la técnica.

Los expertos en la técnica entenderán que el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido descritos en este documento pueden ser del mismo tipo de medio o diferentes tipos de medio. Por ejemplo, en ejemplos de los procedimientos que incluyen un primer periodo de tiempo, un segundo período de tiempo y un tercer período de tiempo, el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo son sustancialmente diferentes del primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo y tercer períodos de tiempo, y el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo y tercer períodos de tiempo son sustancialmente iguales. Por ejemplo, el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo se pueden seleccionar del grupo que consiste en un medio de cultivo líquido que contiene suero o un medio de cultivo líquido que contiene una proteína de mamífero o una fracción o extracto de proteína de mamífero, y el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo y tercer períodos de tiempo se pueden seleccionar del grupo de: un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animal, un medio de cultivo líquido libre de suero, un medio de cultivo líquido definido químicamente, y un medio de cultivo líquido libre de proteínas.

15 **Microportadores**

En los procedimientos descritos en el presente documento, se añade una pluralidad de microportadores al medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos). Por ejemplo, la pluralidad de los microportadores puede tener un diámetro promedio de entre aproximadamente 20 μm y aproximadamente 1 mm (por ejemplo, entre aproximadamente 20 μm y aproximadamente 250 μm , entre aproximadamente 100 μm y aproximadamente 250 μm , entre aproximadamente 150 μm y aproximadamente 250 μm , entre aproximadamente 250 μm y 500 μm , entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 300 μm , entre aproximadamente 750 μm y 1 mm, entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 800 μm , entre aproximadamente 200 μm y aproximadamente 500 μm , o entre aproximadamente 500 μm y aproximadamente 800 μm), donde los microportadores tienen una superficie que es permisiva o promueve la unión de una célula de mamífero (por ejemplo, cualquiera de las células de los mamíferos descritas en este documento o conocidas en la técnica). En algunos ejemplos, un microportador puede contener uno o más poros (por ejemplo, uno o más poros con un diámetro promedio de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 100 μm (por ejemplo, entre aproximadamente 10 μm y 20 μm , de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 30 μm , de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 40 μm , de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 60 μm , de aproximadamente 60 μm a aproximadamente 70 μm , de aproximadamente 70 μm a aproximadamente 80 μm , de aproximadamente 80 μm a aproximadamente 90 μm , de aproximadamente 90 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 45 μm , de aproximadamente 45 μm a aproximadamente 80 μm , de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 35 μm , o de aproximadamente 30 μm)). En algunas realizaciones, la superficie de la pluralidad de microportadores y/o la superficie de dichos uno o más poros en la pluralidad de microportadores están recubiertas con un agente que promueve la unión de una célula de mamífero adherente al microportador (por ejemplo, unión a la superficie exterior de los microportadores y/o la superficie de los poros en el microportador). Ejemplos de tales agentes que pueden ser utilizados para promover la unión de una célula de mamífero adherente incluyen, pero no se limitan a, gelatina, colágeno, poliestireno, poli-L-ornitina y laminina.

En algunos ejemplos, los microportadores tienen un área superficial de unión celular efectiva promedio de entre aproximadamente 0,5 m^2/g en seco y 2,0 m^2/g en seco (por ejemplo, entre aproximadamente 0,75 m^2/g en seco y 1,25 m^2/g en seco, entre aproximadamente 1,0 m^2/g en seco y aproximadamente 1,5 m^2/g en seco, entre aproximadamente 1,25 m^2/g en seco y aproximadamente 1,5 m^2/g en seco, entre aproximadamente 1,5 m^2/g en seco y aproximadamente 2,0 m^2/g en seco y aproximadamente 1,1 m^2/g en seco). En algunos ejemplos, los microportadores tienen un volumen promedio de aproximadamente 10 ml/g en seco a aproximadamente 70 ml/g en seco (por ejemplo, de aproximadamente 10 ml/g en seco a aproximadamente 20 ml/g en seco, de aproximadamente 20 ml/g en seco a aproximadamente 30 ml/g en seco, de aproximadamente 30 ml/g en seco a aproximadamente 40 ml/g en seco, de aproximadamente 40 ml/g en seco a aproximadamente 50 ml/g en seco, de aproximadamente 50 ml/g en seco a aproximadamente 60 ml/g en seco, de aproximadamente 60 ml/g en seco a aproximadamente 70 ml/g en seco, de aproximadamente 10 ml/g en seco a aproximadamente 40 ml/g en seco, de aproximadamente 30 ml/g en seco a aproximadamente 40 ml/g en seco, de aproximadamente 40 ml/g en seco a aproximadamente 70 ml/g en seco, o aproximadamente 40 ml/g en seco). En algunas realizaciones, la densidad relativa promedio de los microportadores es de entre 0,8 g/ml y aproximadamente 1,2 g/ml (por ejemplo, de aproximadamente 0,8 g/ml a aproximadamente 0,9 g/ml , de aproximadamente 0,9 g/ml a aproximadamente 1,0 g/ml , de aproximadamente 1,0 g/ml a aproximadamente 1,1 g/ml , aproximadamente 1,0 g/ml , de aproximadamente 1,1 g/ml a aproximadamente 1,2 g/ml , de aproximadamente 0,95 g/ml a aproximadamente 1,05 g/ml , o aproximadamente 1,03 g/ml).

En algunas realizaciones, los microportadores son aproximadamente esféricos o de forma elipsoidal. En otros ejemplos, los microportadores tienen una superficie erosionada o rugosa con pequeñas protuberancias que aumentan el área superficial exterior total de la microportador. En algunas realizaciones, los microportadores tienen una estructura de red. En algunos ejemplos, los microportadores son higroscópicos. En algunos ejemplos, los microportadores contienen celulosa.

En algunas realizaciones, los microportadores tienen una superficie exterior y/o los poros del microportador tienen una superficie que está cargada positivamente (por ejemplo, con carga positiva debido a la presencia de los grupos N, N-dietilaminoetilo). En algunos ejemplos, los microportadores tienen una red o estructura de red o estructura de telaraña. Los microportadores pueden tener una densidad de carga promedio de aproximadamente 0,5 meq/g a aproximadamente 2,5 meq/g (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 meq/g a aproximadamente 1,5 meq/g, de aproximadamente 0,75 meq/g a aproximadamente 1,25 meq/g, aproximadamente 1,1 meq/g, de aproximadamente 1,5 meq/g a aproximadamente 2,5 meq/g, de aproximadamente 1,5 meq/g a aproximadamente 2,0 meq/g, aproximadamente 1,8 meq/g, de aproximadamente 0,5 meq/g a aproximadamente 1,0 meq/g, o de aproximadamente 1,0 meq/g a aproximadamente 1,5 meq/g).

En algunos casos, el microportador puede contener un polímero natural y/o un polímero sintético. Los ejemplos no limitantes de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno, polietilenimina, dietilenglicol, trietilenglicol, polialquilenglicol, óxido de polialcalinos, alcohol de polivinilo, polifosfato de sodio, polivinilpirrolidona, polivinilmetil éter, polimetiloxazolona, polietiloxazolona, polihidroxipropiloxazolona, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroxietilacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, poliglicerina, poliaspartamida, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (poloxámero), ácidos carboxílicos (por ejemplo, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido itacónico y ácido maleico), polioxietilenos, óxido de polietileno, ácidos monocarboxílicos etilénicos insaturados, ácido poliláctico (PLA), óxido de polipropileno, poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(epsilon-caprolactona), poli(etileno), polibutadieno, poliglicolida, polimetilacrilato, polivinilbutil éter, poliestireno, policiclopentadienilmetilnorborneno, polietileno, polietileno, poliisobutileno, polisiloxano, acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de propilo, acrilato de n-butilo, acrilato de isobutilo, acrilato de 2-etilo, acrilato de t-butilo, metacrilatos (por ejemplo, metacrilato de etilo, metacrilato de n-butilo y metacrilato de isobutilo), acrilonitrilos, metacrilonitrilo, vinilos (por ejemplo, acetato de vinilo, versatato de vinilo, propionato de vinilo, vinilformamida, vinilacetamida, vinilpiridinas y vinilimidazol), aminoalquilos (por ejemplo, aminoalquilacrilatos, aminoalquilmetacrilatos y aminoalquil(met)acrilamidas), estirenos, polialquilenglicol, óxido de polialcalinos y ácido láctico. Los ejemplos no limitantes de polímeros naturales incluyen celulosa, lecitina y ácido hialurónico. Un microportador puede contener una mezcla de diferentes polímeros (por ejemplo, cualquier combinación de uno o más polímeros descritos en este documento o conocidos en la técnica) en las mismas o diferentes proporciones. Cualquiera de los microportadores descritos en este documento puede contener un núcleo que contiene uno o más polímeros (por ejemplo, cualquiera de los polímeros descritos en este documento o conocidos en la técnica) y una capa externa que contiene uno o más polímeros diferentes (por ejemplo, cualquiera de los polímeros descritos en este documento o conocidos en la técnica). Una pluralidad de microportadores puede incluir una combinación de dos o más tipos diferentes de microportadores (por ejemplo, dos o más microportadores que tienen una forma, tamaño, carga o composición diferentes).

Los microportadores no limitantes de ejemplo que se pueden utilizar en cualquiera de los procedimientos descritos en este documento incluyen CytoPore™ 1 y CytoPore™ 2 (disponibles de GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, New Jersey). Ejemplos adicionales de microportadores que se pueden utilizar en cualquiera de los procedimientos descritos en este documento están disponibles públicamente y son conocidos en la técnica.

Tubos de agitación

El tubo de agitación puede ser estéril y tener un volumen entre aproximadamente 2 ml a aproximadamente 500 ml (por ejemplo, un tubo de agitación de 2 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml o 500 ml. El tubo de agitación puede tener un volumen de, por ejemplo, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 15 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 25 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 25 ml, de aproximadamente 25 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 15 ml, de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 20 ml, de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 15 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 300 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 450 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 350 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 450 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 350 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 450 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 150 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 300 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 350 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 450 ml, de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 150 ml, de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 200 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 250 ml a aproximadamente 350 ml, de aproximadamente 300 ml a aproximadamente 400 ml, o de aproximadamente 350 ml a aproximadamente 450 ml. Los ejemplos no limitantes de tubos de agitación son tubos de agitación Tubespín® (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza).

El tubo de agitación puede incluir al menos una superficie permeable a los gases (por ejemplo, al menos una superficie que tiene una membrana permeable a los gases que también puede actuar como una barrera estéril) y/o al menos un tapón con ventilación. Un tubo de agitación puede tener en su superficie exterior una estructura que permite que el tubo de agitación se coloque de forma estable en una incubadora de cultivo de tejidos (por ejemplo, una incubadora rotatoria).

La superficie interior del tubo de agitación puede tener al menos un recubrimiento (por ejemplo, al menos un revestimiento de gelatina, colágeno, poli-L-ornitina, poliestireno y laminina). El tubo de agitación puede ser, por ejemplo, un tubo de agitación TubeSpin® disponible de Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza, los tubos de agitación disponibles de Sartorius, AG, Alemania y tubos Falcon estériles de Becton Dickinson (BD). Ejemplos adicionales de tubos de agitación (por ejemplo, diferentes formas y dimensiones de los tubos de agitación) y los recubrimientos de las superficies interiores de los tubos de agitación se conocen en la técnica y se pueden utilizar en los presentes procedimientos.

Agitación

Los procedimientos aquí descritos implican la agitación del cultivo que contiene la célula de mamífero adherente, una pluralidad de microportadores y el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos. La agitación puede tener lugar a una frecuencia de 130 RPM a 150 RPM, (por ejemplo, de aproximadamente 135 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 145 RPM a 150 RPM) (por ejemplo, en una incubadora, tal como una incubadora de agitación con un diámetro de aspa (órbita) de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 50 mm).

Como puede entenderse en la técnica, el nivel de agitación (por ejemplo, la velocidad RPM) se puede variar dependiendo del tamaño y la forma del tubo de agitación (por ejemplo, el diámetro del tubo de agitación), el diámetro del aspa (órbita) de la incubadora que se utiliza para realizar la agitación y el tamaño promedio, forma, densidad, y la concentración de la pluralidad de microportadores. Por ejemplo, un diámetro de aspa (órbita) más pequeño puede requerir un mayor nivel de agitación (por ejemplo, una velocidad más alta en RPM), mientras que un aspa (órbita) de diámetro más grande puede requerir un nivel más bajo de agitación (por ejemplo, una velocidad más baja en RPM) para lograr las condiciones necesarias para alcanzar la densidad celular viable óptima y la producción de proteína recombinante. Por ejemplo, para un diámetro de aspa (órbita) de, por ejemplo, 9 mm, la frecuencia de agitación puede ser mayor que 180 RPM (por ejemplo, entre aproximadamente 180 RPM y aproximadamente 240 RPM). En otro ejemplo, un tubo de agitación que tiene un diámetro más grande puede requerir una velocidad en RPM inferior, mientras que un tubo de agitación que tiene un diámetro más pequeño puede requerir una velocidad más alta en RPM para lograr las condiciones necesarias para lograr la densidad de células viables óptima y la producción de proteína recombinante. La frecuencia de agitación se puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo celular, por ejemplo, la concentración, densidad y/o el tamaño y/o forma de la superficie de los microportadores. Como un experto en la técnica puede entender, si los microportadores presentes en el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos (por ejemplo, el primer y/o segundo medios cultivo líquidos utilizados en el primer, segundo y tercer periodos de tiempo) tienen una masa alta, una densidad elevada, un área superficie exterior elevada, o una velocidad relativamente alta, las fuerzas de cizallamiento generadas por tales microportadores pueden tener un impacto negativo en la viabilidad celular y la producción de proteína recombinante en el cultivo. Además, los expertos en la técnica pueden entender que la velocidad de agitación debe ser lo suficientemente alta para evitar la sedimentación sustancial y/o indeseable de los microportadores en la parte inferior del tubo de agitación.

