

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 876**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2015 PCT/US2015/055277**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16061066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2015 E 15794670 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3207121**

54 Título: **Métodos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala**

30 Prioridad:

15.10.2014 US 201462064457 P

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

16.07.2019

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
121 Seaport Boulevard
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**MALANSON, HUNTER, F. y
JALURIA, PRATIK**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 719 876 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala

5 Antecedentes

10 Eculizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente al componente 5 de complemento (C5) humano. Eculizumab ha sido aprobado por la FDA para tratar la hemoglobinuria paroxística nocturna y el síndrome hemolítico urémico atípico. Eculizumab se produce normalmente usando un cultivo de células de mamífero discontinuo-alimentado a gran escala (10.000 l).

15 Los modelos de cultivo celular de producción a pequeña escala proporcionan un medio para probar los medios de cultivo o los componentes del medio y/o las líneas celulares de mamífero antes de su uso en un cultivo celular de producción a gran escala. Los modelos de cultivo celular de producción a pequeña escala también proporcionan un medio para evaluar la contaminación de los medios de cultivo o los componentes del medio y/o las líneas celulares de mamífero antes de su uso en cultivos de producción a gran escala. Existe la necesidad de un modelo a pequeña escala del proceso de producción de eculizumab.

20 Sumario

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de un conjunto de parámetros de cultivo que permite la replicación precisa de un cultivo celular de producción a gran escala de eculizumab usando un cultivo celular discontinuo alimentado a pequeña escala. Por lo tanto, la presente memoria descriptiva incluye métodos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala usando un cultivo celular discontinuo alimentado a pequeña escala.

30 En el presente documento se proporcionan métodos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala en un cultivo a pequeña escala que incluye: proporcionar un biorreactor de 4 l a 10 l (tal como un biorreactor discontinuo alimentado) que contiene un primer medio de cultivo que ocupa entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 90 % de la capacidad del biorreactor y tiene una densidad celular inicial de entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células NS0/ml, conteniendo las células un ácido nucleico recombinante que codifica eculizumab; cultivar (tal como cultivar de manera discontinua alimentada) las células en el biorreactor durante al menos 8 días a de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 39 °C, a un nivel de dO_2 de entre aproximadamente el 14 % a aproximadamente el 16 % y una agitación rotatoria de entre aproximadamente 50 RPM y aproximadamente 70 RPM; mantener (por ejemplo, continuar) el cultivo discontinuo alimentado hasta que se alcanza una densidad celular de aproximadamente 13×10^5 a aproximadamente 20×10^5 células/ml, después; (1) añadir de manera continua una alimentación de medio de cultivo al primer medio de cultivo durante un periodo de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 150 horas y de aproximadamente 40 a 60 horas después del inicio de la adición continua de la alimentación de medio de cultivo y (2) añadir de manera continua una solución de base alcalina al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 90 horas a aproximadamente 105 horas.

45 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, uno o los dos del primer medio de cultivo y el medio de cultivo de alimentación incluyen una seroalbúmina bovina (BSA) procesada. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la BSA procesada es BSA de Nueva Zelanda. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la densidad celular inicial es de entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml y aproximadamente $6,0 \times 10^6$ células/ml. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el biorreactor tiene una capacidad de entre aproximadamente 4 l a aproximadamente 6 l.

50 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el primer medio de cultivo ocupa entre aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 88 % de la capacidad del biorreactor. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el cultivo discontinuo alimentado se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 36 °C a aproximadamente 37 °C. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la agitación rotatoria es de entre aproximadamente 55 RPM y aproximadamente 65 RPM. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la densidad celular diana es de entre aproximadamente 17×10^5 células/ml y aproximadamente 19×10^5 células/ml.

60 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la solución de base alcalina se añade de manera continua al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 92 horas a aproximadamente 100 horas. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el biorreactor contiene 4,2 l del primer medio de cultivo y la solución de base alcalina se añade de manera continua al primer medio de cultivo a una velocidad de entre aproximadamente 1,65 ml/hora a aproximadamente 1,85 ml/hora. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la solución de base alcalina incluye entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,85 M de carbonato de sodio y entre

aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,6 de bicarbonato de sodio.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se añade de manera continua un solo medio de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se añaden de manera continua dos medios de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se añaden de manera continua cada uno de los dos medios de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo a una velocidad de entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ a aproximadamente 35 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se añaden de manera continua cada uno de los dos medios de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo a una velocidad de entre aproximadamente 20 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el medio de cultivo de alimentación se añade de manera continua al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 130 horas a aproximadamente 135 horas.

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además añadir un bolo de una solución de lípido que incluye ácido linoleico, ácido oleico y colesterol al primer medio de cultivo en un punto de tiempo cuando las células alcanzan una densidad de aproximadamente 13×10^5 células/ml a aproximadamente 20×10^5 células/ml. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se añade la solución de lípido a una dosis de aproximadamente 1 ml por 1 l del primer medio de cultivo.

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además añadir antiespumante al primer medio de cultivo durante el cultivo. Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen recoger el eculizumab recombinante producido en la etapa de cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la recolección incluye lisar las células. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el eculizumab recombinante se recoge de uno o ambos del primer medio de cultivo y el medio de cultivo de alimentación.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, eculizumab incluye una cadena pesada que incluye o consiste en la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que incluye o consiste en la SEQ ID NO: 2.

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además evaluar uno o más parámetros del cultivo celular seleccionados entre el grupo que consiste en: crecimiento celular, porcentaje de viabilidad celular, densidad de células viables, el consumo de glucosa aeróbico, título de eculizumab, tasa de productividad específica, tasa de productividad volumétrica, producción de lactato y calidad de eculizumab. Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además comparar los uno o más parámetros de cultivo celular determinados con los mismos uno o más parámetros de cultivo celular en un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala es un cultivo celular de producción de eculizumab de 10.000 l.

Como se usa en el presente documento, el término "un", "una", "uno" o "pluralidad" antes de un nombre representa uno o más del nombre particular. Por ejemplo, la frase "una célula de mamífero" representa "una o más células de mamífero".

La expresión "BSA procesada" o "seroalbúmina bovina procesada" se refiere a una seroalbúmina bovina que se ha producido mediante un método descrito en el presente documento. Por ejemplo, un método usado para producir una BSA procesada no incluye calentar una solución que incluye la seroalbúmina, añadir un estabilizante a una solución que incluye la seroalbúmina y eliminar por precipitación las impurezas de una solución que incluye una seroalbúmina liofilizada reconstituida. En algunos ejemplos, el método usado para producir BSA procesada comienza proporcionando plasma de un bóvido. Los métodos no limitantes que pueden usarse para producir una BSA procesada se describen en el presente documento.

La expresión "BSA NZ procesada" o "BSA de Nueva Zelanda procesada" se refiere a BSA procesada como se define en el presente documento que incluye una seroalbúmina de una especie de bóvido y criada en Nueva Zelanda. Un ejemplo no limitante de una BSA NZ procesada es la BSA NZ de MP Biomedicals.

La expresión "cultivo celular de producción de eculizumab" se refiere a un cultivo a gran escala usado para producir eculizumab recombinante principalmente para su uso en la fabricación de una composición farmacéutica. Un cultivo celular de producción puede tener un volumen de al menos 500 l, por ejemplo, aproximadamente o al menos 1.000 l, aproximadamente o al menos 2.000 l, aproximadamente o al menos 3.000 l, aproximadamente o al menos 4.000 l, aproximadamente o al menos 5.000 l, aproximadamente o al menos 6.000 l, aproximadamente o al menos 7.000 l, aproximadamente o al menos 8.000 l, aproximadamente o al menos 9.000 l o aproximadamente o al menos 10.000 l.

La expresión "biorreactor de producción", como se usa en el presente documento, se refiere a un vaso adecuado para incubar un cultivo celular de mamífero en condiciones suficientes para el cultivo de las células de mamífero en el

cultivo y la producción de un producto de proteína recombinante por las células de mamífero en el cultivo. Se conocen en la técnica ejemplos de biorreactores de producción.

5 La expresión "célula de mamífero" se refiere a cualquier célula de o procedente de cualquier mamífero que incluye, por ejemplo, un ser humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca, un hámster o un conejo. En algunas realizaciones, la célula de mamífero puede ser una célula inmortalizada, una célula diferenciada o una célula no diferenciada.

10 La expresión "sustancialmente libre", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que se encuentra al menos aproximadamente un 90 % libre o aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % libre de una sustancia específica (por ejemplo, proteínas contaminantes de un medio de cultivo líquido o del lisado de una célula de mamífero).

15 La expresión "cultivo" o "cultivo celular", como se usa en el presente documento, se refiere al mantenimiento o crecimiento de una célula de mamífero en un medio de cultivo líquido en un conjunto de condiciones físicas controlado.

20 La expresión "medio de cultivo líquido" o "medio de cultivo" se refiere a un fluido que contiene nutrientes suficientes para permitir que una célula de mamífero crezca en el medio *in vitro*. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido puede incluir 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, cinc, selenio y otros oligoelementos metálicos necesarios y bicarbonato de sodio. Un medio de cultivo líquido puede incluir 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 químicamente definido). Un medio de cultivo líquido puede contener oligoelementos metálicos, una hormona de crecimiento de mamífero y/o un factor de crecimiento de mamífero. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos y se conocen en la técnica ejemplos adicionales y se encuentran disponibles comercialmente.

30 La expresión "medio de cultivo líquido libre de componentes de origen animal" significa un medio de cultivo líquido que no contiene ningún componente (por ejemplo, proteínas o suero) procedentes de un animal.

La expresión "medio de cultivo líquido aséptico" se refiere a un medio de cultivo líquido que no contiene suero animal.

35 La expresión "medio de cultivo líquido con suero añadido" se refiere a un medio de cultivo líquido que incluye suero animal.

40 La expresión "medio de cultivo líquido químicamente definido" se refiere a un medio de cultivo líquido en el que se conocen sustancialmente todos los componentes químicos. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido químicamente definido no contiene suero fetal bovino, seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana, ya que estas preparaciones contienen normalmente una mezcla compleja de albúminas y lípidos.

45 La expresión "medio de cultivo líquido libre de proteínas" significa un medio de cultivo líquido que no contiene proteínas (por ejemplo, cualquier proteína detectable).

50 "Agitación rotatoria" es un término bien conocido en la técnica y se refiere a la agitación de un cultivo en un biorreactor (por ejemplo, un biorreactor de producción) de un modo generalmente circular, por ejemplo, en sentido horario o antihorario, con objeto, por ejemplo, de aumentar la concentración de O₂ disuelto en el biorreactor. La agitación puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, un instrumento que mueve el cultivo con un movimiento circular o elipsoidal, tal como un rotor. Se conocen en la técnica dispositivos ejemplares que pueden usarse para llevar a cabo la agitación rotatoria y se encuentran disponibles comercialmente.