En algunas realizaciones, la incubación se realiza utilizando una incubadora rotatoria con un diámetro de aspa (órbita) de entre aproximadamente 25 mm y aproximadamente 50 mm y una agitación de entre 130 RPM y 150 RPM (por ejemplo, de aproximadamente 135 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM o de aproximadamente 145 RPM a 150 RPM). En algunas realizaciones, la incubación se realiza utilizando una incubadora rotatoria con un diámetro de aspa (órbita) de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 25 mm y una agitación de 130 RPM a 150 RPM (por ejemplo, de aproximadamente 135 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM o de aproximadamente 145 RPM a 150 RPM).

La agitación se puede realizar, por ejemplo, usando una agitación rotatoria circular a una frecuencia de 130 RPM a 150 RPM (por ejemplo, de aproximadamente 135 RPM a 150 RPM, de aproximadamente 140 RPM a 150 RPM o de aproximadamente 145 RPM a 150 RPM). Alternativamente, o además, el tubo de agitación puede agitarse utilizando un agitación rotatoria elipsoidal, o una inclinación horizontal y/o vertical del tubo de agitación. La agitación se puede realizar de forma continua o periódicamente.

La agitación puede realizarse utilizando una incubadora controlada con atmósfera humidificada (por ejemplo, a una humedad de aproximadamente o mayor que 20%, por ejemplo, aproximadamente o mayor que 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80 %, 85%, 90%, o 95% o una humedad del 100%) con un dispositivo mecánico que proporciona la agitación de uno o más de los tubos de agitación que contenían la célula de mamífero, la pluralidad de microportadores, y un medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, y el

primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo).

Ángulo del reactor

5 El tubo de agitación se puede incubar en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados (por ejemplo, de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 55 grados, de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados, de aproximadamente 35 grados a aproximadamente 90 grados, de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados, o de aproximadamente 35 a aproximadamente 65
10 grados) respecto a la horizontal. Por ejemplo, el tubo de agitación se puede colocar en un ángulo de reactor de aproximadamente 60 grados a aproximadamente 85 grados desde la horizontal, de aproximadamente 70 grados a aproximadamente 85 grados desde la horizontal, de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 60 grados, de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 55 grados, de aproximadamente 30 grados a aproximadamente 55
15 grados desde la horizontal, de aproximadamente 40 grados a aproximadamente 55 grados desde la horizontal, o de aproximadamente 40 grados a aproximadamente 50 grados desde la horizontal. El tubo de agitación se puede colocar en un ángulo de reactor de aproximadamente 45 grados desde la horizontal a aproximadamente 50 grados desde la horizontal, o de aproximadamente 40 grados desde la horizontal a aproximadamente 45 grados desde la horizontal. El tubo de agitación puede colocarse en un dispositivo que posiciona específicamente y de forma segura el tubo de agitación en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la
20 horizontal (por ejemplo, posiciona específicamente el recipiente en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados, de aproximadamente 35 grados a aproximadamente 90 grados, de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados, de aproximadamente 35 grados a aproximadamente 65 grados, o de aproximadamente 40 grados a aproximadamente 55 grados desde la horizontal). El posicionamiento del tubo de agitación puede realizarse usando cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de
25 un soporte o un elemento de bloqueo.

Temperatura

30 Los procedimientos de cultivo descritos en este documento pueden llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C. Por ejemplo, en algunos procedimientos, el tubo de agitación se puede incubar a una temperatura de aproximadamente 37°C desde el principio hasta el final de la realización del cultivo. Algunos ejemplos de los procedimientos descritos en este documento incluyen un primer periodo de tiempo durante el cual el tubo de agitación se incuba a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, un segundo período de tiempo durante el cual el tubo de agitación se incuba de aproximadamente 32°C a
35 aproximadamente 39°C y un tercer período de tiempo durante el cual el tubo de agitación se incuba de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C. Los técnicos entenderán que la temperatura se puede cambiar en un punto o puntos de tiempo específicos en el procedimiento de cultivo (por ejemplo, durante uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer periodo de tiempo), por ejemplo, en horas o días. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse o desplazarse (por ejemplo, por aumento o disminución) en
40 aproximadamente un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, once días, doce días, catorce días, quince días, dieciséis días, diecisiete días, dieciocho días, diecinueve días o aproximadamente veinte días o más después de la siembra inicial del tubo de agitación con la célula de mamífero adherente) o en cualquier punto de tiempo dentro del primer, segundo y/o tercer períodos de tiempo descritos en este documento. Por ejemplo, la temperatura puede desplazarse de forma ascendente (por ejemplo, un
45 cambio de hasta o aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10,0°C). Por ejemplo, la temperatura puede desplazarse de forma descendente (por ejemplo, un cambio de hasta o aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10°C).

Extracción y sustitución de los medios de cultivo

Los procedimientos aquí descritos incluyen extraer del tubo de agitación un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido (por ejemplo, que contiene cualquier concentración de células de mamíferos y cualquier proteína recombinante, por ejemplo, un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre
55 de células y/o microportadores), y añadir al tubo de agitación un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primer volumen y el segundo volumen son aproximadamente iguales. La extracción y la adición se pueden realizar simultánea o secuencialmente, o una combinación de los dos. Además, la extracción y la adición se pueden realizar de forma continua (por ejemplo, a una velocidad que extrae y sustituye a un volumen de entre 0,1% y 800% (por ejemplo, entre 1% y 700%, entre el 1% y el 600%, entre el 1% y el 500 %, entre 1% y 400%, entre el 1% y el 350%, entre el 1% y el 300%, entre el 1% y el 250%, entre el 1% y el 100%, entre el 100% y el 200%, entre el 5% y el 150%, entre 10% y 50%, entre 15% y 40%, entre el 8% y el 80%, y entre 4% y 30%) del volumen del tubo de agitación o del primer volumen del medio de cultivo líquido durante cualquier período de tiempo dado (por ejemplo, durante un período de 24 horas, durante un periodo de tiempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, o durante un periodo de tiempo incremental de más de 24 horas)) o periódicamente (por ejemplo, una vez cada tres días, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro
65 veces al día, cinco veces al día, o más de cinco veces al día), o cualquier combinación de los mismos. Cuando se

realiza periódicamente, el volumen que se extrae o sustituye (por ejemplo, dentro de aproximadamente un período de 24 horas, dentro de un periodo de tiempo incremental de aproximadamente 0,1 horas a aproximadamente 24 horas, o dentro de un periodo de tiempo incremental de más de 24 horas) puede ser, por ejemplo, entre 0,1% y 800% (por ejemplo, entre 1% y 700%, entre el 1% y el 600%, entre el 1% y el 500%, entre el 1% y el 400%, entre el 1% y el 300%, entre el 1% y 200%, entre el 1% y el 100%, entre el 100% y el 200%, entre el 5% y el 150%, entre 10% y 50%, entre 15% y 40%, entre el 8% y el 80%, y entre 4% y 30%) del volumen del tubo de agitación o del primer volumen de medio de cultivo líquido. El primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido se puede mantener en algunos casos aproximadamente igual a lo largo de cada período de 24 horas (o, alternativamente, un periodo de tiempo incremental de aproximadamente 0,1 horas a aproximadamente 24 horas o un periodo de tiempo incremental de más de 24 horas) durante la totalidad o parte del período de cultivo. Como se conoce en la técnica, la velocidad a la que el primer volumen del primer medio de cultivo líquido se extrae (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) pueden ser variadas. La velocidad a la que se extrae el primer volumen del primer medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) pueden ser aproximadamente iguales o pueden ser diferentes.

Alternativamente, el volumen extraído y añadido pueden cambiar (por ejemplo, aumentar gradualmente) durante cada período de 24 horas (o alternativamente, un periodo de tiempo incremental de entre 0,1 horas y aproximadamente 24 horas o un periodo de tiempo incremental de más de 24 horas) durante el periodo de cultivo. Por ejemplo el volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido dentro de cada periodo de 24 horas (o alternativamente, un periodo de tiempo incremental de entre aproximadamente 1 hora y por encima de 24 horas o un periodo de tiempo incremental de más de 24 horas) durante el periodo de cultivo se pueden aumentar (por ejemplo, gradualmente o a través de incrementos escalonados) durante el periodo de cultivo de un volumen que es de entre 0,5% y aproximadamente 20% del volumen de tubo de agitación o del volumen del primer medio de cultivo líquido a de aproximadamente 25% a aproximadamente 150% del volumen de tubo de agitación o del primer volumen de medio de cultivo líquido.

En algunos ejemplos de los procedimientos descritos en este documento, después de las primeras 48 a 96 horas del periodo de cultivo, en cada período de 24 horas, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído (por ejemplo, en el primer, segundo y/o tercer períodos de tiempo) y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido (por ejemplo, en el primer, segundo y/o tercer períodos de tiempo) son de aproximadamente 10% a aproximadamente 95% (por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 80%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 70%) del volumen del primer medio de cultivo líquido.

Los técnicos entenderán que el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser el mismo tipo de medio. En otros casos, el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser sustancialmente diferentes. En algunas realizaciones que incluyen un primer periodo de tiempo, segundo periodo de tiempo y tercer período de tiempo, el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo son de un tipo sustancialmente diferente de los medios en comparación con el primero y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo período de tiempo, y el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo periodo de tiempo son el mismo tipo de medio en comparación con el primero y segundo medios de cultivo líquido utilizados en el tercer período de tiempo. Como puede entenderse en la técnica, el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el primer periodo de tiempo no tienen que ser exactamente el mismo (siempre y cuando que sean del mismo tipo de medio de cultivo); cualquiera del primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en el segundo período de tiempo y/o el tercer periodo de tiempo no tienen que ser exactamente el mismo (de nuevo, siempre que sean del mismo tipo de medio y un tipo de medio sustancialmente diferente del primer y segundo medios de cultivo líquido utilizados en el primer periodo de tiempo).

El primer volumen del primer medio de cultivo líquido se puede extraer, por ejemplo, por centrifugación (por ejemplo, centrifugación en cubeta oscilante a baja velocidad) del tubo de agitación o utilizando cualquier otro sistema automatizado, y la extracción de la primera volumen del cultivo primer líquido (por ejemplo, un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células y/o microportadores) a partir del sobrenadante. Alternativamente o además, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede ser eliminado por filtro o flujo por gravedad del primer volumen del primer medio de cultivo líquido a través de una membrana estéril con un peso molecular de corte que excluye la célula de mamífero y/o microportadores. Alternativamente o además, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido se puede quitar parando o disminuyendo significativamente la velocidad de agitación durante un período de al menos 10 segundos (por ejemplo, al menos 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 1 minutos, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, o 1 hora) y la extracción o aspirar el primer volumen de la primera de cultivo líquido medio de la parte superior del tubo de

agitación (por ejemplo, la extracción de una parte del medio de cultivo líquido, donde los microsoportes no se han establecido debido a la fuerza gravitacional). El tubo de agitación puede ser colocado en una incubadora durante el periodo en el que se cesó la agitación. Un experto en la técnica entenderá que el tubo de agitación puede ser retirado de la incubadora durante un corto periodo de tiempo (por ejemplo, menos de 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 8 minutos, 6 minutos, 4 minutos, 2 minutos, o 1 minuto) mientras que el primer medio de cultivo líquido es retirado del tubo de agitación.

El segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se puede añadir al primer medio de cultivo líquido, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión. El segundo medio de cultivo líquido se puede añadir al primer medio de cultivo líquido manualmente (por ejemplo, pipeteando el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido directamente sobre el primer medio de cultivo líquido) o de forma automatizada.

En algunos casos, la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido (por ejemplo, un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células de mamífero y/o microportadores) y la adición al primer medio de cultivo líquido de un segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido no se produce dentro de al menos 1 hora (por ejemplo, dentro de las 2 horas, dentro de las 3 horas, dentro de las 4 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 6 horas, dentro de las 7 horas, dentro de las 8 horas, dentro de las 9 horas, dentro de las 10 horas, dentro de las 12 hoas, dentro de las 14 horas, dentro de las 16 horas, dentro de las 18 horas, dentro de las 24 horas, dentro de las 36 horas, dentro de las 48 horas, dentro de las 72 horas, dentro de las 96 horas, o después de 96 horas) desde la siembra del tubo de agitación con una célula de mamífero.

CO₂

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden incluir además incubar el tubo de agitación en una atmósfera que contiene como máximo o aproximadamente de 1% a 15% de CO₂ (por ejemplo, como máximo o aproximadamente 14% de CO₂, 12% de CO₂, 10% de CO₂, 8% de CO₂, 6% de CO₂, 5% de CO₂, 4% de CO₂, 3% de CO₂, 2% de CO₂, o como máximo o aproximadamente 1% de CO₂). Además, cualquiera de los procedimientos descritos en este documento puede incluir incubar el tubo de agitación en una atmósfera humidificada (por ejemplo, al menos o aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 85%, 80%, 85 %, 90%, o al menos o aproximadamente 95% de humedad, o aproximadamente 100% de humedad).

Dispositivos de ejemplo

Los ejemplos no limitativos de dispositivos que pueden utilizarse para llevar a cabo los procedimientos de cultivo descritos en el presente documento incluyen: incubadora de agitación INFORS Multiron distribuido por Appropriate Technical Resoruces (Maryland, Estados Unidos) (INFORS; Basilea, Suiza) e incubadora de agitación Kuhner (Kuhner AG; Basilea, Suiza). Los ejemplos no limitativos de dispositivos que pueden utilizarse para llevar a cabo los procedimientos de cultivo incluyen una incubadora rotatoria con un diámetro de aspa (órbita) de entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 50 mm (por ejemplo, entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 25 mm, o entre aproximadamente 25 mm y aproximadamente 50 mm). En la técnica se conocen ejemplos adicionales de incubadoras de agitación.

Procedimientos para producir una proteína recombinante

También se proporcionan en este documento procedimientos de producción de una proteína recombinante, que incluyen el cultivo de una célula de mamífero adherente que es capaz de producir la proteína recombinante utilizando un procedimiento descrito en este documento. Después de la realización del procedimiento, la proteína recombinante se puede recuperar de la célula de mamífero adherente (la célula de mamífero que se une al microportador) y/o del primer o segundo medio de cultivo (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquido utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer periodos de tiempo). En algunas realizaciones, la proteína recombinante se recupera del primer y/o segundo medios de cultivo líquido en cualquier punto de tiempo determinado durante el procedimiento de cultivo (por ejemplo, recuperado del primera y/o segundo medios de cultivo líquido en uno o más de los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 del cultivo o después de más de 100 días de cultivo, o en cualquier punto de tiempo durante uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo).

Los expertos en la técnica entenderán que cualquiera de los diversos parámetros de cultivo (por ejemplo, tubos de agitación, volúmenes, velocidades o frecuencias de sustitución de volúmenes de cultivo, frecuencias de agitación, tipo de microportador, temperaturas, medios y concentraciones de CO₂) se puede utilizar en cualquier combinación para realizar estos procedimientos. Además, cualquiera de las células de mamífero adherentes descritas en este documento o conocidos en la técnica se puede utilizar para producir una proteína recombinante.

Un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante puede introducirse en una célula de mamífero adherente usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en biología molecular y genética molecular. Los ejemplos no limitantes incluyen la transfección (por ejemplo, lipofección), transducción (por ejemplo, infección por lentivirus, adenovirus o retrovirus) y electroporación. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica una proteína recombinante no está integrado de forma estable en un cromosoma de la célula de mamífero (transfección transitoria), mientras que en otros el ácido nucleico está integrado. Alternativamente, o además, el ácido nucleico que codifica una proteína recombinante puede estar presente en un plásmido y/o en un cromosoma de mamífero artificial (por ejemplo, un cromosoma artificial humano). Alternativamente, o además, el ácido nucleico puede introducirse en la célula de mamífero adherente utilizando un vector viral (por ejemplo, un vector de lentivirus, retrovirus o adenovirus). El ácido nucleico puede estar unido operativamente a una secuencia promotora (por ejemplo, un promotor fuerte, tal como un promotor de β -actina y un promotor de CMV, o un promotor inducible). Un vector que contiene el ácido nucleico puede, si se desea, contener también un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen que confiere a la célula de mamífero resistencia a higromicina, puromicina o neomicina).

En algunos casos, la proteína recombinante es una proteína secretada y es liberada por la célula de mamífero adherente en el medio extracelular (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos usados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo). Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante soluble puede contener una secuencia que codifica un péptido señal de secreción en el extremo N- o C-terminal de la proteína recombinante, que se escinde mediante una enzima presente en la célula de mamífero adherente y posteriormente se libera en el medio extracelular (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, o el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo). En otros casos, la proteína recombinante es una proteína soluble que no se secreta y la proteína recombinante se recupera del interior de la célula de mamífero adherente (por ejemplo, de dentro de la célula de mamífero que está unida al microportador, por ejemplo, se recupera de la célula de mamífero unida al microportador después de que se ha separado del microportador).

Los ejemplos no limitantes de proteínas recombinantes que se pueden producir mediante los procedimientos proporcionados en este documento incluyen inmunoglobulinas (incluyendo inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada, anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, cualquiera de los fragmentos de anticuerpos descritos en este documento), enzimas (por ejemplo, una galactosidasa (por ejemplo, una alfa-galactosidasa), Myozyme, o Cerezyme), proteínas (por ejemplo, eritropoyetina humana, factor de necrosis tumoral (TNF) o un alfa o beta interferón) o proteínas inmunogénicas o antigénicas o fragmentos de proteínas (por ejemplo, proteínas de uso en una vacuna). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un polipéptido diseñado de unión a antígeno que contiene al menos un andamio estructural de la proteína recombinante multifuncional (véanse, por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno recombinantes descritas en Gebauer et al., Current Opin. Chem Biol. 13: 245-255, 2009; y la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2012/0164066). Los ejemplos no limitantes de proteínas recombinantes que son anticuerpos incluyen: panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, apolizumab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, biciromab, canakinumab, cetuximab, daclizumab, densumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, ertumaxomab, etaracizumab, golimumab, infliximab, natalizumab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab y trastuzumab. Los ejemplos adicionales de anticuerpos terapéuticos que se pueden producir mediante los procedimientos descritos en el presente documento son conocidos en la técnica. Ejemplos adicionales no limitantes de proteínas recombinantes que pueden ser producidas mediante los presentes procedimientos incluyen: alfa alglucosidasa, laronidasa, abatacept, galsulfasa, alfa lutropina, factor antihemofílico, alfa agalsidasa, interferón beta-la, alfa darbepoetina, tenecteplasa, etanercept, factor de coagulación IX, hormona estimulante del folículo, interferón beta-la, imiglucerasa, alfa dornasa, alfa epoetina y alteplasa.

Una proteína recombinante soluble secretada se puede recuperar del medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más de los primer, segundo y tercer períodos de tiempo) mediante la extracción o, en cualquier caso, la separación física del medio de cultivo líquido de microportadores y sus células de mamíferos asociadas. Una variedad de diferentes procedimientos para la extracción del medio de cultivo líquido a partir de células de mamífero son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, centrifugación, filtración, pipeteado y/o aspiración. La proteína recombinante secretada se puede recuperar y purificar adicionalmente del medio de cultivo líquido usando una variedad de técnicas bioquímicas, incluyendo varios tipos de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de intercambio aniónico) y/o filtración (por ejemplo, filtración por corte de peso molecular).

Para recuperar una proteína recombinante intracelular, se puede lisar la célula de mamífero adherente (por ejemplo, la célula de mamífero unida al microportador). En algunos ejemplos, la célula de mamífero es liberada de la superficie del microportador antes de que se lise. Los procedimientos para la liberación de una célula adherente de la superficie de un microportador son conocidos en la técnica (por ejemplo, agitación con vórtice o agitación). En

otros ejemplos, la célula de mamífero se lisa mientras todavía está unida al microportador (por ejemplo, utilizando cualquiera de los procedimientos de ejemplo que se indican a continuación).

5 Una amplia variedad de procedimientos para lisar células de mamífero son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, lisis por sonicación y/o detergente, lisis enzimática y/o lisis química. Una proteína recombinante puede purificarse a partir de un lisado de células de mamífero usando una variedad de procedimientos bioquímicos conocidos en la técnica, típicamente comenzando con una etapa de centrifugación para eliminar los restos celulares y a continuación una o más etapas adicionales (por ejemplo, uno o más tipos de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de intercambio aniónico) y/o filtración (por ejemplo, filtración por corte de peso molecular)).

10 En algunas realizaciones, la proteína recombinante recuperada es al menos o aproximadamente 50% pura en peso, por ejemplo, al menos o aproximadamente 55% pura en peso, al menos 60% pura en peso, al menos 65% pura en peso, al menos 70% pura en peso, al menos 75% pura en peso, al menos 80% pura en peso, al menos 85% pura en peso, al menos 90% pura en peso, al menos 95% pura en peso, al menos 96% pura en peso, al menos 97% pura en peso, al menos 98% pura en peso o al menos o aproximadamente 99% pura en peso, o mayor que 99% pura en peso.

15 En algunas realizaciones, la proteína recombinante recuperada es una proteína humana recombinante que tiene una o más diferentes propiedades biofísicas en comparación con la misma proteína nativa en un ser humano (por ejemplo, las diferencias en el tipo o cantidad de glicosilación, las diferencias en la fosforilación, las diferencias en la acilación, las diferencias en la metalación o estequiometría de metales y/o diferencias en la unión a cofactor).

20 También se proporciona en el presente documento una proteína recombinante producida mediante cualquiera de los procedimientos descritos en este documento.

Procedimientos para ensayar un procedimiento de fabricación

25 También se proporcionan en este documento procedimientos para ensayar un procedimiento de fabricación para la fabricación de una proteína recombinante. Estos procedimientos incluyen realizar un procedimiento para producir una proteína recombinante descrita en el presente documento y, durante el procedimiento y/o después, detectar o medir al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) lectura del cultivo (por ejemplo, la proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo), el consumo de glucosa, la concentración de células viables, la producción de lactato, la productividad volumétrica, la productividad específica, el rendimiento de lactato a partir de glucosa, la concentración de glutamina, la concentración de glutamato, el pH del medio de cultivo, la presión parcial o la concentración de CO₂ disuelto, la presión parcial o la concentración de O₂ disuelto, la transferencia de masa de metabolitos y el balance de masas de metabolitos); y comparar la lectura dicha al menos una lectura del cultivo con un nivel de referencia de dicha al menos una (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce) lectura del cultivo (por ejemplo, una nivel de referencia de la proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo), el consumo de glucosa, la concentración viable de células, la producción de lactato, la productividad volumétrica, la productividad específica, el rendimiento de lactato a partir de glucosa, la concentración de glutamina, la concentración de glutamato, el pH del medio de cultivo, la concentración o presión parcial de CO₂ disuelto, la concentración o presión parcial de O₂ disuelto, la transferencia de masa de metabolitos y el balance de masa de metabolitos).

30 Los expertos entenderán que cualquiera de los diversos parámetros de cultivo (por ejemplo, tubos de agitación, volúmenes, tipo de microportadores, velocidades o frecuencias de sustitución de volúmenes de cultivo, frecuencias de agitación, temperaturas, medios y exposición de CO₂) descritos en este documento se puede utilizar en cualquier combinación para llevar a cabo estos procedimientos. Además, se puede utilizar en los procedimientos cualquiera de las células de mamífero descritas en este documento o conocidas en la técnica.

35 El nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, el nivel de proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo), el consumo de glucosa, la concentración viable de células, la producción de lactato, la productividad volumétrica, la productividad específica, el rendimiento de lactato a partir de glucosa, la concentración de glutamina, la concentración de glutamato, el pH del medio de cultivo, la concentración o presión parcial de CO₂ disuelto, la concentración o presión parcial de O₂ disuelto, la transferencia de masa de metabolitos y el balance de masa de metabolitos)) pueden ser un nivel producido usando un procedimiento de cultivo diferente, por ejemplo, un procedimiento de cultivo que utiliza al menos un parámetro de cultivo diferente (por ejemplo, un primer y/o segundo medios de cultivo líquidos diferentes (por ejemplo, un primer y/o segundo medios de cultivo líquidos diferentes en uno o más del primer, segunda o tercer períodos de tiempo), una célula de mamífero diferente, una frecuencia y/o tipo de agitación diferentes, un tipo o concentración diferente de microportadores, un velocidad de realimentación por lotes o perfusión diferente (por ejemplo, de 10% a 95% del

volumen del tubo de agitación o del primer volumen de medio de cultivo líquido durante cada período de tiempo de 24 horas después de las primeras 48 a 96 horas de cultivo), y cualquiera de los otros parámetros de cultivo descritos en el presente documento).