55 El término "purificar" o "purificación", en ciertos contextos, significa aislar al menos parcialmente una proteína recombinante de uno o más componentes (por ejemplo, ADN, ARN u otras proteínas) presentes en el medio de cultivo líquido o el lisado de cultivo celular. Puede especificarse el alcance de la purificación, tal como al menos o aproximadamente un 5 %, por ejemplo, al menos o aproximadamente un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o al menos o aproximadamente un 95 % a 99,9 % de pureza en peso. Se describen en el presente documento métodos no limitantes para purificar una proteína de un medio de cultivo líquido o de un lisado de células de mamífero y se conocen otros en la técnica.

60 La expresión "cultivo celular discontinuo alimentado" o "cultivo discontinuo alimentado" significa la adición incremental o continua de un medio de cultivo de alimentación (por ejemplo, medio de cultivo líquido o soluble) a un cultivo celular inicial sin una retirada sustancial o significativa de medio de cultivo líquido del cultivo celular. En algunos casos, el medio de cultivo de alimentación es el mismo que el primer medio de cultivo líquido presente al comienzo del periodo de cultivo. En otros casos, el medio de cultivo de alimentación es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido y/o se añade en forma de un polvo seco. En algunos ejemplos del cultivo discontinuo alimentado, se añaden

dos medios de cultivo de alimentación diferentes al cultivo celular inicial.

La "tasa de productividad específica" o "SPR", como se usa en el presente documento, se refiere a la masa o a la actividad enzimática de una proteína recombinante producida por célula de mamífero por día. La SPR para un anticuerpo recombinante se mide normalmente como masa/célula/día. La SPR para una enzima recombinante normalmente se mide como unidades/célula/día o (unidades/masa)/célula/día.

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

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente versada en la materia a la cual pertenece la presente invención. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, secuencias, entradas en bases de datos y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

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

25 Descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra la concentración media (líneas continuas) de lactato con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas finas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas gruesas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 2 es una gráfica que muestra la concentración media (líneas continuas) de sodio con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas finas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas gruesas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 3 es una gráfica que muestra el pH medio fuera de línea con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas finas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas gruesas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 4 es una gráfica que muestra la densidad media de células viables con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas finas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 5 es una gráfica que muestra la densidad media de células viables con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l cultivados usando los métodos descritos en el presente documento (líneas negras continuas finas) (n = 40). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 6 es una gráfica que muestra el porcentaje medio de viabilidad celular con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas finas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 7 es una gráfica que muestra el porcentaje medio de viabilidad celular con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l cultivados usando los métodos descritos en el presente documento (líneas negras continuas finas) (n = 40). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 8 es una gráfica que muestra el título de eculizumab con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas finas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 9 es una gráfica que muestra el título de eculizumab con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l cultivados usando los métodos descritos en el presente documento (líneas negras continuas finas) (n = 40). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 10 es una gráfica que muestra la concentración de glucosa con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l anteriores (líneas negras continuas finas). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

La figura 11 es una gráfica que muestra la concentración de glucosa con el paso del tiempo en cultivos celulares de producción de eculizumab de 10.000 l (líneas negras continuas gruesas) y cultivos a pequeña escala de eculizumab de 5 l cultivados usando los métodos descritos en el presente documento (líneas negras continuas finas) (n = 40). Las líneas discontinuas representan ± 1 desviación típica de los datos.

5

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan métodos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala en un cultivo celular a pequeña escala. Estos métodos incluyen: proporcionar un biorreactor de 2 l a 25 l (tal como un biorreactor discontinuo alimentado) que contiene un primer medio de cultivo que ocupa entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 90 % de la capacidad del biorreactor y tiene una densidad celular inicial de entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ y aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células NS0/ml, conteniendo las células un ácido nucleico recombinante que codifica eculizumab; cultivar (tal como cultivar de manera discontinua alimentada) las células en el biorreactor durante al menos 8 días a de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 39 °C, a un nivel de dO_2 de entre aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 % y una agitación rotatoria de entre aproximadamente 40 RPM y aproximadamente 80 RPM; mantener (por ejemplo, continuar) el cultivo discontinuo alimentado hasta que se alcanza una densidad celular de aproximadamente 10×10^5 a aproximadamente 25×10^5 células/ml, después; (1) añadir de manera continua una alimentación de medio de cultivo al primer medio de cultivo durante un periodo de aproximadamente 100 horas a aproximadamente 170 horas y de aproximadamente 5 a 80 horas después del inicio de la adición continua de la alimentación de medio de cultivo y (2) añadir de manera continua una solución de base alcalina al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 105 horas.

Se describen a continuación aspectos no limitantes de los métodos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala. Puede usarse cualquiera de los aspectos descritos más adelante en cualquier combinación o con cualquier otro elemento conocido en la técnica.

Biorreactores

Un biorreactor usado para cultivar el cultivo discontinuo alimentado en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede tener una capacidad de entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 25 l (por ejemplo, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 24 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 22 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 18 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 16 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 14 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 12 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 9 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 8 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 7 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 6 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 5 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 4 l, entre aproximadamente 2 l y aproximadamente 3 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 25 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 24 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 22 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 18 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 16 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 14 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 12 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 9 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 8 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 7 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 6 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 5 l, entre aproximadamente 3 l y aproximadamente 4 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 25 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 24 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 22 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 18 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 16 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 14 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 12 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 9 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 8 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 7 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 6 l, entre aproximadamente 4 l y aproximadamente 5 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 25 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 24 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 22 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 18 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 16 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 14 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 12 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 9 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 8 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 7 l, entre aproximadamente 5 l y aproximadamente 6 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 25 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 24 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 22 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 18 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 16 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 14 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 12 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 9 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 8 l, entre aproximadamente 6 l y aproximadamente 7 l, entre

aproximadamente 8 l y aproximadamente 14 l, de entre aproximadamente 8 l y aproximadamente 12 l, de entre aproximadamente 8 l y aproximadamente 10 l, de entre aproximadamente 8 l y aproximadamente 9 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 22 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 20 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 18 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 16 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 14 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 12 l, de entre aproximadamente 9 l y aproximadamente 10 l, de entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 22 l, de entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 20 l, de entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 18 l, de entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 16 l, de entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 14 l, de entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 12 l, de entre aproximadamente 12 l y aproximadamente 22 l, de entre aproximadamente 12 l y aproximadamente 20 l, de entre aproximadamente 12 l y aproximadamente 18 l, de entre aproximadamente 12 l y aproximadamente 16 l, de entre aproximadamente 12 l y aproximadamente 14 l, de entre aproximadamente 14 l y aproximadamente 22 l, de entre aproximadamente 14 l y aproximadamente 20 l, de entre aproximadamente 14 l y aproximadamente 18 l, de entre aproximadamente 14 l y aproximadamente 16 l, de entre aproximadamente 16 l y aproximadamente 22 l, de entre aproximadamente 16 l y aproximadamente 20 l, de entre aproximadamente 16 l y aproximadamente 18 l, de entre aproximadamente 18 l y aproximadamente 22 l, de entre aproximadamente 18 l y aproximadamente 20 l o de entre aproximadamente 20 l y aproximadamente 22 l).

Células NS0 y densidad celular inicial

Las células NS0 usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden contener un ácido nucleico recombinante que está integrado de manera estable en el genoma de las células NS0 y codifica eculizumab recombinante. En algunas realizaciones, el eculizumab recombinante se secreta por la célula de mamífero en el medio de cultivo líquido. En algunos casos, las células de mamífero cultivadas proceden de un cultivo de siembra. Más particularmente, el cultivo celular inicial es el resultado de un proceso de tren de siembra o un cultivo de otro biorreactor.

En ejemplos no limitantes de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la densidad celular de las células de mamífero presentes en el biorreactor al inicio del periodo de cultivo discontinuo alimentado (densidad celular inicial, tal como densidad de células viables inicial) es de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/ml, de aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/ml, de aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ a aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $6,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml, entre aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $3,0 \times 10^5$ células/ml o entre aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células/ml a aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ml.

Cultivo discontinuo alimentado

Tal como se conoce en la técnica, el cultivo discontinuo alimentado incluye la adición incremental (periódica) o continua de un medio de cultivo de alimentación a un cultivo celular inicial sin la retirada sustancial o significativa del primer medio de cultivo del cultivo celular. El cultivo celular en el cultivo discontinuo alimentado puede estar dispuesto en un biorreactor (por ejemplo, cualquiera de los biorreactores ilustrativos descritos en el presente documento). En algunos casos, el medio de cultivo de alimentación es el mismo que el primer medio de cultivo. El medio de cultivo de alimentación puede estar o bien en forma de un líquido o en forma de un polvo seco. En algunos ejemplos, el medio de cultivo de alimentación es una forma concentrada del primer medio de cultivo.

Por ejemplo, la adición del medio de cultivo de alimentación (de manera continua o periódica) puede producirse en un punto de tiempo que es de entre 6 horas y 7 días, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 2 días, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 1 día, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente

7 días, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 2 días, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 2 días, entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 7 días o entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días, tras iniciarse el periodo de cultivo.

En algunos ejemplos, se añaden (de manera continua o incremental) dos medios de cultivo de alimentación diferentes (por ejemplo, cualquiera de los medios de cultivo líquidos ejemplares descritos en el presente documento) durante el cultivo discontinuo alimentado. La cantidad o el volumen del primer medio de cultivo de alimentación y el segundo medio de cultivo de alimentación puede ser sustancialmente la misma o puede diferir. El primer medio de cultivo de alimentación puede estar en forma de un líquido y el segundo medio de cultivo de alimentación puede estar en forma de un sólido. En algunos ejemplos, los medios de cultivo de alimentación primero y segundo son medios de cultivo líquidos.

El cultivo discontinuo alimentado puede llevarse a cabo durante al menos 8 días (por ejemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 días). Por ejemplo, el cultivo discontinuo alimentado puede llevarse a cabo durante al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos 19 días o al menos 20 días. El medio de cultivo de alimentación (o el primer y el segundo medio de cultivo de alimentación) puede añadirse de manera continua o periódica.

Adición continua de un medio de cultivo de alimentación

Cuando el medio de cultivo de alimentación se añade de manera continua, la velocidad de adición del medio de cultivo de alimentación puede mantenerse constante o puede aumentarse (por ejemplo, aumentarse de manera uniforme) a lo largo del periodo de cultivo. Una adición continua del medio de cultivo de alimentación puede comenzar en un punto de tiempo específico durante el periodo de cultivo (por ejemplo, cuando las células alcanzan una densidad celular diana, por ejemplo, cualquiera de las densidades celulares diana ejemplares descritas en el presente documento). En algunas realizaciones, la adición continua de medio de cultivo de alimentación puede iniciarse en el día 2, el día 3, el día 4, el día 5, el día 6 o el día 7 del periodo de cultivo. En el presente documento se describen volúmenes y velocidades de adición ejemplares de un medio de cultivo de alimentación (por ejemplo, un primer y un segundo medio de cultivo de alimentación líquido).