5 Los procedimientos aquí descritos pueden ser usados para probar el efecto de cualquier componente o característica de un procedimiento de fabricación. Por ejemplo, el procedimiento aquí descrito puede utilizarse para probar el efecto de diferentes materias primas, microportadores, niveles de agitación, tubos de agitación, agentes antiaglomerantes, medios de cultivo (por ejemplo, medios de cultivo definidos químicamente), o elementos o compuestos nutrientes sobre dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, el efecto sobre la producción de proteína recombinante y/o el crecimiento de células de mamífero adherentes). Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan procedimientos de control de la eficacia de un primer o segundo medio de cultivo líquido, un ingrediente crudo o complemento presente en un primer o segundo medio de cultivo líquido, o una fuente de una célula de mamífero adherente para su uso en un procedimiento de producción de una proteína recombinante que incluye proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, en el que el primer medio de cultivo líquido ocupa, por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% del volumen del tubo de agitación, y contiene una pluralidad de microportadores en una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; detectar o determinar al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo); comparar dicha al menos una lectura del cultivo con un nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos) producida mediante un procedimiento de cultivo diferente que utiliza uno o más de un primer o segundo medio de cultivo líquido diferente, un ingrediente crudo o complemento presente en el primero o segundo medio de cultivo líquido diferente, o una fuente diferente de una célula de mamífero adherente; e identificar el primer o segundo medio de cultivo líquido, el ingrediente crudo o complemento presente en el primero o segundo medio de cultivo líquido, o la fuente de la célula de mamífero adherente que está asociada con un cambio beneficioso (por ejemplo, aumento o disminución) en dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, una cantidad aumentada de proteína recombinante), en comparación con el nivel de referencia como eficaz para usar en un procedimiento de producción de una proteína recombinante. Por ejemplo, un aumento en el nivel de proteína recombinante, un aumento en la concentración de células viables, un aumento en la productividad volumétrica, y un aumento en el consumo de glucosa en comparación con el nivel de referencia indica que el primer o segundo medio de cultivo, el ingrediente crudo o complemento presente en un primer o segundo medio de cultivo líquido, o la fuente de la célula de mamífero adherente son eficaces para usar en un procedimiento para producir una proteína recombinante.

Los procedimientos aquí descritos también se pueden utilizar para poner a prueba el efecto de cambiar cualquiera de los diversos parámetros de cultivo de células descritos en este documento o conocidos en la técnica (por ejemplo, el volumen o la forma de un tubo de agitación, la frecuencia de agitación, la fuerza de cizalladura generada por la pluralidad de microportadores en el primer y/o segundo medio de cultivo líquido, la densidad de siembra del cultivo, el pH del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos (por ejemplo, el pH del primera y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo o tercer períodos de tiempo), concentración o presión parcial de O₂ disuelto, el recubrimiento de la superficie interior del tubo de agitación, uno o más de la concentración, tamaño, forma, propiedades de la superficie, densidad y porosidad de los microportadores, los diversos ingredientes dentro de un medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer período de tiempo), la cantidad y/o tipo de agitación, el tipo o línea de célula de mamífero, concentración o presión parcial de CO₂ disuelto, la temperatura, el volumen del medio de cultivo líquido (por ejemplo, el volumen del primera y/o segundo medios de cultivo líquidos), y/o la velocidad o frecuencia de la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido al primer medio de cultivo (por ejemplo, la velocidad o frecuencia de extracción del primer volumen del primer medio de cultivo y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo). Los procedimientos también se pueden utilizar para probar la calidad del agua utilizada para preparar el medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos, por ejemplo, el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados en uno o más del primero, segundo y tercer períodos de tiempo) y/o el efecto de diferentes metales traza en el medio de cultivo líquido en al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, el efecto en la producción recombinante de proteínas y/o el crecimiento de células de mamíferos). Los procedimientos también se pueden utilizar para probar el efecto de una hormona de crecimiento o factor de crecimiento (por ejemplo, el efecto de la presencia de un factor de crecimiento u hormona de crecimiento en el primer periodo de tiempo) en al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por

ejemplo, el efecto sobre la producción recombinante de proteínas y/o el crecimiento de células de mamíferos). El procedimiento también puede ser utilizado para probar los procedimientos de filtración y los filtros usados para preparar el primer y/o segundo medios de cultivo líquidos (por ejemplo, el primer y/o segundo medios cultivo líquidos utilizados en uno o más del primer, segundo y tercer períodos de tiempo). El procedimiento también puede ser utilizado para probar la estabilidad del medio de cultivo líquido y el efecto de un medio de cultivo líquido en al menos una lectura de cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, el efecto sobre la producción de proteínas recombinantes y/o crecimiento de células de mamífero). El procedimiento también se puede utilizar para cribar diversas líneas de células y bancos de células adherentes recombinantes por su capacidad para producir una proteína recombinante deseada (por ejemplo, una proteína terapéutica secretada deseada). Como se ha señalado en el presente documento, el procedimiento también se puede utilizar para detectar cualquier parámetro del procedimiento de cultivo de células, incluyendo, pero no limitado a, el tipo y la frecuencia de agitación, la fuerza de cizalladura generada por los microportadores, la velocidad de perfusión y de volumen, la densidad de siembra del cultivo, y otros.

El procedimiento descrito en este documento también se puede utilizar para probar la presencia de un contaminante en un primer o segundo medio de cultivo líquido, una materia prima usada para generar un primer o segundo medio de cultivo líquido, o una fuente de una célula de mamífero. Por ejemplo, en este documento se proporcionan procedimientos de ensayo para la presencia de un contaminante en un primer o segundo medio de cultivo líquido, las materias primas utilizadas para generar un primer o segundo medio de cultivo líquido, o una fuente de una célula de mamífero adherente que incluyen proporcionar un tubo agitado que contiene una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, en el que el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente, por ejemplo, 10% a aproximadamente 30% del volumen del tubo de agitación, y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primer y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; detectar o determinar al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo); comparar dicha al menos una lectura del cultivo con un nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la cantidad de proteína recombinante presente en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo) producida mediante un procedimiento de cultivo diferente que utiliza uno o más de un primer o segundo medio de cultivo líquido diferente, materias primas diferentes para generar el primer o segundo medio de cultivo líquido, o una fuente diferente de la célula de mamífero adherente; e identificar el primer o segundo medio de cultivo líquido, las materias primas utilizadas para generar el primer o segundo medio de cultivo líquido, o la fuente de una célula de mamífero adherente como que contiene un contaminante cuando el nivel de dicho al menos un parámetro de cultivo cambia perjudicialmente (por ejemplo, aumento o disminución) en comparación con el nivel de referencia. Por ejemplo, una disminución en la producción recombinante de proteínas (por ejemplo, una disminución de la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medio de cultivo), la productividad volumétrica o la concentración de células viables en comparación con el nivel de referencia es un cambio perjudicial que indica la presencia de un contaminante en el primer o el segundo medio de cultivo líquido, una materia prima usada para generar el primer o segundo medio de cultivo líquido, o la fuente de la célula de mamífero. Algunos procedimientos incluyen además uno o más ensayos para determinar la identidad del contaminante presente en el primer o segundo medio de cultivo líquido, la materia prima utilizada para generar el primer o segundo medio de cultivo líquido, o la fuente de la célula de mamífero adherente. El contaminante puede ser un contaminante biológico (por ejemplo, una micobacteria, un hongo, una bacteria, un virus, o una célula de mamífero no deseada). Por ejemplo, el contaminante puede ser un Vesivirus. El contaminante puede ser un contaminante inorgánico. El contaminante puede ser una sustancia físicamente sin caracterizar.

Los procedimientos pueden utilizarse para llevar a cabo experimentos de cultivo celular de alto rendimiento para llevar a cabo un diseño de experimento (DOE) o una optimización de la calidad por diseño (QBD) de los procedimientos de cultivo celular. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan procedimientos de optimización de un procedimiento de fabricación para la producción de una proteína recombinante que incluyen proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, en el que el primer medio de cultivo líquido ocupa, por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación, y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l; incubar el tubo de agitación durante un período de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM; y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales; detectar al menos una lectura de cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la cantidad de proteína recombinante en la célula o en el primer y/o segundo medios de cultivo); comparar la lectura de

al menos un cultivo con un nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la cantidad de proteína recombinante presente en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo) producida mediante un procedimiento de cultivo diferente; e identificar y eliminar o alterar en un procedimiento de fabricación cualquiera de los componentes de cultivo o de los parámetros que están asociados con un cambio perjudicial (por ejemplo, aumento o disminución) de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, cantidad de proteína recombinante producida) en comparación con el nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas de cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la proteína recombinante producida), o identificar y añadir a un procedimiento de fabricación cualquiera de los componentes de cultivo o parámetros que están asociados con un cambio beneficioso (por ejemplo, aumento o disminución) de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la cantidad de proteína recombinante producida) en comparación con el nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento, por ejemplo, la proteína recombinante producida). Por ejemplo, un aumento en la cantidad de proteína recombinante producida, la productividad volumétrica, la productividad específica o la concentración de células viables son un cambio beneficioso en una lectura del cultivo, y una disminución en la cantidad de proteína recombinante producida, la productividad volumétrica, la productividad específica o la concentración de células viables es un cambio perjudicial en una lectura del cultivo. En algunos casos, se utiliza el procedimiento para identificar de un modo de alto rendimiento, las condiciones de cultivo celular optimizadas que se pueden utilizar para escalar la producción (por ejemplo, en biorreactor) de una proteína recombinante.

En cualquiera de los procedimientos descritos en esta sección, el nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo puede ser de un cultivo a mayor escala (por ejemplo, un biorreactor de perfusión, por ejemplo, un biorreactor de perfusión de 2000 litros, un biorreactor de perfusión de 40 litros o un biorreactor de perfusión de 12 litros). En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en esta sección, la célula de mamífero adherente se cultiva en un tubo de agitación utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento durante el mismo período de tiempo se lleva a cabo un cultivo a mayor escala (cultivado en paralelo). Por ejemplo, el inóculo usado para inocular el tubo de agitación en cualquiera de los procedimientos descritos en este documento también se utiliza para inocular un biorreactor de perfusión a mayor escala en aproximadamente el mismo tiempo.

En una realización, el inóculo que se utiliza para sembrar el tubo de agitación se obtiene de un cultivo a mayor escala (por ejemplo, un biorreactor de perfusión a mayor escala). Por ejemplo, una parte alícuota de un cultivo a mayor escala (por ejemplo, una parte alícuota de un biorreactor de perfusión a mayor escala) se extrae del cultivo a mayor escala, en cualquier punto de tiempo (por ejemplo, extraído durante la fase de crecimiento, la fase de transición o la fase de recogida descritas en este documento) y se usa para inocular el tubo de agitación (por ejemplo, utilizada para iniciar un cultivo en tubo de agitación satélite). Se puede extraer una alícuota del cultivo a mayor escala durante la fase de crecimiento y se utiliza para inocular o sembrar un tubo de agitación que contiene un medio de cultivo líquido y una pluralidad de microportadores (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento), y el tubo de agitación entonces se incuba bajo condiciones que se replican o son similares a las condiciones de fase de crecimiento empleadas en el cultivo a mayor escala. Una alícuota puede alternativamente, o adicionalmente, extraerse del cultivo a mayor escala durante la fase de transición y se usa para inocular o sembrar un tubo de agitación que contiene un medio de cultivo líquido y una pluralidad de microportadores (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento), y el tubo de agitación se incuba después en condiciones que reproducen o son similares a las condiciones de fase de transición empleadas en el cultivo a mayor escala. Una alícuota puede alternativamente, o adicionalmente, extraerse del cultivo a mayor escala en la fase de recogida y se utiliza para inocular o sembrar un tubo de agitación que contiene un medio de cultivo líquido y una pluralidad de microportadores (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento), y el tubo de agitación se incuba después en condiciones que reproducen o son similares a las condiciones de la fase de recogida empleadas en el cultivo a mayor escala. En cualquiera de estos procedimientos, uno o más parámetros de cultivo pueden alterarse en los procedimientos empleados para el cultivo de la célula de mamífero en el tubo de agitación (en comparación con los parámetros de cultivo o componentes usados para cultivar las células de mamífero adherentes en el cultivo a mayor escala), se mide al menos una lectura del cultivo (por ejemplo, una o más de cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en el presente documento), y dicha al menos una lectura del cultivo se compara con dicha al menos una lectura del cultivo determinada para el cultivo a mayor escala. Como puede entenderse por un experto en la técnica, estos procedimientos pueden usarse para probar el efecto de un parámetro de cultivo específico o componente específico en al menos una lectura del cultivo durante una o más fases específicas en el procedimiento de cultivo (por ejemplo, el efecto de uno o más parámetros de cultivo y/o componente o componentes de cultivo en al menos una lectura del cultivo durante la fase de crecimiento, transición y/o recogida).

En cierta realización, estos procedimientos también se pueden realizar para determinar si un contaminante está presente en el biorreactor a mayor escala, mediante la determinación o detección de al menos una lectura del cultivo en el cultivo del tubo de agitación (por ejemplo, uno o más de cualquiera de las lecturas del cultivo descritas en este documento), la comparación de dicha al menos una lectura del cultivo con un nivel de referencia de dicha al menos una lectura de cultivo (por ejemplo, un nivel de dicha al menos una lectura del cultivo de un cultivo que está

5 sustancialmente libre de contaminación), y la identificación del biorreactor a mayor escala que contiene un contaminante cuando dicha al menos una lectura del cultivo en el cultivo del tubo de agitación en comparación con el nivel de referencia de dicha al menos una lectura del cultivo indica que un contaminante está presente en el tubo de agitación. El contaminante puede ser, por ejemplo, un contaminante biológico, tal como un virus, un hongo, una célula de mamífero no deseada, o una bacteria, tal como una micobacteria. El contaminante puede ser, por ejemplo, un Vesivirus.

EJEMPLOS

10 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Ejemplos de procedimientos de cultivo usando un tubo de agitación y microportadores

15 La α -galactosidasa humana puede producirse usando técnicas de ingeniería recombinante establecidas en una línea celular CHO. La producción actual de fabricación de α -galactosidasa A humana recombinante utiliza una tecnología de procedimiento de cultivo celular de perfusión continua con microportadores para 2000 litros. Típicamente, el procedimiento de cultivo celular de producción incluye tres fases: la fase de crecimiento, la fase de transición y la fase de recogida. Existe una demanda para un sistema de procedimiento de cultivo celular de alto rendimiento que
20 modele con precisión las condiciones del procedimiento de cultivo de células obtenidas en una ejecución del procedimiento de cultivo celular en un biorreactor de 2000 litros.

Los experimentos anteriores demostraron que un procedimiento de cultivo celular con realimentación por lotes con matraz de agitación y microportadores replica con éxito el crecimiento celular y la productividad alcanzada en una
25 ejecución del procedimiento de cultivo celular en un biorreactor más grande de 2000 litros (Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. 61/768.085). En este ejemplo se describe procedimiento de cultivo celular con realimentación por lotes con tubo de agitación y microportadores que simula con precisión el procedimiento de cultivo celular para α -galactosidasa humana recombinante en un biorreactor de 2000 litros por perfusión.

30 Materiales y equipamiento

Fuente de células Fabrazyme

Las células productoras de α -galactosidasa humana recombinante utilizadas en cada ejecución del procedimiento de
35 cultivo celular derivan del mismo banco de células, con el fin de asegurar la comparabilidad entre cada ejecución del procedimiento de cultivo celular. Las células se transforman de manera estable con un ácido nucleico que codifica una forma secretada de α -galactosidasa recombinante humana. Se utilizó un medio de crecimiento (medio 925 con 10% de suero bovino de Dulbecco, pH 7,3, y 0,1% de Pluronic F-68) durante el procedimiento de expansión del cultivo del banco de células.

40 *Equipo*

El siguiente equipo se utilizó para realizar los experimentos descritos en este ejemplo: una incubadora Multitron Shaker (Appropriate Technical Resources, Inc., Modelo No. AG CH-4103), un analizador de viabilidad celular Beckman Coulter Vi-Cell (Beckman Coulter, Inc., modelo XR), un analizador YSI Biochemistry (Yellow Springs Instruments, Inc. Modelo No. 2700 Select), y un analizador de gases de la sangre (Bayer AG, Modelo No. 248).

Diseño experimental

50 El inóculo usado para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células por realimentación por lotes con microportadores con tubo de agitación de ejemplo se generó a partir de la expansión de un cultivo de siembra de un vial descongelado de células CHO productoras de α -galactosidasa humanas recombinante. Después de cinco días de la expansión de las células descongeladas en medio 925 con 10% DBS, pH 7,3, y 0,1% de Pluronic F-68, el cultivo de siembra se usó para inocular un tubo de agitación (a una concentración final de $0,25 \times 10^6$ células viables/ml en el tubo de agitación) que contenía una suspensión de microportadores esterilizada (Cytopore II, concentración final de 1,5 g/l en el medio de crecimiento) y medio de crecimiento (medio 925 con 6% DBS, pH 7,0, y 0,1% de Pluronic F-68), que inicia la fase de crecimiento del cultivo celular. El volumen de trabajo para los tubos de agitación (50 ml de volumen total) fue diseñado para ser de 7 ml. Los cultivos se mantuvieron a 37°C o 36°C, 80% de humedad relativa, y 5% de CO₂. Se probaron tres frecuencias diferentes de agitación rotatorio por su capacidad para
60 apoyar y mantener el crecimiento celular y la productividad: 120 RPM, 140 RPM y 160 RPM. Cuando cada cultivo alcanzó una densidad celular objetivo de entre $2,0 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^6$ células viables/ml, la fase de transición se inició cambiando el medio de cultivo líquido por un medio de cultivo líquido de producción diferente (medio 925, pH 6,85-7,05 y 0,1% de Pluronic F-68) y el cambio de la temperatura a 32°C. Después de 5 días de la fase de transición, la temperatura se cambió de nuevo a 37°C o 36°C, y los cultivos se mantuvieron con un medio de cultivo líquido de producción. El intercambio de medios se inició en el tercer día de la fase de crecimiento y continuó hasta el final de cada ejecución del procedimiento de cultivo celular, con un intercambio de realimentación por lotes diario del 70%

del volumen inicial del medio de cultivo líquido presente en el tubo de agitación en el inicio de la ejecución del procedimiento de cultivo celular. En cada día, comenzando al tercer día de la fase de crecimiento, se realizó el intercambio de medios mediante la breve detención de la agitación del tubo de agitación, colocación del tubo de agitación vertical, permitiendo que los microportadores se asienten en el fondo del tubo de agitación durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 minutos, y extracción del tubo de agitación un volumen del medio de cultivo líquido que es 70% del volumen inicial del medio de cultivo líquido presente en el tubo de agitación en el inicio del cultivo cuando el medio de cultivo está libre de microportadores mediante inspección visual, y entonces poco después, la adición de un volumen de medio de cultivo líquido que es sustancialmente el mismo volumen que el volumen de medio de cultivo líquido extraído.

El inóculo usado para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con microportadores con matraz de agitación de control se generó a partir de la expansión de un cultivo de siembra de un vial descongelado de las mismas células CHO productoras de α -galactosidasa humanas recombinante utilizadas para inocular las ejecuciones del procedimiento de cultivo celular con microportadores con tubo de agitación descritas en este ejemplo. Después de cinco días de la expansión de las células descongeladas en medio 925 con 10% DBS, pH 7,3, y 0,1% de Pluronic F-68, el cultivo de siembra se usó para inocular un matraz de agitación (a una concentración final de $0,25 \times 10^6$ células viables/ml en el matraz de agitación) que contenía una suspensión de microportadores esterilizada (CytoPore II, GE Healthcare, Piscataway, NJ concentración final de 1,5 g/l; tamaño promedio de 200-280 μm ; tamaño de poro promedio 30 μm) y medio de crecimiento (medio 925 con 6% DBS, pH 7,0, y 0,1% de Pluronic F-68), que inicia la fase de crecimiento del cultivo celular. Los cultivos se mantuvieron a 37°C o 36°C, 95 RPM, 80% de humedad relativa, y 5% de CO₂. Cuando el cultivo alcanzó una densidad celular objetivo de entre $2,5 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^6$ células viables/ml, la fase de transición se inició cambiando el medio de cultivo líquido por un medio de cultivo líquido de producción diferente (medio 925, pH 6,85-7,05 y 0,1% de Pluronic F-68) y el cambio de la temperatura a 32°C. Después de 5 días de la fase de transición, la temperatura se cambió de nuevo a 37°C o 36°C, y los cultivos se mantuvieron con un medio de cultivo líquido de producción. El intercambio de medios se inició en el tercer día de la fase de crecimiento y continuó hasta el final del cultivo, con un intercambio de realimentación por lotes diario del 70% del volumen inicial del medio de cultivo líquido presente en el matraz de agitación en el inicio del cultivo. En cada día, comenzando al tercer día de la fase de crecimiento, se realizó el intercambio de medios mediante la breve detención de la agitación del matraz de agitación, permitiendo que los microportadores se asienten en el fondo del matraz de agitación en una campana de bioseguridad. En algunos casos, el matraz de agitación se colocó en un estante que posiciona el matraz de agitación en un ángulo de 45 grados con respecto a la horizontal o la mesa de trabajo, mientras que los microportadores se establecieron en la parte inferior del matraz de agitación con el fin de mejorar el intercambio de medio. Después de que los microportadores se han depositado en el fondo del matraz de agitación, se extrajo del matraz de agitación un volumen de medio de cultivo líquido que es el 70% del volumen inicial del medio de cultivo líquido presente en el matraz de agitación, y luego poco después, se añade al matraz de agitación un volumen de medio de cultivo líquido que es sustancialmente el mismo volumen que el volumen de medio de cultivo líquido extraído.

Un resumen de las condiciones del procedimiento y programación de muestreo para cada ejecución del procedimiento de cultivo de células en tubo de agitación y la ejecución del procedimiento de cultivo de células en tubo de agitación se proporciona en la Tabla 1.

En los días de cultivo predeterminados, fueron analizados los siguientes parámetros de cultivo en cada ejecución del procedimiento de cultivo: densidad de células viables y de suspensión, pCO₂, pO₂, pH, y la concentración de glucosa, lactato, glutamina y glutamato. La concentración de células viables es un

Tabla 1. Resumen de las condiciones de ejecución del procedimiento de cultivo celular y programación del muestreo

		Matraces de agitación	Tubos de agitación
Condición del procedimiento	Volumen de trabajo Volumen del recipiente Velocidad de agitación del incubador	60 ml 250 ml 95 RPM	7 ml 50 ml 120, 140, 160 RPM
Programación de muestreo	Recuento celular Metabolitos BGA (pH, pCO ₂ , pO ₂) Productividad	3 muestras/semana 3 muestras/semana 3 muestras/semana 3 muestras/semana	3 muestras/semana durante la fase G/T; 1 muestra/semana para la fase H 3 muestras/semana 3 muestras/semana 3 muestras/semana

parámetro crítico durante la fase de crecimiento y transición en cada ejecución del procedimiento de cultivo celular, ya que el inicio de la fase de transición se basa en la concentración de células. Sin embargo, a fin de reducir la pérdida de células, la frecuencia de muestreo utilizada para determinar la densidad de células viables durante la fase

de recogida para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células en tubo de agitación se reduce drásticamente. Se puede confiar en otras características del cultivo, tales como perfiles metabólicos de los medios gastados y la productividad, para monitorizar el rendimiento de cultivo en cada ejecución del procedimiento de cultivo celular. Las tasas de consumo de glucosa y glutamina, así como las tasas de producción de lactato y glutamato en cada ejecución de procedimiento de cultivo celular se calcularon usando las Ecuaciones 1-4 (a continuación). Las muestras de título se recogieron y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó el ensayo para medir la actividad de α-galactosidasa A humana recombinante. La productividad volumétrica acumulada se calculó utilizando la Ecuación 5 (a continuación). Se realizó una ejecución del procedimiento de cultivo celular completo con un conjunto por triplicado de tubos de agitación y matraces de agitación (condiciones descritas a continuación) para cada condición. Se calcularon el promedio y la desviación estándar de los datos y se muestran en cada una de las Figuras 1-9.

	$Gluc_{cons} = ([Gluc]_m - [Gluc]_c) * PR$	Ecuación 1
	$LaC_{prod} = [Lac]_c * PR$	Ecuación 2
	$Gln_{cons} = ([Gln]_m - [Gln]_c) * PR$	Ecuación 3
	$Glu_{cons} = ([Glu]_c - [Glu]_m) * PR$	Ecuación 4
	$\Sigma VPR = \Sigma(título * PR)$	Ecuación 5

$Gluc_m$: concentración de glucosa en medio fresco (4,5 g/l)
 $Gluc_c$: concentración de glucosa en medio gastado (g/l)
 Lac_c : concentración de lactato en medio gastado (g/l)
 Gln_m : concentración de glutamina en medio fresco (4 mM)
 Gln_c : concentración de glutamina en medio gastado (mM)
 Glu_m : concentración de glutamato en medio fresco (0,8 mM)
 Glu_c : concentración de glutamato en medio gastado (mM)
 PR : velocidad de perfusión por día (velocidad de realimentación)
 $Título$: actividad rhα-gal (U/l)
 VPR : productividad volumétrica (U/l/d)

Resultados

Fase de crecimiento, transición y recogida temprana

El rendimiento del cultivo durante la fase de crecimiento hasta la fase de transición es importante para un funcionamiento exitoso del procedimiento de cultivo celular. La tabla 2 proporciona un resumen de los parámetros de crecimiento/transición de todas las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células ensayadas. Las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una velocidad de agitación de 140 RPM alcanzó la densidad celular de transición objetivo de $2,86 \times 10^6$ células/ml en el séptimo día de la fase de crecimiento. Usando este diámetro de aspa específico (órbita) y el tubo de agitación, la velocidad de agitación rotatorio de 160 RPM no apoyó el crecimiento celular y esta ejecución del procedimiento de cultivo celular terminó en la fase de crecimiento temprano. Esto puede ser debido a la alta tensión de cizallamiento que el cultivo estaba experimentando usando esta combinación específica de velocidad de agitación, diámetro de aspa (órbita) y tubo de agitación. Las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas con una frecuencia de agitación de 120 RPM se forzaron en la fase de transición en el noveno día de la fase de crecimiento, con una densidad de células de transición de $1,12 \times 10^6$ células/ml (una densidad que se encuentra fuera del intervalo de la densidad de células de transición objetivo de ejemplo de $2-3 \times 10^6$ células/ml). La inspección visual de las ejecuciones del procedimiento de cultivo celular realizadas a una frecuencia de agitación de 120 RPM reveló la formación de grumos de los agregados de células con microportadores, la mayoría probablemente debidos a una velocidad de agitación inadecuada.