En algunas realizaciones, se añade de manera continua al cultivo celular un solo medio de cultivo de alimentación líquido o se añaden un primero y un segundo medio de cultivo de alimentación líquido. La velocidad de adición del medio de cultivo de alimentación líquido individual o la velocidad de adición de cada uno del primero y el segundo medio de cultivo de alimentación líquido puede ser de entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 160 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ (por ejemplo, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 150 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 140 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 130 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 120 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 110 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 100 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 90 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 80 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 75 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 70 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 65 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 60 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 55 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 50 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 45 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 40 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 35 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 30 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 20 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 160 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 150 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 140 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 130 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 120 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 110 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 100 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 90 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y aproximadamente 80 $\mu\text{l}/\text{minuto}$, entre

diana que aumentan a lo largo del periodo de cultivo). En algunas realizaciones, la cantidad de medio de cultivo de alimentación añadida puede aumentar progresivamente entre la primera adición incremental de medio de cultivo de alimentación y las adiciones posteriores de medio de cultivo de alimentación. El volumen total de medio de cultivo de alimentación añadido al cultivo a lo largo del periodo de cultivo puede ser cualquiera de los volúmenes totales
5 ejemplares de medio de cultivo de alimentación descritos en el presente documento.

Medio de cultivo

Se conocen en la técnica medios de cultivo líquidos que pueden usarse en la etapa de cultivo. El medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer medio de cultivo y/o el medio de cultivo de alimentación y uno o más del primer medio de cultivo, el primer medio de cultivo de alimentación y el segundo medio de cultivo de alimentación) puede complementarse con un suero de mamífero (por ejemplo, suero fetal de ternero o suero bovino, por ejemplo, suero bovino de Nueva Zelanda) y/o una hormona del crecimiento o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico). Como alternativa o además, el medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer
10 medio de cultivo y/o el medio de cultivo de alimentación y uno o más del primer medio de cultivo, el primer medio de cultivo de alimentación y el segundo medio de cultivo de alimentación) puede ser un medio de cultivo líquido químicamente definido, un medio de cultivo líquido libre de componentes de origen animal, un medio de cultivo líquido asérico o un medio de cultivo líquido que contiene suero. El medio de cultivo líquido (por ejemplo, el primer medio de cultivo y/o el medio de cultivo de alimentación y uno o más del primer medio de cultivo, el primer medio de cultivo y el
15 segundo medio de cultivo) puede incluir, por ejemplo, una seroalbúmina bovina procesada. Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos químicamente definidos, medios de cultivo líquidos libres de componentes de origen animal, medios de cultivo líquidos aséricos y medios de cultivo líquidos que contienen suero se encuentran disponibles comercialmente.

Un medio de cultivo líquido contiene normalmente 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 necesarios a bajas concentraciones, ácidos grasos libres y/u oligoelementos. Si se desea, el medio de cultivo líquido puede 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,
20 magnesio y fosfato), nucleósidos y bases (por ejemplo, adenosina, timidina e hipoxantina), hidrolizados de proteínas y tejidos y/o cualquier combinación de estos u otros aditivos.

Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo que pueden ser útiles en los métodos descritos en el presente documento 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 Ex-cell 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 métodos incluyen, pero sin limitación, hidrolizados químicamente definidos (CD), por ejemplo, peptona CD, polipéptidos CD (dos o más aminoácidos) y factores de crecimiento CD. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de medios de cultivo líquidos y de componentes del medio.
35

Los medios de cultivo usados en el cultivo de las células de mamífero pueden tener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5 (por ejemplo, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,5 y
40 aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,6 y
45 aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,8 y
50 aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 7,0 y
55 aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,4 o entre aproximadamente 7,3 y aproximadamente 7,5).

Los expertos en la materia apreciarán que el medio de cultivo líquido usado en el cultivo puede ser igual o puede
60

cambiar durante el periodo de cultivo (por ejemplo, el primer medio de cultivo y el medio de cultivo de alimentación o el primer medio de cultivo y el primero y/o segundo medio de cultivo de alimentación pueden ser del mismo tipo de medio o de diferentes tipos de medio).

- 5 En algunas realizaciones, el medio de cultivo añadido a un cultivo discontinuo alimentado puede ser una composición sólida. Se conocen en la técnica ejemplos de medios de cultivo sólidos que pueden añadirse a un cultivo discontinuo alimentado.

10 Cualquiera de los medios de cultivo en los métodos descritos en el presente documento puede incluir una BSA procesada. Una BSA procesada es una seroalbúmina bovina que se ha producido mediante un método descrito en el presente documento. Por ejemplo, un método para producir una BSA procesada no incluye calentar una solución que incluye la seroalbúmina, añadir un estabilizante a una solución que incluye la seroalbúmina y eliminar por precipitación las impurezas de una solución que incluye una seroalbúmina liofilizada reconstituida. Un método para producir una BSA procesada puede comenzar con una etapa de proporcionar plasma bovino. Una BSA procesada puede ser una BSA procesada mediante un método que incluye, por ejemplo, las etapas de proporcionar plasma bovino, desalar el plasma, filtrar el plasma usando ultrafiltración, precipitar las euglobulinas del plasma, filtrar el plasma para retirar las euglobulinas precipitadas, llevar a cabo una cromatografía de intercambio iónico con el plasma para proporcionar un eluato que comprende seroalbúmina e inmunoglobulinas, precipitar las inmunoglobulinas del eluato usando precipitación con sulfato de amonio, retirar las inmunoglobulinas precipitadas del eluato, concentrar y criodesecar el eluato para producir un material liofilizado que comprende seroalbúmina y opcionalmente, reconstituir el material liofilizado en una solución. Un ejemplo no limitante de una BSA procesada es la BSA NZ de MP Biomedicals.

25 Cualquiera de los medios de cultivo usados en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir 0,1 g/l o más (por ejemplo, al menos 0,2 g/l, al menos 0,3 g/l, al menos 0,4 g/l, al menos 0,5 g/l, al menos 0,6 g/l, al menos 0,7 g/l, al menos 0,8 g/l, al menos 0,9 g/l, al menos 1,0 g/l, al menos 1,1 g/l, al menos 1,2 g/l, al menos 1,3 g/l, al menos 1,4 g/l, al menos 1,5 g/l, al menos 1,6 g/l, al menos 1,7 g/l, al menos 1,8 g/l, al menos 1,9 g/l, al menos 2,0 g/l, al menos 2,1 g/l, al menos 2,2 g/l, al menos 2,3 g/l, al menos 2,4 g/l, al menos 2,5 g/l, al menos 2,6 g/l, al menos 2,7 g/l, al menos 2,8 g/l, al menos 2,9 g/l o al menos 3,0 g/l) de BSA procesada (tal como BSA NZ procesada). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el medio de cultivo que contiene BSA

30 procesada puede contener entre aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3,0 g/l (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,9 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,8 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,7 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,6 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,4 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,3 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,2 g/l, entre

35 aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,1 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 2,0 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,9 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,8 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,7 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,6 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,5 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,4 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,3 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,2 g/l, entre

40 aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,1 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 1,0 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,9 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,8 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,7 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,6 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,5 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,4 g/l, entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 0,3 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 3,0 g/l, entre

45 aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,9 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,8 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,7 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,6 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,4 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,3 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,2 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,1 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 2,0 g/l, entre

50 aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,9 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,8 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,7 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,6 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,5 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,4 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,3 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,2 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,1 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,0 g/l, entre

55 aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 0,9 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 0,8 g/l, entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 0,7 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 3,0 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,9 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,8 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,7 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,6 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,4 g/l, entre

60 aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,3 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,2 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,1 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 2,0 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,9 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,8 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,7 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,6 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,5 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,4 g/l, entre

65 aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,3 g/l, entre aproximadamente 1,0 g/l y aproximadamente 1,2 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 3,0 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,9 g/l, entre

aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,8 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,7 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,6 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,4 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,3 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,2 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,1 g/l, entre
 5 aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 2,0 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 1,9 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 1,8 g/l, entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 1,7 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 3,0 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,9 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,8 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,7 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,6 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,5 g/l, entre
 10 aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,4 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,3 g/l, entre aproximadamente 2,0 g/l y aproximadamente 2,2 g/l, entre aproximadamente 2,5 g/l y aproximadamente 3,0 g/l, entre aproximadamente 2,5 g/l y aproximadamente 2,9 g/l, entre aproximadamente 2,5 g/l y aproximadamente 2,8 g/l o entre aproximadamente 2,5 g/l y aproximadamente 2,7 g/l) de BSA procesada.

15 El medio de cultivo que incluye 0,1 g/l o más de BSA procesada puede ser el primer medio de cultivo, puede ser tanto el primer medio de cultivo como el medio de cultivo de alimentación o puede ser uno o más del primer medio de cultivo, el primer medio de cultivo de alimentación y el segundo medio de cultivo de alimentación. El cultivo discontinuo alimentado en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir el uso de dos medios de cultivo de alimentación diferentes, incluyendo uno o ambos de los dos medios de cultivo de alimentación diferentes
 20 0,1 g/l o más de BSA procesada.

Como es bien sabido en la técnica, puede producirse un medio de cultivo que contiene BSA procesada añadiendo una cantidad suficiente de BSA procesada (en forma sólida o como una solución) a un medio de cultivo líquido para lograr una concentración final deseada de BSA procesada en el medio de cultivo líquido.

25 En algunas realizaciones, el primer medio de cultivo contiene una solución de lípido (incluyendo ácido oleico, ácido linoleico y colesterol) a una concentración de aproximadamente 1 ml de la solución de lípido por 1 l del primer medio de cultivo.