Los perfiles de densidad de células viables (XV) para cada ejecución del procedimiento de cultivo celular se muestran en la Figura 1. Debido a la baja densidad de transición para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas utilizando una frecuencia de agitación de 120 RPM, la densidad de células viables en estas ejecuciones del procedimiento del cultivo celular no fue capaz de recuperarse del lavado del suero y de la disminución de la temperatura del cultivo que se produce durante la fase de transición. Estas ejecuciones del procedimiento de cultivo de células se terminaron en el día de la recogida 12. Las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas con una frecuencia de agitación de 140 RPM (Figura 1) fueron capaces de completar con éxito la fase de transición y mantener un perfil de densidad de células viables constante similar al de las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con un matraz de agitación de control hasta la fase de transición y la fase de recogida temprana.

Tabla 2. Resumen de la densidad de duración y transición de la fase de crecimiento de las series del proceso de cultivo celular

Condición experimental	Densidad de transición	Día de crecimiento hasta transición
Tubo de agitación 120 RPM	1,12 E6 células/ml	G9
Tubo de agitación 140 RPM	2,86 E6 células/ml	G7
Tubo de agitación 160 RPM	Terminado debido al bajo crecimiento celular	
Matraces de agitación	2,48 E6 células/ml	G9

5

Crecimiento del cultivo

Se monitorizó el crecimiento y el rendimiento de cada ejecución del procedimiento de cultivo celular. El crecimiento del cultivo para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una frecuencia de agitación de 140 RPM, tal como se representa por la concentración de células viables (Figura 1), mostró un aumento consistente en la concentración celular hasta la fase de crecimiento y la fase de transición temprana para llegar a un máximo de aproximadamente $2,5 - 3 \times 10^6$ células viables/ml. A medida que estos cultivos se adaptan al medio libre de suero (empezando en la fase de transición y hasta la fase de recogida), hubo una disminución drástica en la concentración de células viables durante la fase de recogida temprana. Los cultivos se estabilizaron a continuación entre $0,5 - 1 \times 10^6$ células viables/ml durante toda la fase de recogida de las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células. Los perfiles de crecimiento de las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una frecuencia de agitación de 140 RPM y las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células en matraces de agitación fueron comparables en todo el periodo de cultivo.

Productividad del cultivo

La productividad del cultivo se monitorizó durante todo el periodo de cultivo para comparar el rendimiento de las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una frecuencia de agitación de 140 RPM y las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación. La productividad del cultivo para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación y ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraces de agitación alcanzó su punto máximo en la fase de transición tardía/fase de recogida temprano. Sin embargo, a medida que los cultivos se adaptaban a medio libre de suero, se observó una fuerte disminución de la productividad. Los cultivos se recuperaron de este período mínimo en la fase de recogida temprana, y se estabilizaron hasta el final de la ejecución del procedimiento de cultivo de células. Al comparar el perfil de productividad de las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas a una frecuencia de agitación de 140 RPM con las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraces de agitación, se observó una diferencia en la fase media de la recogida. Las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas utilizando una frecuencia de agitación de 140 RPM fueron capaces de producir un segundo pico de productividad durante la fase media de la recogida (H15 a H35). Este segundo pico de productividad también se reflejó en el perfil productividad volumétrica acumulada para estos cultivos (ver, Figura 3). Los resultados históricos de las anteriores ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraces de agitación muestran que la productividad se mantuvo a un nivel constante (600 U/l) desde la fase media de la recogida hasta el final de cada ejecución de procedimiento de cultivo celular. No se observó un aumento en la concentración de células viables para ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una frecuencia de agitación de 140 RPM durante fase media de la recogida, lo que indica que el pico de productividad fue el resultado de un aumento en la productividad celular específica.

Metabolismo del cultivo

El metabolismo celular se controló en cada ejecución del procedimiento de cultivo celular a través de la medición de las concentraciones de glucosa, lactato, glutamina y glutamato en el medio gastado. La velocidad de consumo de glucosa (Figura 4) y la velocidad de producción de lactato (Figura 5) se calcularon a partir de la concentración de glucosa y lactato presente en los medios gastados y las muestras de medios de alimentación. En general, tanto el consumo de glucosa como la producción de lactato se corroboraron con el perfil de crecimiento de células en cada ejecución del procedimiento de cultivo celular (Figura 1). Los períodos más dinámicos del cultivo ocurrieron en dos etapas de cultivo diferentes: i) en el que la proliferación celular se produjo en la fase de crecimiento (con el medio que contiene suero), y ii) fase media a tardía de recogida, cuando se produjo un período de recambio, y se observó un aumento de la densidad de células viables y la actividad metabólica. Se observaron una velocidad de consumo de glucosa y una velocidad de producción de lactato ligeramente mayores en las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas utilizando una frecuencia de agitación de 140 RPM, en comparación con las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación durante la fase media de la recogida (Figura 4 y 5). Este fue también cuando las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una frecuencia de agitación de 140 RPM mostraron una productividad más alta que las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación. Se observaron tendencias comparables para la velocidad de consumo de glutamina (Figura 6) y la velocidad de

producción de glutamato para las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación utilizando una frecuencia de agitación de 140 RPM y las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación.

5 *pH, pCO₂ y pO₂ del cultivo*

Se monitorizaron el pH, pCO₂ y pO₂ del cultivo en cada ejecución del procedimiento de cultivo celular utilizando un analizador de gases en sangre (BGA) durante el muestreo. Las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas con una frecuencia de agitación de 140 RPM y las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraces de agitación tenían perfiles comparables de pH, pCO₂ y pO₂ (Figuras 7-9) en la mayor parte de la duración de las ejecuciones del procedimiento. Los perfiles de pH (Figura 7) se corroboraron con la inmersión en la concentración de células viables que se produce en las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas utilizando una frecuencia de agitación de 140 RPM y las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación durante el período de transición. Los perfiles de pCO₂ (Figura 9) muestran que un nivel de pCO₂ entre 30-40 mmHg se mantuvo en cada ejecución del procedimiento de cultivo celular, que se correlaciona con la configuración del 5% de CO₂ de la incubadora.

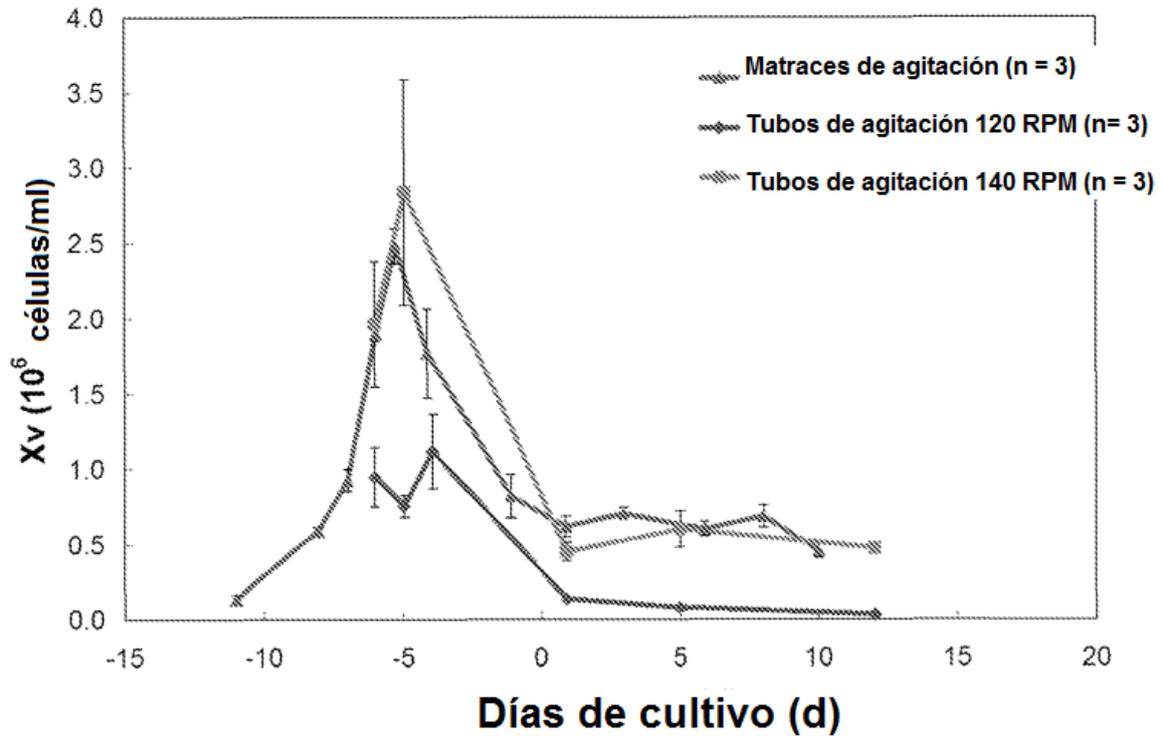
En suma, el modelo de cultivo con tubo de agitación con realimentación por lotes de ejemplo descrito en este ejemplo se demostró que era un modelo aceptable para la producción a gran escala de la alfa-galactosidasa A humana recombinante usando un biorreactor de 2000 litros. La ejecución del procedimiento de cultivo celular con tubo de agitación de ejemplo descrito en el Ejemplo demostró un crecimiento celular y de productividad similares a los de una ejecución del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación que se demostró previamente que era un modelo aceptable para la producción a gran escala de la alfa-galactosidasa A humana recombinante utilizando un biorreactor de 2.000 litros.

En las presentes condiciones experimentales (por ejemplo, el uso de un diámetro específico de la aspa (órbita)) se demostró que la agitación de los cultivos en tubo de agitación a una frecuencia de 140 RPM lograba una densidad de células de transición objetivo de 2-3x10⁶ células/ml (una densidad celular de 2,86 x 10⁶ células/ml lograda en el séptimo día de la fase de crecimiento), y mantenía un perfil de crecimiento similar al conseguido usando las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación de control. A diferencia de las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación, las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas utilizando una frecuencia de agitación de 140 RPM fueron capaces de producir un segundo pico de productividad durante la fase media de la recogida. Como no se observó un aumento de la densidad de células viables durante este período en las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación, el incremento de la productividad se atribuye a un aumento en la productividad celular específica. Los cambios en el metabolismo del cultivo son consistentes con estos hallazgos, tanto con el consumo de glucosa como con la producción de lactato durante la fase media de la recogida que se midió que era mayor en las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizada utilizando una frecuencia de agitación de 140 RPM que en las ejecuciones del procedimiento de cultivo celular con matraz de agitación. Se encontró que otras mediciones, tales como el pH, pCO₂ y pO₂ del cultivo, eran similares entre las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con tubo de agitación realizadas usando una frecuencia de agitación de 140 rpm y las ejecuciones del procedimiento de cultivo de células con matraz de agitación.