30 En algunos métodos, la concentración de BSA procesada presente en el cultivo puede permanecer sustancialmente constante durante el periodo de cultivo. En otros métodos, la concentración de BSA procesada presente en el cultivo puede aumentar durante el periodo de cultivo. En algunas realizaciones, la BSA procesada puede estar presente en el medio de cultivo líquido al comienzo del periodo de cultivo (el primer medio de cultivo). En otras realizaciones, puede añadirse la BSA procesada al primer medio de cultivo líquido tras comenzar el periodo de cultivo (por ejemplo, mediante inyección de bolo o añadiendo un medio de cultivo de alimentación que contiene una BSA procesada).
 35

Adición de solución de lípido

Los ejemplos descritos en el presente documento pueden incluir además añadir un bolo de una solución de lípido (por ejemplo, una solución de lípido que incluye ácido oleico, ácido linoleico y colesterol) al cultivo cuando las células alcanzan una densidad de, por ejemplo, aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,3 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,7 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,8 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $1,9 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml,
 45 aproximadamente $2,1 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,2 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,3 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,4 \times 10^6$ células/ml, aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,3 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,2 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,1 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,9 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,8 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,7 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml, entre
 55 aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,3 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,4 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,3 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,2 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,1 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,9 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,8 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,7 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,4 \times 10^6$ células/ml, entre aproximadamente $1,1 \times 10^6$ células/ml y aproximadamente $1,3 \times 10^6$ células/ml, entre
 65

Los métodos descritos en el presente documento incluyen añadir una solución de base (por ejemplo, una solución de base alcalina) al cultivo. Una solución de base puede ser, por ejemplo, una solución estéril tamponada que tiene un pH de aproximadamente o mayor de 8,0 (por ejemplo, aproximadamente o mayor de 8,5, aproximadamente o mayor de 9,0, aproximadamente o mayor de 9,5, aproximadamente o mayor de 10,0, aproximadamente o mayor de 10,5, aproximadamente o mayor de 11,0, aproximadamente o mayor de 11,5 o aproximadamente o mayor de 12,0). Una solución de base puede ser, por ejemplo, una solución de base alcalina. Los ejemplos no limitantes de soluciones de base alcalina contienen una concentración de (i) entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 1,0 M (por ejemplo, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,6 M, entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 0,55 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,7 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,6 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,80 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,7 M, entre aproximadamente 0,6 M y aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,7 M, entre aproximadamente 0,7 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,7 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,7 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,7 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,7 M y aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,7 M y aproximadamente 0,75 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,75 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,75 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,75 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,75 M y aproximadamente 0,8 M, entre aproximadamente 0,75 M y aproximadamente 0,8 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,8 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,8 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,8 M y aproximadamente 0,85 M, entre aproximadamente 0,85 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,85 M y aproximadamente 0,95 M, entre aproximadamente 0,85 M y aproximadamente 0,9 M, entre aproximadamente 0,9 M y aproximadamente 1,0 M, entre aproximadamente 0,9 M y aproximadamente 0,95 M o entre aproximadamente 0,95 M y aproximadamente 1,0 M) de carbonato de sodio y (ii) entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,75 M (por ejemplo, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,55 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,50 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,45 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,40 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,35 M, entre aproximadamente 0,25 M y aproximadamente 0,30 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,55 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,50 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,45 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,40 M, entre aproximadamente 0,30 M y aproximadamente 0,35 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,55 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,50 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,45 M, entre aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,40 M, entre aproximadamente 0,4 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,40 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,40 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,40 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,40 M y aproximadamente 0,55 M, entre aproximadamente 0,40 M y aproximadamente 0,50 M, entre aproximadamente 0,40 M y aproximadamente 0,45 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,50 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,50 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,40 M, entre aproximadamente 0,45 M y aproximadamente 0,35 M y aproximadamente 0,50 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,50 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,50 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,50 M y aproximadamente 0,55 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,55 M y aproximadamente 0,60 M, entre aproximadamente 0,60 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,60 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,60 M y aproximadamente 0,65 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,75 M, entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,70 M, entre aproximadamente 0,70 M y aproximadamente 0,75 M) de bicarbonato de sodio. Los ejemplos adicionales de solución de base (por ejemplo, soluciones de base alcalina) que pueden añadirse al cultivo

1000 ml, entre aproximadamente 180 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 180 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 180 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 180 ml y aproximadamente 300 ml, entre aproximadamente 180 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 180 ml y aproximadamente 190 ml, entre aproximadamente 200 ml y aproximadamente 1100 ml, entre
 5 aproximadamente 200 ml y aproximadamente 1000 ml, entre aproximadamente 200 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 200 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 200 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 400 ml y aproximadamente 1100 ml, 400 ml y aproximadamente 1000 ml, entre aproximadamente 400 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 400 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 600 ml y aproximadamente 1100 ml, entre aproximadamente 600 ml y aproximadamente
 10 1000 ml, entre aproximadamente 600 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 800 ml y aproximadamente 1100 ml, entre aproximadamente 800 ml y aproximadamente 1000 ml o entre aproximadamente 900 ml y aproximadamente 2100 ml.

El volumen total de la solución de base (por ejemplo, solución de base alcalina) añadido al cultivo a lo largo del periodo
 15 de cultivo completo puede ser de entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 7 % (por ejemplo, entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 6 %, entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 4 %, entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 3 %, entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 2 %, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 7 %, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 6 %, entre aproximadamente un 2 % y
 20 aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 4 %, entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 3 %, entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 7 %, entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 6 %, entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 5 %, entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 4 %, entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un 7 %, entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un 6 %, entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un
 25 5 %, entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 7 %, entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 6 % o entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 7 %) del volumen del primer medio de cultivo o el volumen del cultivo después de la inoculación, pero antes de la adición del medio de cultivo de alimentación.

La adición continua de la solución de base (por ejemplo, solución de base alcalina) puede producirse a lo largo de un
 30 periodo de entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 125 horas (por ejemplo, entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 110 horas, entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 90 horas, entre aproximadamente 70 horas a aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 80 horas a aproximadamente 125 horas, entre aproximadamente 80 horas a aproximadamente 120 horas, entre
 35 aproximadamente 80 horas a aproximadamente 110 horas, entre aproximadamente 80 horas a aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 80 horas a aproximadamente 90 horas, entre aproximadamente 125 horas, entre aproximadamente 90 horas a aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 90 horas a aproximadamente 110 horas, entre aproximadamente 90 horas a aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 92 horas a aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 100 horas a
 40 aproximadamente 125 horas, entre aproximadamente 100 horas a aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 100 horas a aproximadamente 110 horas, entre aproximadamente 110 horas a aproximadamente 125 horas, entre aproximadamente 110 horas a aproximadamente 120 horas o entre aproximadamente 120 horas a aproximadamente 125 horas.

45 **Adición de antiespumante**

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además añadir
 antiespumante al primer medio de cultivo durante el cultivo discontinuo alimentado. La cantidad de antiespumante que
 se añade a un cultivo discontinuo alimentado es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, puede añadirse
 50 antiespumante al primer medio de cultivo en alícuotas de aproximadamente 1 ml, según sea necesario, para controlar la formación de espuma.

Agitación

El cultivo discontinuo alimentado de las células normalmente incluye alguna forma de agitación para mezclar el cultivo.
 Por ejemplo, la agitación usada en el cultivo discontinuo alimentado puede ser agitación rotatoria usando un impulsor.
 La agitación puede producirse a una frecuencia de aproximadamente 40 RPM a aproximadamente 80 RPM (por
 ejemplo, de aproximadamente 40 RPM a aproximadamente 75 RPM, de aproximadamente 40 RPM a
 60 aproximadamente 70 RPM, de 40 RPM a aproximadamente 65 RPM, de aproximadamente 40 RPM a
 aproximadamente 60 RPM, de aproximadamente 40 RPM a aproximadamente 55 RPM, de aproximadamente 40 RPM
 a aproximadamente 50 RPM, de aproximadamente 40 RPM a aproximadamente 45 RPM, de aproximadamente 45
 RPM a aproximadamente 80 RPM, de aproximadamente 45 RPM a aproximadamente 75 RPM, de aproximadamente
 45 RPM a aproximadamente 70 RPM, de aproximadamente 45 RPM a aproximadamente 65 RPM, de
 aproximadamente 45 RPM a aproximadamente 60 RPM, de aproximadamente 45 RPM a aproximadamente 55 RPM,
 65 de aproximadamente 45 RPM a aproximadamente 50 RPM, de aproximadamente 50 RPM a aproximadamente 80
 RPM, de aproximadamente 50 RPM a aproximadamente 75 RPM, de aproximadamente 50 RPM a aproximadamente

38 °C, de aproximadamente 38 °C a aproximadamente 39 °C, de aproximadamente 38 °C a aproximadamente 38,5 °C o de aproximadamente 38,5 °C a aproximadamente 39 °C). Por ejemplo, las NS0 pueden incubarse a una temperatura de aproximadamente 36,5 °C desde el comienzo hasta el final del periodo de cultivo. Los expertos en la materia apreciarán que la temperatura puede cambiarse o puede variar ligeramente durante el periodo de cultivo, por ejemplo, de manera horaria o diaria. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse o modificarse (por ejemplo, aumentarse o reducirse) 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 o quince días después de iniciarse el periodo de cultivo o en cualquier punto de tiempo dentro del periodo de cultivo. Por ejemplo, la temperatura puede aumentarse en 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. En otro ejemplo, la temperatura puede reducirse en 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.

CO₂

La etapa de cultivo discontinuo alimentado puede llevarse a cabo usando una atmósfera que contiene de aproximadamente un 1 % a un 15 % de CO₂, como máximo o aproximadamente un 14 % de CO₂, 13 % de CO₂, 12 % de CO₂, 11 % de CO₂, 10 % de CO₂, 9 % de CO₂, 8 % de CO₂, 5 % de CO₂, 6 % de CO₂, 5 % de CO₂, 4 % de CO₂, 3 % de CO₂, 2 % de CO₂ o como máximo o aproximadamente un 1 % de CO₂. Se conocen bien en la técnica métodos para burbujear CO₂ en un biorreactor de producción.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento también puede incluir el cultivo discontinuo alimentado de las células durante el primer periodo de tiempo en una atmósfera humidificada que comprende al menos o aproximadamente un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 85 %, 80 %, 85 %, 90 % o al menos o aproximadamente un 95 % de humedad o aproximadamente un 100 % de humedad.

dO₂

La etapa de cultivo discontinuo alimentado puede llevarse a cabo manteniendo un nivel de oxígeno disuelto (dO₂) en el cultivo celular de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 20 % (por ejemplo, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 16 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 15 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 14 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 13 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 12 %, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 11 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 16 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 15 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 14 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 13 %, entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 12 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 16 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 15 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 14 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 13 %, entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 12 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 16 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 15 %, entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 14 %, entre aproximadamente un 14 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 14 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 14 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 14 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 14 % y aproximadamente un 16 %, entre aproximadamente un 14 % y aproximadamente un 15 %, entre aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 15 % y aproximadamente un 16 %, entre aproximadamente un 16 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 16 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 16 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 16 % y aproximadamente un 17 %, entre aproximadamente un 17 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 17 % y aproximadamente un 19 %, entre aproximadamente un 17 % y aproximadamente un 18 %, entre aproximadamente un 18 % y aproximadamente un 20 %, entre aproximadamente un 18 % y aproximadamente un 19 % o entre aproximadamente un 19 % y aproximadamente un 20 %).

pH

Durante la etapa de cultivo discontinuo alimentado, puede mantenerse el pH del cultivo celular a un valor de pH específico mediante la adición de una solución de base, tal como una solución de base alcalina (como se ha descrito anteriormente). El pH de un cultivo celular puede mantenerse a un pH de entre aproximadamente 6,5 y

aproximadamente 7,5 (por ejemplo, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,6, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 6,8, entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 6,7, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 6,9, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,1, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,2, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,4, entre aproximadamente 7,2 y aproximadamente 7,3, entre aproximadamente 7,3 y aproximadamente 7,5, entre aproximadamente 7,3 y aproximadamente 7,4 o entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,5).

30 Eculizumab

La proteína recombinante producida por las células de mamífero cultivadas en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede ser eculizumab recombinante que incluye una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 2. La proteína recombinante producida por las células de mamífero cultivadas en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede ser eculizumab recombinante que incluye una cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 2.

Se conocen en la técnica ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de eculizumab (véanse, por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.355.245 y las secuencias de la región Fc en An et al., *mAbs* 1:6, 572-579, 2009).

Evaluación de uno o más parámetros del cultivo celular

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además evaluar uno o más parámetros del cultivo celular en el cultivo discontinuo alimentado. Los ejemplos no limitantes de parámetros del cultivo celular incluyen: crecimiento celular, porcentaje de viabilidad celular, densidad de células viables, el consumo de glucosa aeróbico, título de eculizumab, tasa de productividad específica, tasa de productividad volumétrica, niveles de lactato, calidad de eculizumab (por ejemplo, fragmentación y afinidad de unión), producción de lactato, niveles de glucosa y pH.

Se conocen bien en la técnica métodos que pueden usarse para evaluar los uno o más parámetros del cultivo celular. Por ejemplo, pueden determinarse el crecimiento celular y el porcentaje de viabilidad celular usando, por ejemplo, un contador de células automatizado ViCell XR. La cantidad de eculizumab presente en el cultivo puede determinarse usando la absorbancia espectrofotométrica o un ensayo de proteínas de Bradford. La cantidad de eculizumab presente en el cultivo puede determinarse como un título mediante dilución seriada. Los niveles de glucosa y los niveles de lactato pueden determinarse usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el kit de ensayo de glucosa y los kits de ensayo de L-lactato comercializados por Abcam. El pH en el cultivo discontinuo alimentado puede determinarse, por ejemplo, colocando una sonda de pH en el cultivo.

Los uno o más parámetros del cultivo celular evaluados pueden compararse con los mismos uno o más parámetros de cultivo celular determinados en un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala.

Recogida de eculizumab

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además una etapa de recoger el eculizumab recombinante producido en la etapa de cultivo discontinuo alimentado. En algunos ejemplos,

la recogida incluye lisar las células de mamífero. En algunos ejemplos, el eculizumab recombinante se recoge del medio de cultivo (por ejemplo, uno o ambos del primer medio de cultivo líquido y el medio de cultivo de alimentación o uno, dos o tres del primer medio de cultivo líquido, el primer medio de cultivo de alimentación líquido y el segundo medio de cultivo de alimentación líquido). Los métodos para lisar células de mamífero se conocen bien en la técnica.

5 Los métodos para recoger un anticuerpo recombinante (tal como eculizumab) del medio se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad y/o filtración.

Purificación del eculizumab recogido

10 Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además una etapa de purificar el eculizumab recombinante recogido. Tal como se conoce en la técnica, puede purificarse un anticuerpo recombinante recogido (tal como eculizumab) usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden formarse una o más etapas de filtración y cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando una resina de proteína A), cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de tamiz molecular y cromatografía de interacción hidrófoba) para purificar el anticuerpo recombinante recogido (por ejemplo, eculizumab). Se conocen bien en la técnica métodos adicionales para purificar un anticuerpo recombinante recogido (por ejemplo, eculizumab).

20 El eculizumab recombinante purificado puede estar sustancialmente libre (tal como al menos o aproximadamente un 90 % libre o aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos o aproximadamente un 99 % libre) de proteínas contaminantes procedentes de un medio de cultivo líquido y/o ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos contaminantes procedentes del lisado de una célula de mamífero.

Cambio del perfil isoeléctrico del eculizumab recogido o purificado

25 En algunos ejemplos, puede cambiarse el perfil isoeléctrico del eculizumab recombinante recogido o purificado (cambiado a un perfil isoeléctrico más ácido) usando los métodos descritos en la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos n.º 62/064.397, presentada el 15 de octubre de 2014, que se incorpora al presente documento por referencia.

30

Formulación del eculizumab

35 Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además formular el eculizumab recombinante recogido, el eculizumab recombinante purificado o el eculizumab recombinante cambiado en una composición farmacéutica. La formulación del eculizumab recombinante recogido, el eculizumab recombinante purificado o el eculizumab recombinante cambiado en una composición farmacéutica puede incluir la etapa de mezclar o añadir el eculizumab recombinante purificado, el eculizumab recombinante recogido o el eculizumab recombinante cambiado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para generar una composición farmacéutica. Se conocen bien en la técnica ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables de origen no natural).

40

Ejemplos

45 La invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Intentos anteriores para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab

50 Eculizumab se produce normalmente usando un cultivo discontinuo alimentado de 10.000 l de células de mamífero. Las células de mamífero en el cultivo celular de producción secretan eculizumab recombinante en el medio de cultivo durante el periodo de cultivo. Se han hecho intentos anteriores de replicar los parámetros de cultivo observados en un cultivo celular de producción de eculizumab de 10.000 l. Los intentos previos para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab de 10.000 l no tuvieron éxito, ya que los cultivos a pequeña escala mostraron, por ejemplo, un nivel reducido de lactato en el cultivo con el paso del tiempo, una reducción del sodio en el cultivo con el paso del tiempo y una tendencia de pH distinta en comparación con el cultivo celular de producción de eculizumab de 10.000 l (véanse las figuras 1, 2 y 3, respectivamente). Además, los cultivos a pequeña escala anteriores mostraron un aumento en la densidad de células viables con el paso del tiempo, un porcentaje de viabilidad celular aumentado en puntos de tiempo posteriores durante el periodo de cultivo, títulos aumentados de eculizumab en puntos de tiempo posteriores durante el periodo de cultivo y concentración de glucosa aumentada en el cultivo en puntos de tiempo posteriores durante el periodo de cultivo (véanse las figuras 4, 6, 8 y 10, respectivamente).

60

Ejemplo 2. Nuevos cultivos a pequeña escala para replicar con precisión un cultivo celular de producción de eculizumab

65 Se desarrolló y probó un nuevo modelo a pequeña escala para determinar si el nuevo modelo de cultivo celular a pequeña escala podría replicar con precisión parámetros del cultivo de un cultivo celular de producción de eculizumab

de 10.000 l.

El recién desarrollado cultivo a pequeña escala se cultivó usando los siguientes métodos. Se usó un vaso Applikon de 7 l para incubar el cultivo. El vaso Applikon de 7 l contiene un orificio de burbujeo perforado de tipo L y un puerto superpuesto para la introducción de gases en el vaso, cuatro puertos de 12 mm (para el sensor de pH, el sensor de oxígeno disuelto, un septo y el condensador de salida), un puerto superior de triple adición, un tubo de inmersión de muestra/recogida y un eje impulsor accionado por un motor superior. Se acoplaron tubos a estos puertos a fin de conectar el vaso a los sistemas de suministro de gases, a los controles externos y los dos medios de cultivo de alimentación líquidos diferentes, la solución de base y la solución de líquido se administraron al biorreactor durante el periodo de cultivo.

El biorreactor se autoclavó usando 5-10 ml de agua desionizada para la generación de vapor interno. Antes de la inoculación, se añadieron 3,7 l de un primer medio de cultivo al biorreactor. Después, se mantuvo el medio a 36,5 °C, con burbujeo de aire y dióxido de carbono y una agitación inicial de 60 RPM. En las 6 horas antes de la inoculación, se añadieron al biorreactor 3,7 ml de una primera solución de lípido que contenía ácido linoleico, ácido oleico y colesterol al biorreactor a través del septo de la placa superior. Se estandarizaron los sensores de pH y dO₂ antes de la inoculación y se calibró el sensor de dO₂ a una saturación de aire al 100 % tras añadirse la primera solución de lípido, pero antes de la inoculación.

Se usó un cultivo celular de tren de siembra de NS0 para calcular el volumen exacto del cultivo celular de tren de siembra de NS0 que se iba a añadir al biorreactor para generar (tras la inoculación) una densidad de células viables inicial de 5×10^5 células/ml y un volumen de cultivo inicial de 4,2 l. Después, se cultivó el cultivo celular usando una velocidad de agitación rotatoria de 60 RPM, una temperatura de 36,5 °C, un pH de 7,00 y un dO₂ del 15 %. La estrategia de gaseado usada fue usar aire SLPH de 0 a 30,0, con hasta 30,0 SLPH adicional de O₂ acumulativo según se necesitase a demanda para mantener el punto fijo de dO₂ del 15 %. La capa de aire superpuesta fue de 225 ml/minuto de aire. Del día 0 al día 5 del periodo de cultivo, el punto fijo de pH se ajustó a pH 7,00 ± 0,05. Del día 5 al día 9 del periodo de cultivo (o 48 horas después de iniciarse la alimentación si se obtiene la densidad celular diana en el día 2 del cultivo), el punto fijo de pH se ajustó a pH 7,00 ± 0,25. Del día 10 hasta recoger el cultivo, el punto fijo de pH se ajustó a pH 7,00 ± 0,05.

Una vez que el cultivo logró una densidad de células diana igual o mayor de 18×10^5 células/ml se añadió una adición de un bolo de 1 ml/l de una segunda solución de lípido (que contiene ácido oleico, ácido linoleico y colesterol) al biorreactor (típicamente 4,2 ml). Después de la adición de la segunda solución de lípido, se inició la adición de dos medios de cultivo de alimentación líquidos diferentes (primero y segundo medio de cultivo de alimentación líquido) al cultivo. Se añadieron de manera continua al biorreactor ciento sesenta y ocho mililitros de cada uno del primero y el segundo medio de cultivo de alimentación líquido a lo largo de 5,5 días (133,3 horas). El volumen neto del primer medio de cultivo líquido de alimentación añadido a lo largo de los 5,5 días fue del 4 % del volumen de cultivo inicial. El volumen neto del segundo medio de cultivo líquido de alimentación añadido a lo largo de los 5,5 días fue del 4 % del volumen de cultivo inicial. La alimentación tanto del primero como del segundo medio de cultivo de alimentación líquido se produce normalmente aproximadamente a las 72 horas después de iniciarse el periodo de cultivo hasta aproximadamente 205,3 horas después del periodo de iniciación. Tanto el primer medio de cultivo de alimentación líquido como el segundo medio de cultivo de alimentación líquido se añadieron al cultivo en un conjunto de bomba de jeringa a aproximadamente 21 µl por minuto.

Se añadió FoamAway libre de componentes de origen animal (AOF) de Gibco según se necesitó en pequeñas adiciones de 1,0 ml a través del septo de la placa superior.