REIVINDICACIONES

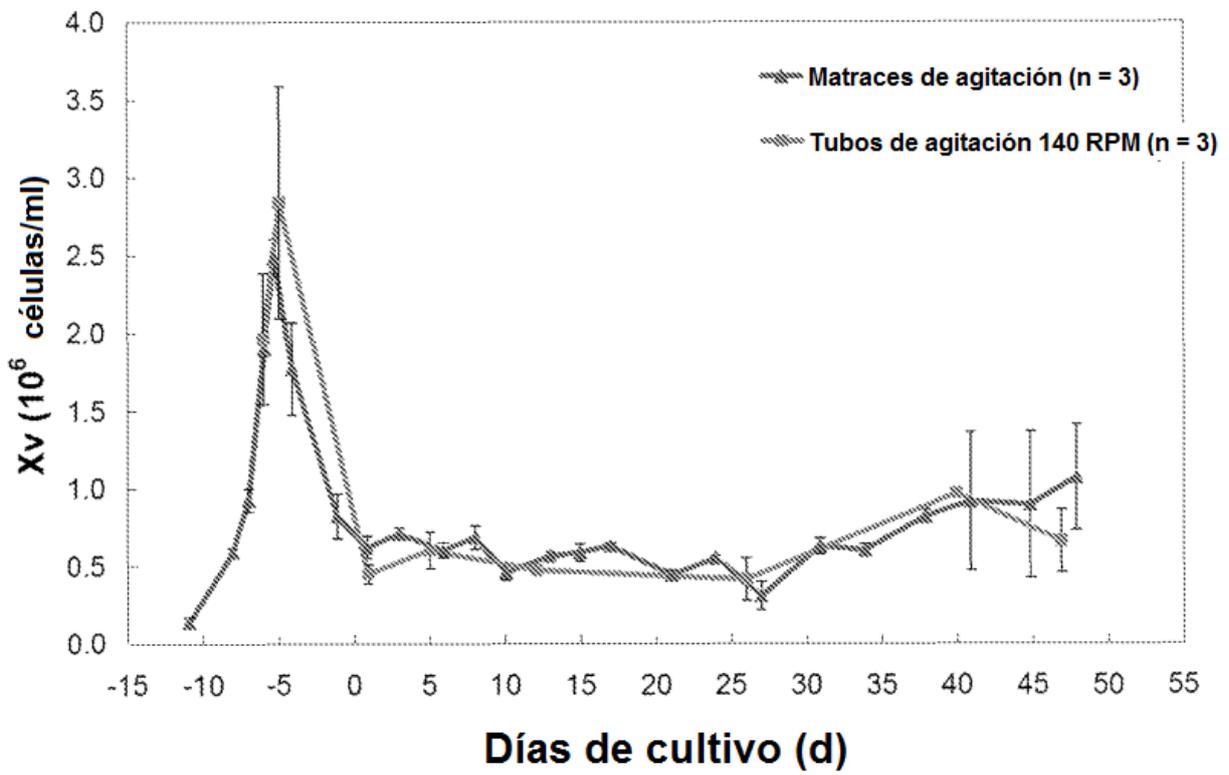
1. Procedimiento de cultivo de una célula de mamífero adherente, comprendiendo el procedimiento:
 5 proporcionar un tubo de agitación que contiene una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido, en el que el primer medio de cultivo líquido ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l;
 10 incubar el tubo de agitación durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C y con una agitación de rotación de aproximadamente 120 revoluciones por minuto (RPM) a aproximadamente 150 RPM, preferiblemente 140 RPM; y
 15 después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, extraer de forma continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido y añadir al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primero y segundo volúmenes son aproximadamente iguales.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la célula de mamífero adherente contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que:
 20 la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido se realizan periódicamente; o
 el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido se incrementan con el tiempo.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del periodo de tiempo, en cada periodo de 24 horas, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido es de aproximadamente 30% a aproximadamente 95% del volumen del primer medio de cultivo líquido.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el tubo de agitación se incuba en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.
6. Procedimiento de cultivo de una célula de mamífero adherente, comprendiendo el procedimiento:
 35 (a) proporcionar un tubo de agitación que contenía una célula de mamífero adherente dispuesta en un primer medio de cultivo líquido que ocupa de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% del volumen del tubo de agitación y contiene una pluralidad de microportadores en una concentración de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 15,0 g/l;
 (b) incubar el tubo de agitación durante un primer periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C con una agitación de rotación de 130 revoluciones por minuto (RPM) a 150 RPM, preferiblemente 140 RPM, y después de aproximadamente las primeras 48 a 96 horas del primer periodo de tiempo,
 40 en cada periodo de 24 horas posterior,
 (i) extraer de manera continua o periódicamente un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de microportadores desde el tubo de agitación, en el que el primer volumen es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 95 % del volumen del primer medio de cultivo líquido; y
 45 (ii) añadir al tubo de agitación un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en el que el primer y segundo volúmenes son aproximadamente iguales;
 (c) incubar el tubo de agitación después de que la concentración de células de mamífero adherentes alcance aproximadamente la densidad celular objetivo durante un segundo periodo de tiempo de aproximadamente 2 días a aproximadamente 7 días, a una temperatura de aproximadamente 32°C a aproximadamente 39°C con agitación rotatoria, y en cada un periodo de 24 horas, realizar las etapas (b)(i) y (b)(ii), en el que el primer y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en la etapa (b) son de un tipo sustancialmente diferente de los utilizados en la etapa (c); y
 50 (d) incubar el tubo de agitación durante un tercer periodo de tiempo mayor de 2 días, a una temperatura de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C con agitación rotatoria, y en cada periodo de 24 horas, realizar las etapas (b)(i) y (b)(ii), en el que el primero y segundo medios de cultivo líquidos utilizados en la etapa (c) son del mismo tipo que los utilizados en la etapa (d).
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la célula de mamífero adherente contiene un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante.
8. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la extracción del primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la adición del segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido en uno o más del primer periodo de tiempo, el segundo periodo de tiempo y el tercer periodo de tiempo se realizan periódicamente.

9. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 6, en el que el tubo de agitación tiene un volumen de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 100 ml; o el volumen del primer medio de cultivo líquido es de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml.
- 5 10. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el primer volumen del primer medio de cultivo líquido extraído y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido en uno o más del primer período de tiempo, el segundo período de tiempo y el tercer período de tiempo es de aproximadamente el 70% del volumen del primer medio de cultivo líquido.
- 10 11. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el tubo de agitación se incuba en (b), (c) y (d) en un ángulo de reactor de aproximadamente 25 grados a aproximadamente 90 grados desde la horizontal.
12. Procedimiento, según la reivindicación 2, que comprende además:
15 recuperar la proteína recombinante a partir de la célula de mamífero adherente o a partir del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos.
13. Procedimiento, según la reivindicación 7, que comprende además:
20 (e) recuperar la proteína recombinante a partir de la célula adherente de mamíferos o a partir del primer y/o segundo medios de cultivo líquidos utilizados durante el primer, segundo y/o tercer períodos de tiempo.
14. Procedimiento, según la reivindicación 2, que comprende además:
25 detectar la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo; y
comparar la cantidad de proteína recombinante presente en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o
segundo medios de cultivo con un nivel de referencia de la proteína recombinante, opcionalmente, un nivel de
proteína recombinante producida usando un procedimiento de cultivo diferente.
15. Procedimiento, según la reivindicación 2, que comprende además:
30 detectar la proteína recombinante en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o segundo medios de cultivo;
comparar la cantidad de proteína recombinante presente en la célula de mamífero adherente o en el primer y/o
segundo medios de cultivo con un nivel de referencia de la proteína recombinante producida mediante un
procedimiento diferente; e
35 identificar y extraer o alterar en un procedimiento de fabricación cualquiera de los componentes de cultivo o de los
parámetros que están asociados con una disminución en la cantidad de proteína recombinante producida en
comparación con el nivel de referencia, o identificar y añadir a un procedimiento de fabricación cualquiera de los
componentes de cultivo o parámetros que están asociados con un aumento en la cantidad de proteína recombinante
producida en comparación con el nivel de referencia.



Días de cultivo (d)

Figura 1



Días de cultivo (d)