Se añadieron de manera continua ciento sesenta y ocho ml de una solución de base que contenía carbonato de sodio 0,75 M y bicarbonato de sodio 0,5 M a lo largo de 96 horas al cultivo, iniciándose la adición continua en el mismo punto, que es aproximadamente 48 horas después de iniciarse la adición continua del primer medio de cultivo de alimentación líquido y el segundo medio de cultivo de alimentación líquido al cultivo. De manera habitual, la solución de base se añadió de manera continua al cultivo entre 120 horas después de iniciarse el periodo de cultivo y 216 horas después de iniciarse el periodo de cultivo. La solución de base se añadió justo por encima de la superficie de cultivo líquido a través de la línea de tres puertos de la placa superior usando una bomba multijeringa a un caudal continuo cada minuto.

La densidad de células viables, el porcentaje de viabilidad celular, el título de eculizumab y la concentración de glucosa en el cultivo a lo largo del periodo de cultivo en cada cultivo a pequeña escala se determinaron usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los datos resultantes demuestran que, a diferencia del cultivo celular de eculizumab a pequeña escala anterior, el nuevo cultivo discontinuo alimentado de eculizumab a pequeña escala desarrollado es capaz de replicar de manera precisa: la densidad de células viables con el paso del tiempo en un cultivo celular de producción de eculizumab (compárese la figura 5 con la figura 4), el porcentaje de viabilidad celular con el paso del tiempo en un cultivo celular de producción de eculizumab (compárese la figura 7 con la figura 6), el título de eculizumab con el paso del tiempo en un cultivo celular de producción de eculizumab (compárese la figura 9 con la figura 8) y la concentración de glucosa

frente al tiempo en un cultivo celular de producción de eculizumab (compárese la figura 11 con la figura 10).

En resumen, los datos demuestran que los métodos de cultivo a pequeña escala proporcionados en el presente documento replican de manera precisa al menos cuatro de los parámetros de cultivo celular de un cultivo celular de producción de eculizumab.

OTRAS REALIZACIONES

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, se pretende que la anterior descripción ilustre, y no limite, el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Apéndice de secuencias

15 SEQ ID NO: 1
PRT
Homo sapiens
Cadena pesada de eculizumab

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTS
TSTVYMELESSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTISGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVIVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDKTVERKCC
VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK

20
25 SEQ ID NO: 2
PRT
Homo sapiens
Cadena ligera de eculizumab

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCGASENIYGALNWIYQKPGKAPKLLIYGATNLDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> MALANSON, HUNTER F. JALURIA, PRATIK
- <120> MÉTODOS PARA REPLICAR UN CULTIVO CELULAR DE PRODUCCIÓN DE ECULIZUMAB A GRAN ESCALA
- 35 <130> AXJ-197
- <140> Todavía sin asignar
<141> Concurrente con la presente
- 40 <150> 62/064.457
<151> 15/10/2014
- <160> 2
- 45 <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1
<211> 448
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial
- <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Trp	Ile	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Glu	Tyr	Thr	Glu	Asn	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Tyr	Phe	Phe	Gly	Ser	Ser	Pro	Asn	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr
	130					135					140				

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385		390		395		400									
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys
		435					440						445		

<210>2

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Asn Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

REIVINDICACIONES

1. Un método para replicar un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala en un cultivo a pequeña escala, comprendiendo el método:
- 5 proporcionar un biorreactor discontinuo alimentado de 4 l a 10 l que contiene un primer medio de cultivo que ocupa entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 90 % de la capacidad del biorreactor y tiene una densidad celular inicial de entre aproximadamente $2,5 \times 10^5$ y aproximadamente $7,5 \times 10^5$ células NS0/ml, comprendiendo las células un ácido nucleico recombinante que codifica eculizumab;
- 10 cultivar las células en el biorreactor durante al menos 8 días a de aproximadamente 34 °C a aproximadamente 39 °C, a un nivel de dO_2 de entre aproximadamente el 14 % a aproximadamente el 16 % y una agitación rotatoria de entre aproximadamente 50 RPM y aproximadamente 70 RPM; mantener el cultivo discontinuo alimentado hasta que se alcanza una densidad celular de aproximadamente 13×10^5 a aproximadamente 20×10^5 células/ml, después;
- 15 (1) añadir de manera continua una alimentación de medio de cultivo al primer medio de cultivo durante un periodo de aproximadamente 120 horas a aproximadamente 150 horas y de aproximadamente 40 a 60 horas después del inicio de la adición continua de la alimentación de medio de cultivo y
(2) añadir de manera continua una solución de base alcalina al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 90 horas a aproximadamente 105 horas.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde uno o ambos del primer medio de cultivo y el medio de cultivo de alimentación comprende una seroalbúmina bovina procesada (BSA); opcionalmente en donde la BSA procesada es BSA de Nueva Zelanda.
- 25 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la densidad celular inicial es de entre aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/ml y aproximadamente $6,0 \times 10^6$ células/ml.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el biorreactor tiene una capacidad de entre aproximadamente 4 l a aproximadamente 6 l; y/o el primer medio de cultivo ocupa entre aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 88 % de la capacidad del biorreactor.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cultivo discontinuo alimentado se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 36 °C a aproximadamente 37 °C.
- 35 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la agitación rotatoria es de entre aproximadamente 55 RPM y aproximadamente 65 RPM.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la densidad celular diana es de entre aproximadamente 17×10^5 células/ml y aproximadamente 19×10^5 células/ml.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la solución de base alcalina se añade de manera continua al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 92 horas a aproximadamente 100 horas; opcionalmente en donde el biorreactor comprende 4,2 l del primer medio de cultivo y la solución de base alcalina se añade de manera continua al primer medio de cultivo a una velocidad de entre aproximadamente 1,65 ml/hora a aproximadamente 1,85 ml/hora.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en donde la solución de base alcalina comprende entre aproximadamente 0,65 M y aproximadamente 0,85 M de carbonato de sodio y entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,6 de bicarbonato de sodio.
- 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde:
- (a) se añade de manera continua un solo medio de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo; o
- 55 (b) el medio de cultivo de alimentación se añade de manera continua al primer medio de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 130 horas a aproximadamente 135 horas.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde se añaden de manera continua dos medios de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo; opcionalmente en donde se añaden de manera continua cada uno de los dos medios de cultivo de alimentación al primer medio de cultivo a una velocidad de entre aproximadamente 15 μ l/minuto a aproximadamente 35 μ l/minuto o a una velocidad de entre aproximadamente 20 μ l/minuto a aproximadamente 25 μ l/minuto.
- 60 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende adicionalmente:
- 65 (a) añadir un bolo de una solución de lípido que comprende ácido linoleico, ácido oleico y colesterol al primer medio de cultivo en un punto de tiempo cuando las células alcanzan una densidad de aproximadamente 13×10^5

células/ml a aproximadamente 20×10^5 células/ml; opcionalmente en donde se añade la solución de lípido a una dosis de aproximadamente 1 ml por 1 l del primer medio de cultivo; y/o
(b) añadir antiespumante al primer medio de cultivo durante el cultivo.

- 5 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que además comprende recoger el eculizumab recombinante producido en la etapa de cultivo; opcionalmente en donde la recogida comprende listar las células o en donde el eculizumab recombinante se recoge de uno o ambos del primer medio de cultivo y el medio de cultivo de alimentación.
- 10 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el eculizumab comprende una cadena pesada que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que además comprende evaluar uno o más parámetros del cultivo celular seleccionados entre el grupo que consiste en: crecimiento celular, porcentaje de viabilidad celular, densidad de células viables, el consumo de glucosa aeróbico, título de eculizumab, tasa de productividad específica, tasa de productividad volumétrica, producción de lactato y calidad de eculizumab; que además comprende opcionalmente comparar los uno o más parámetros del cultivo celular determinados con los mismos uno o más parámetros del cultivo celular en un cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala, en donde el cultivo celular de producción de eculizumab a gran escala es opcionalmente un cultivo celular de producción de eculizumab
- 20 de 10.000 l.