Figura 2

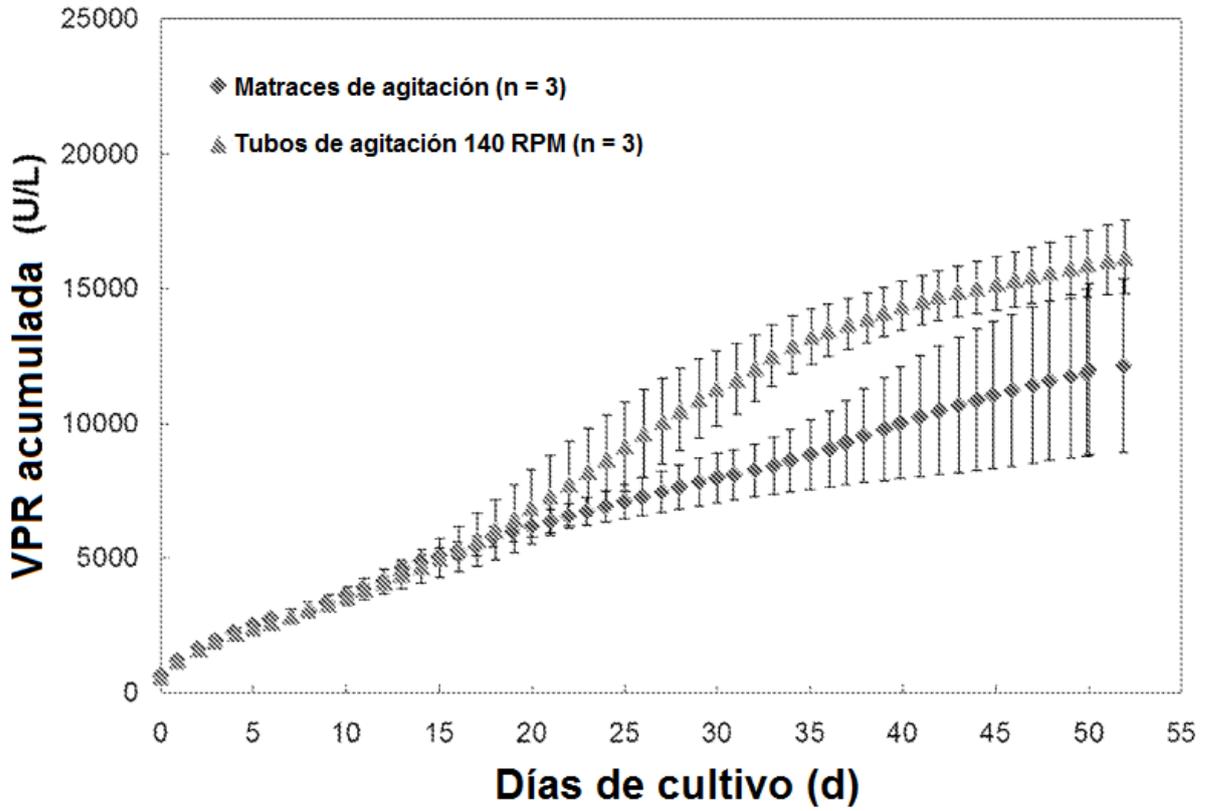


Figura 3

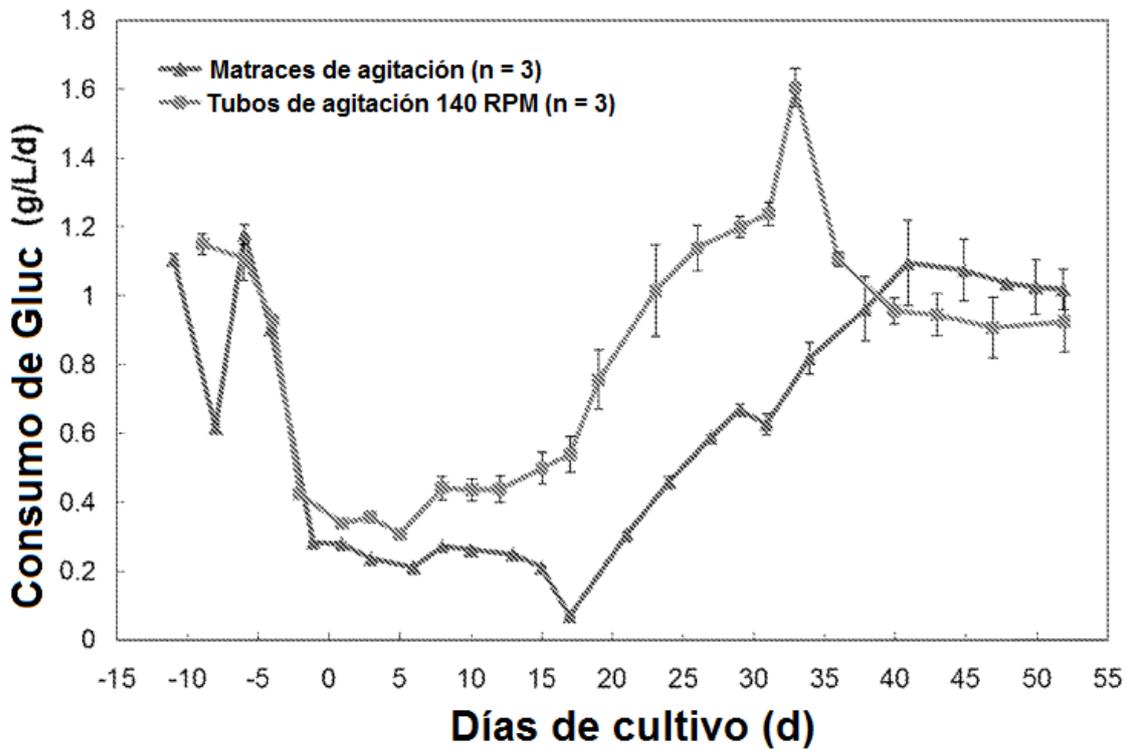


Figura 4

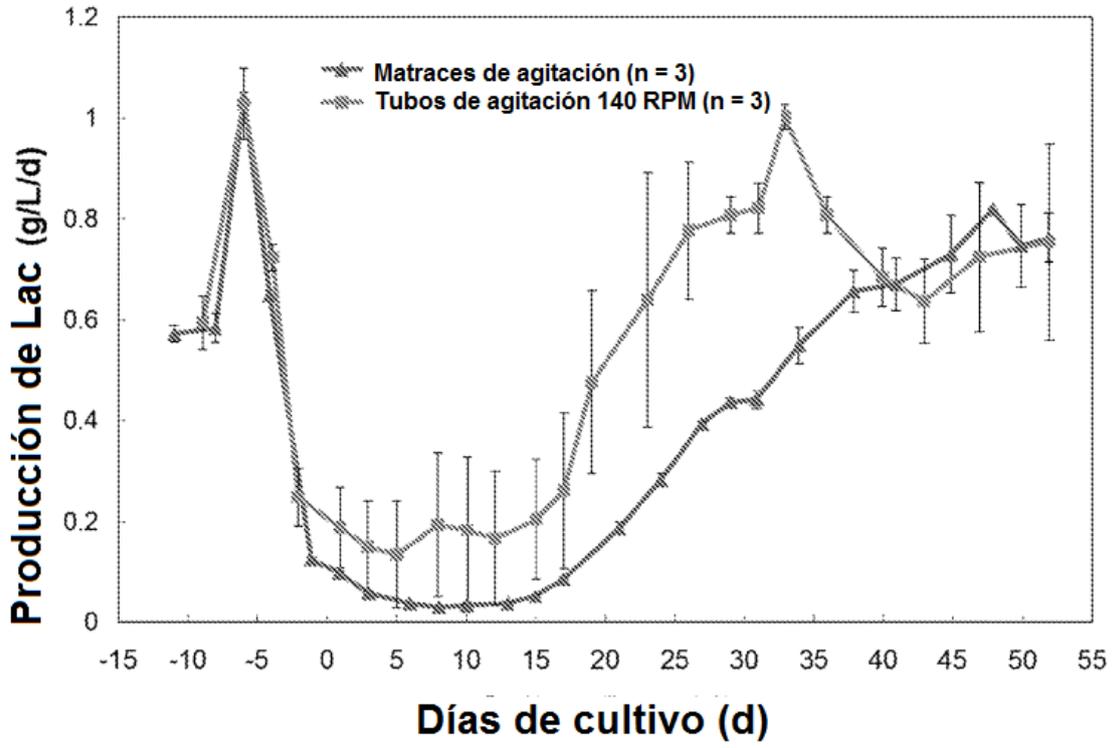


Figura 5

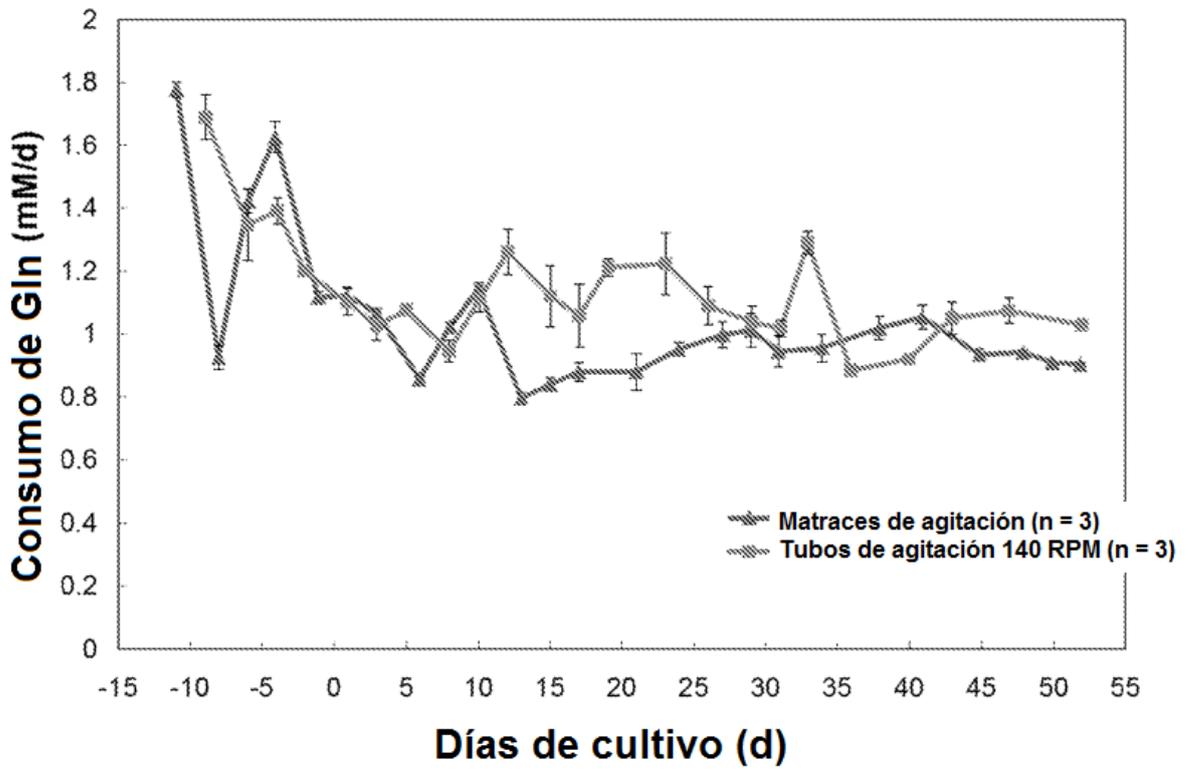


Figura 6

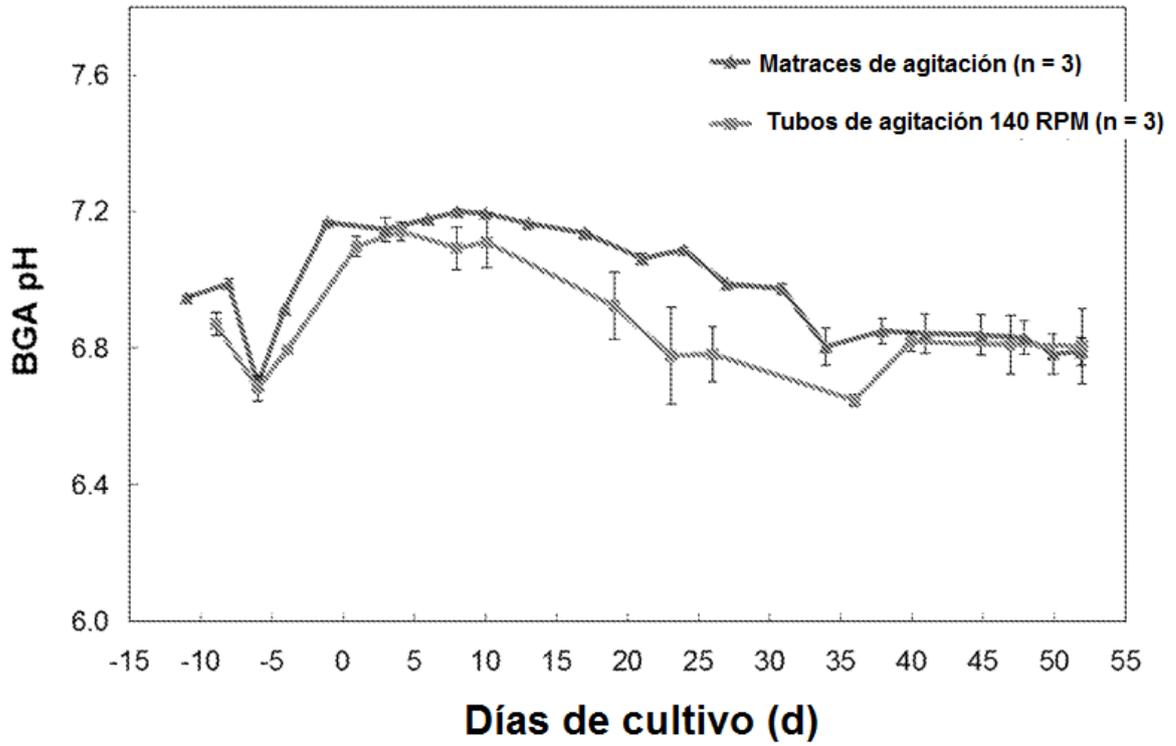


Figura 7

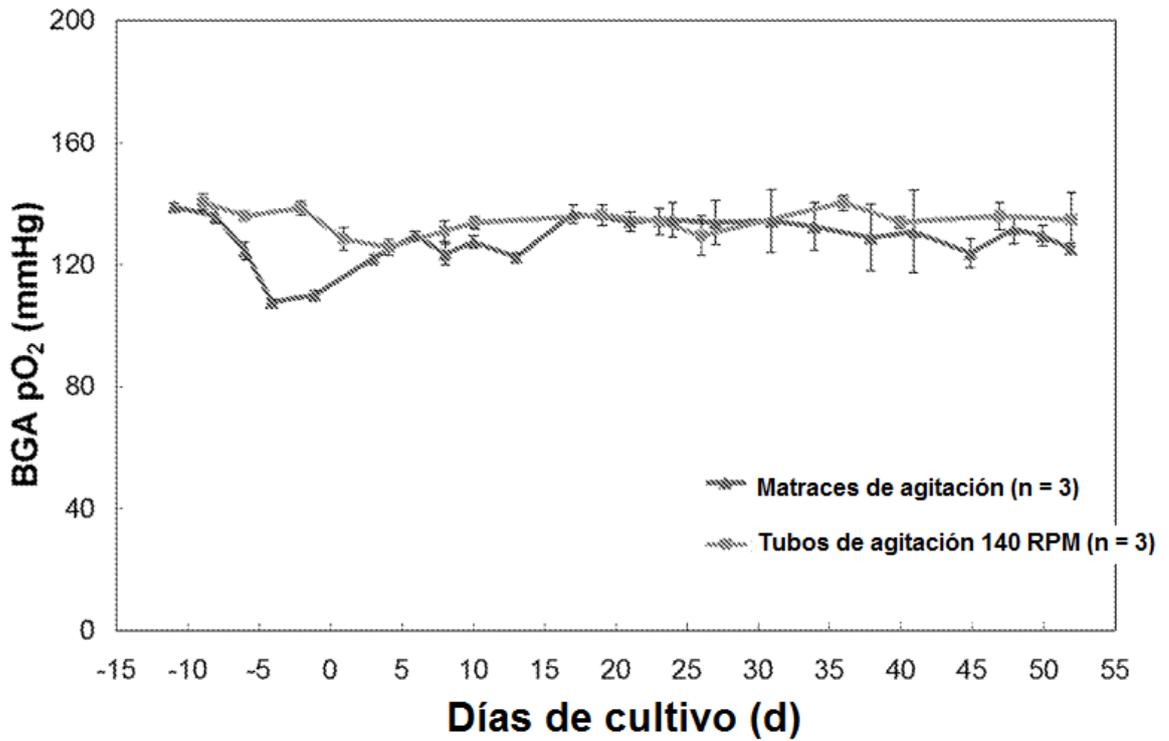


Figura 8

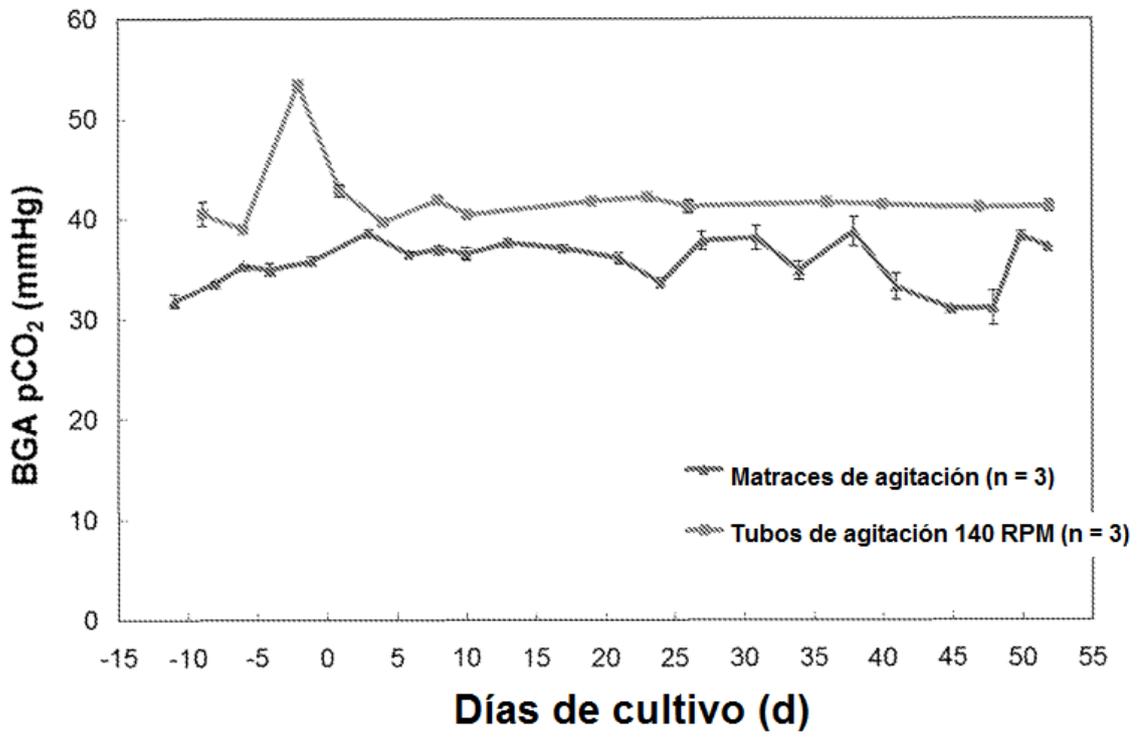


Figura 9