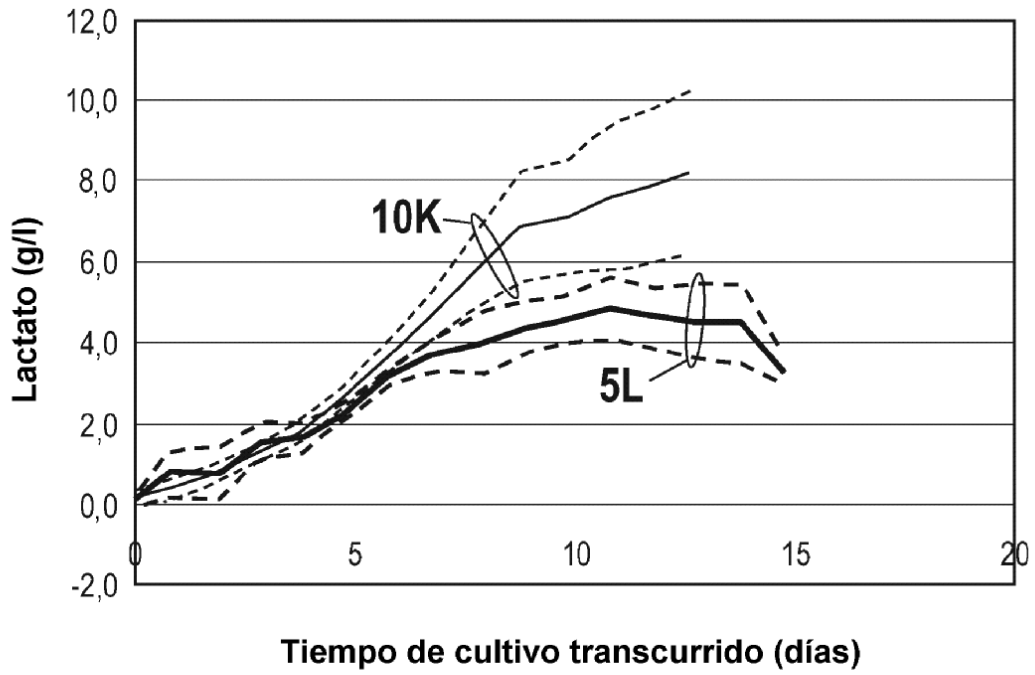


Fig. 1

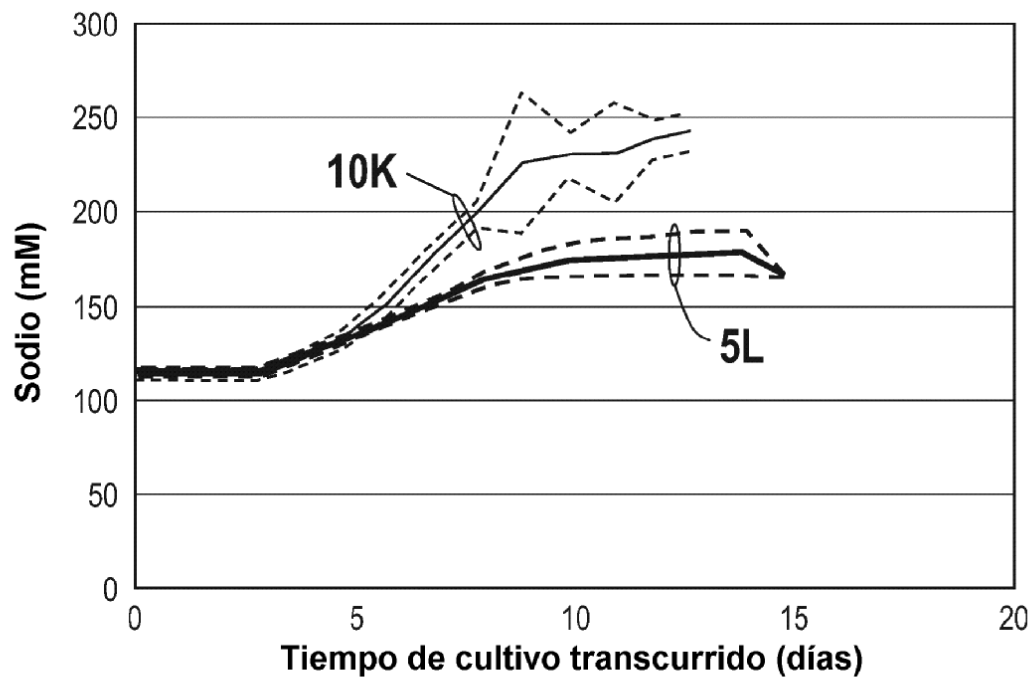


Fig. 2

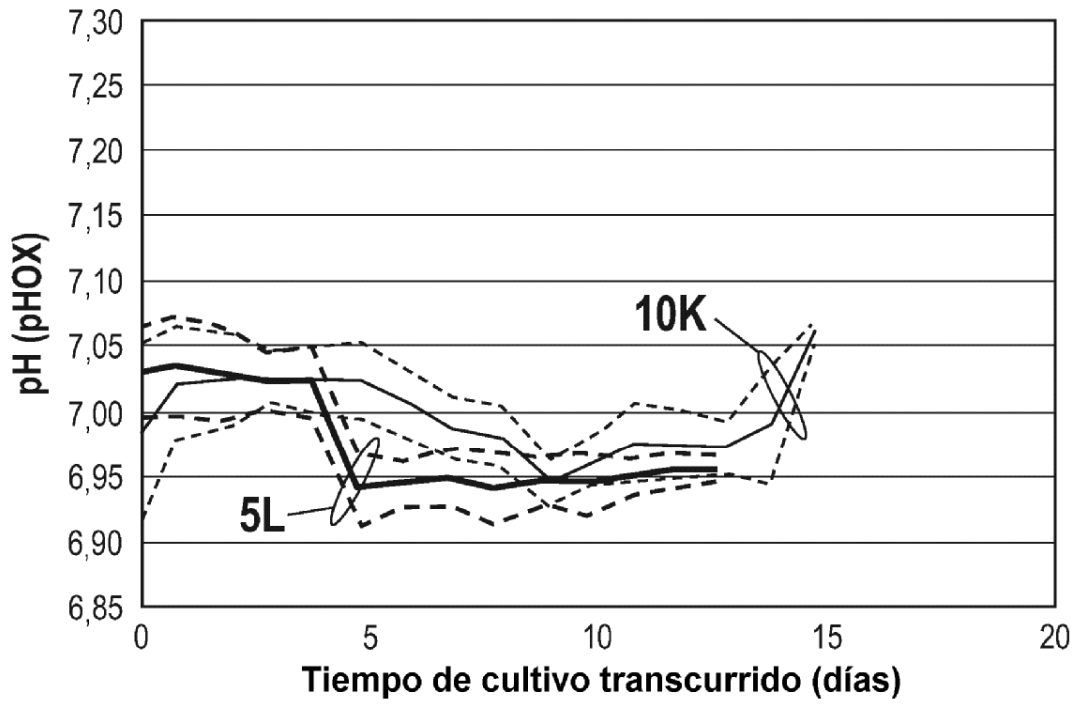


Fig. 3

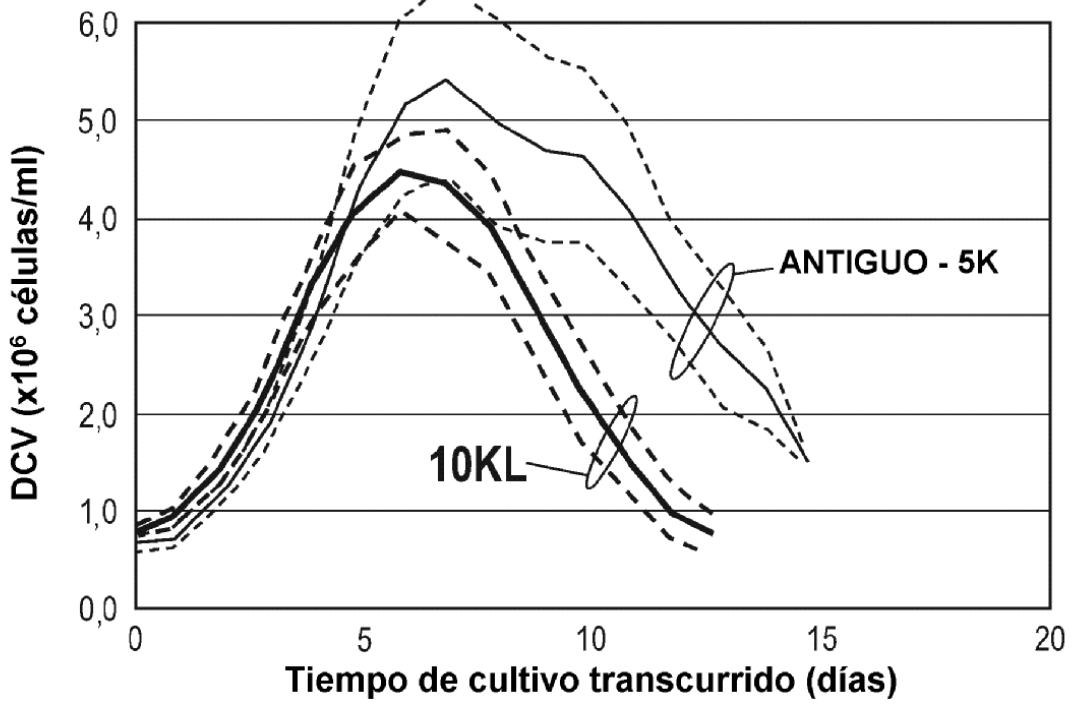


Fig. 4

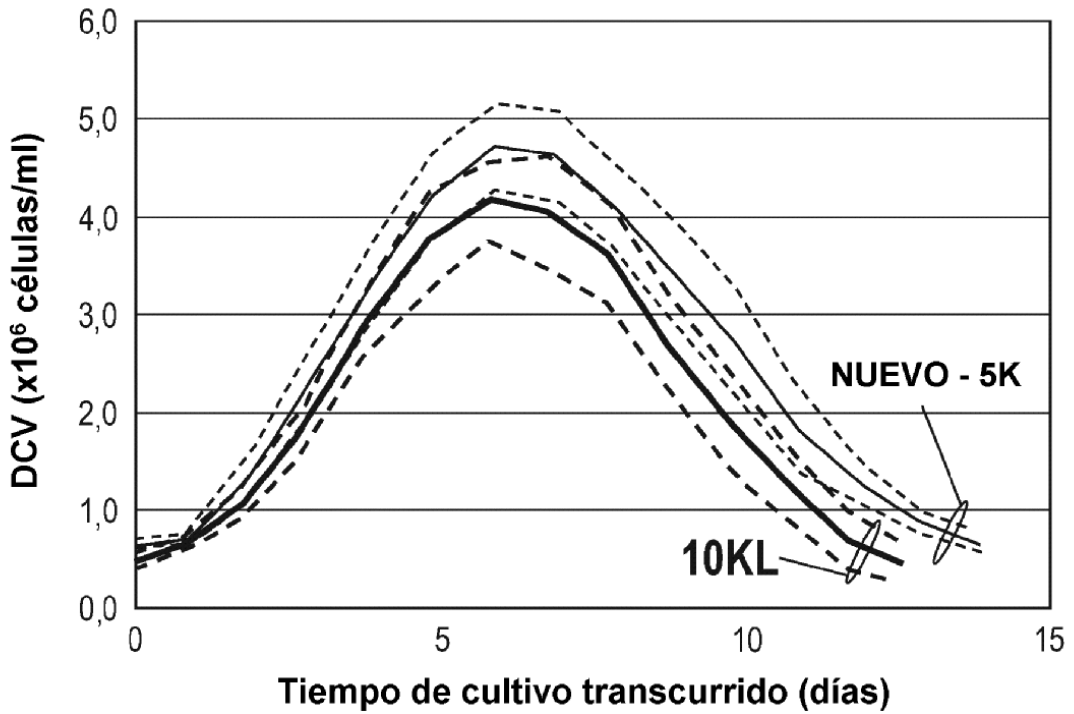


Fig. 5

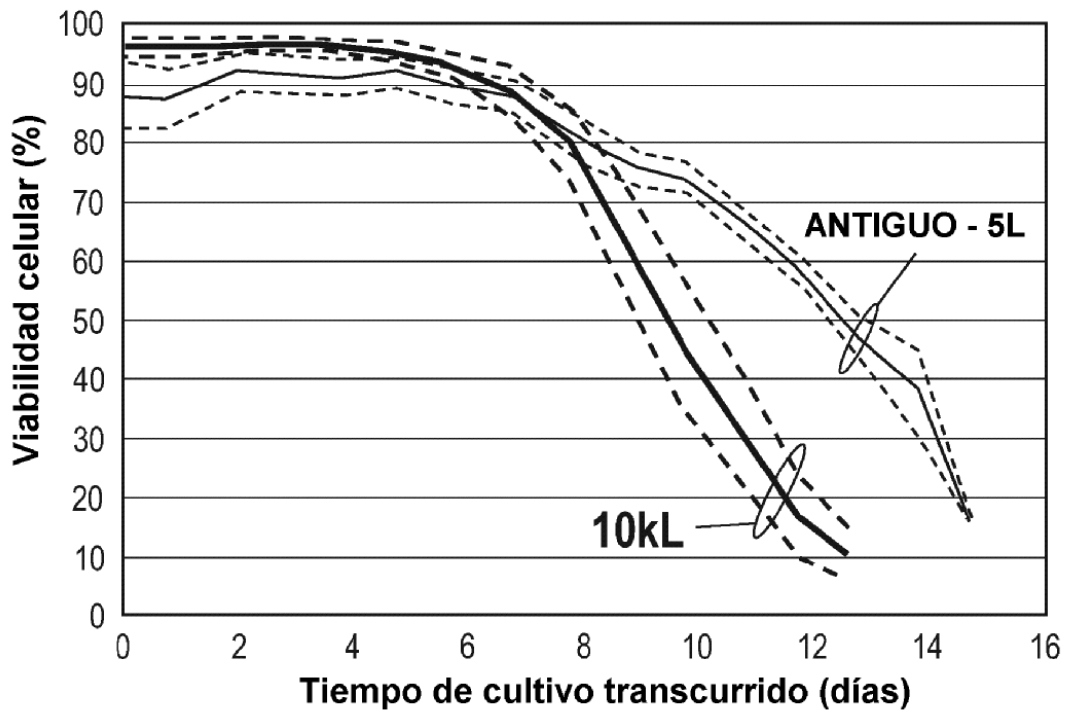


Fig. 6

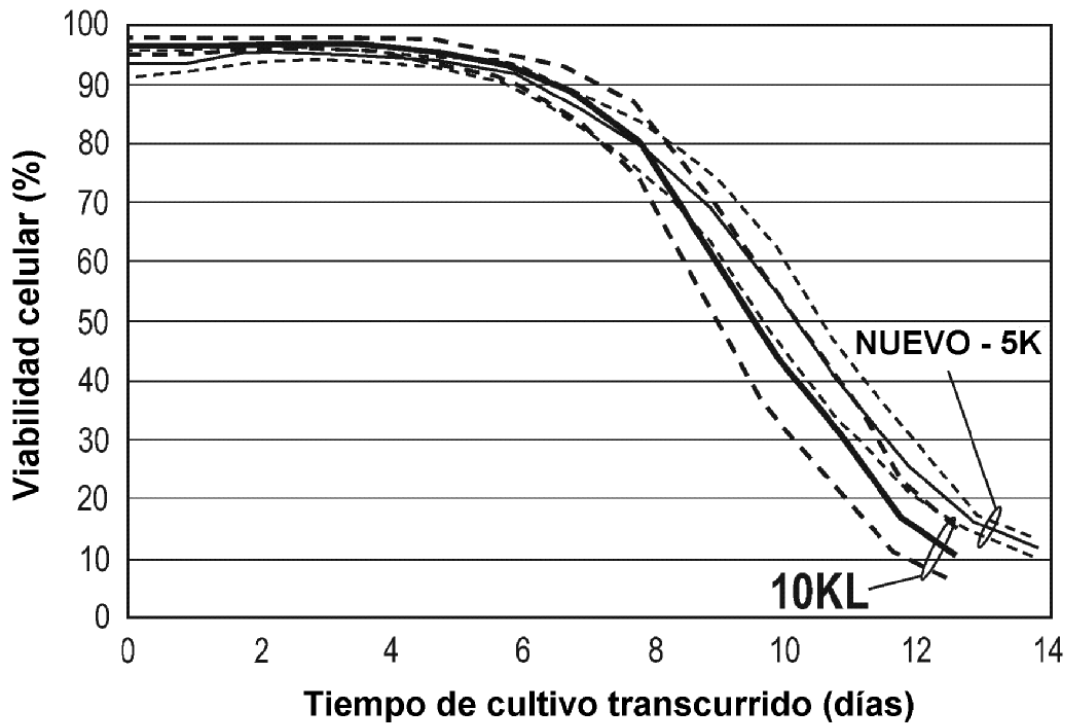


Fig. 7

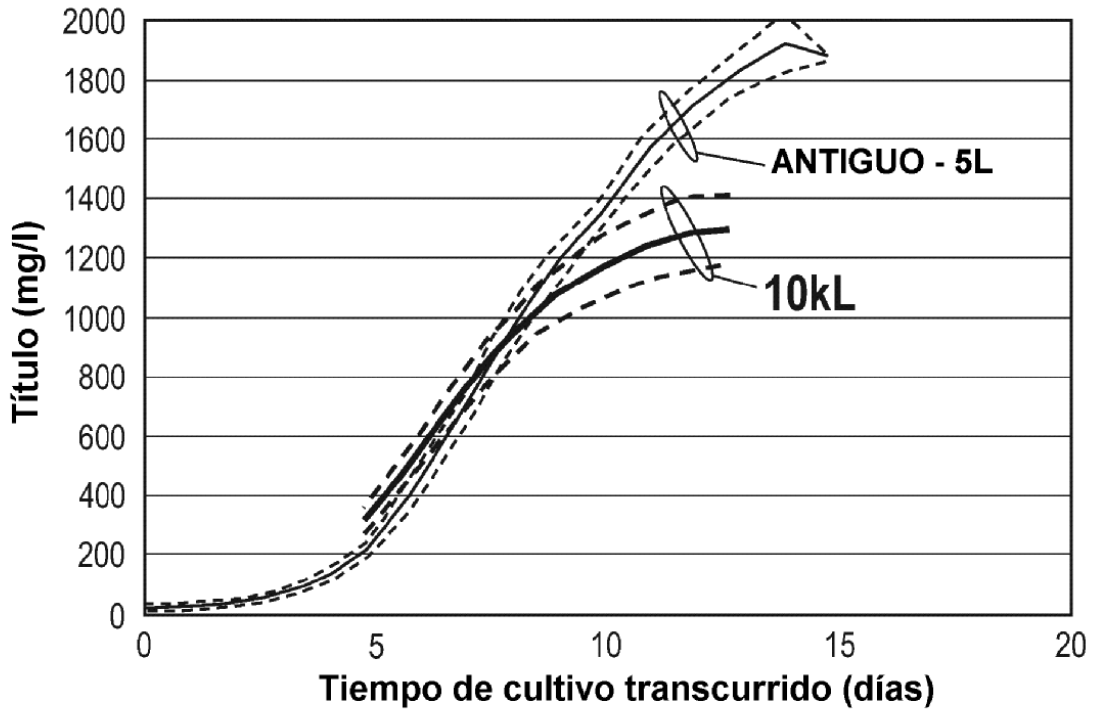


Fig. 8

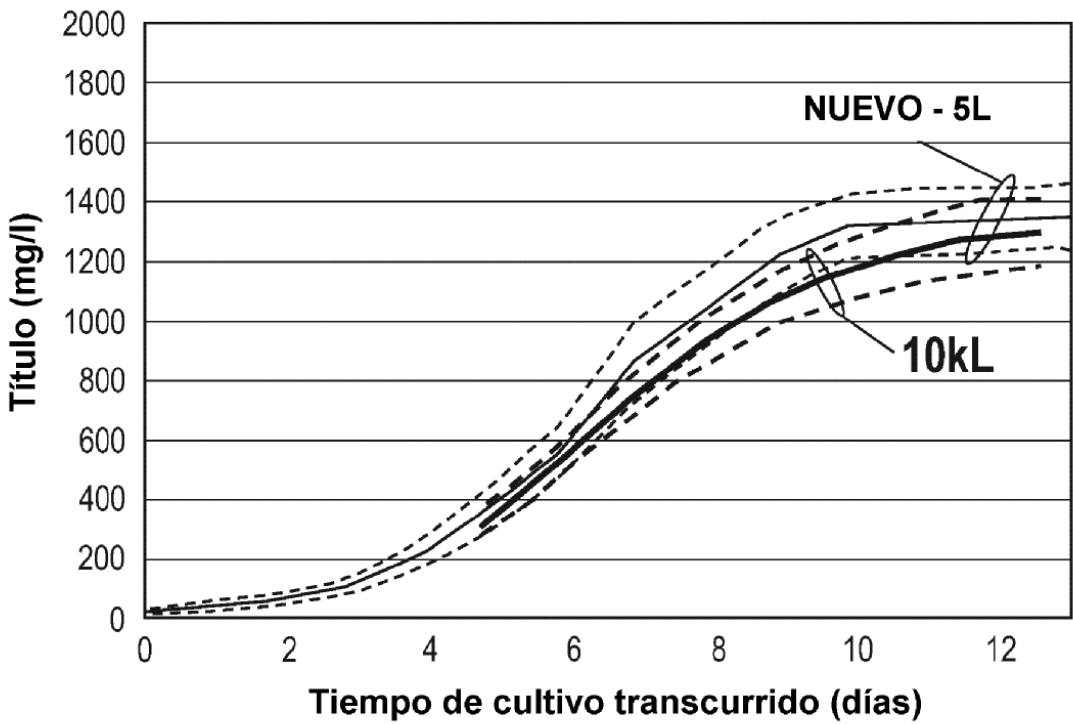


Fig. 9

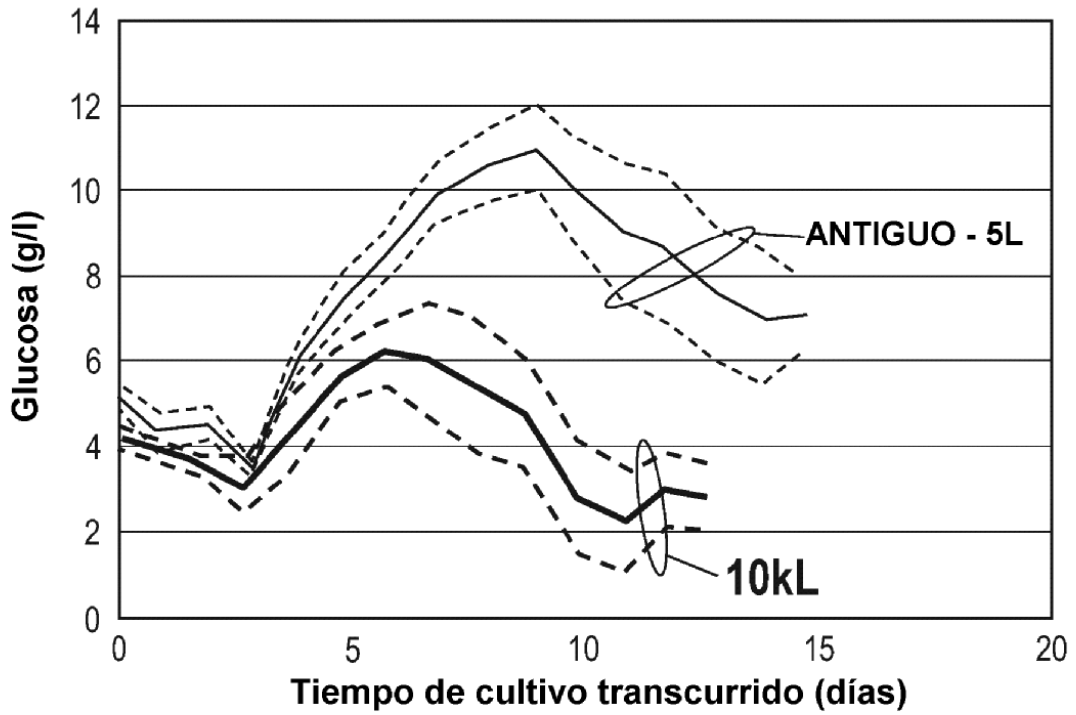


Fig. 10

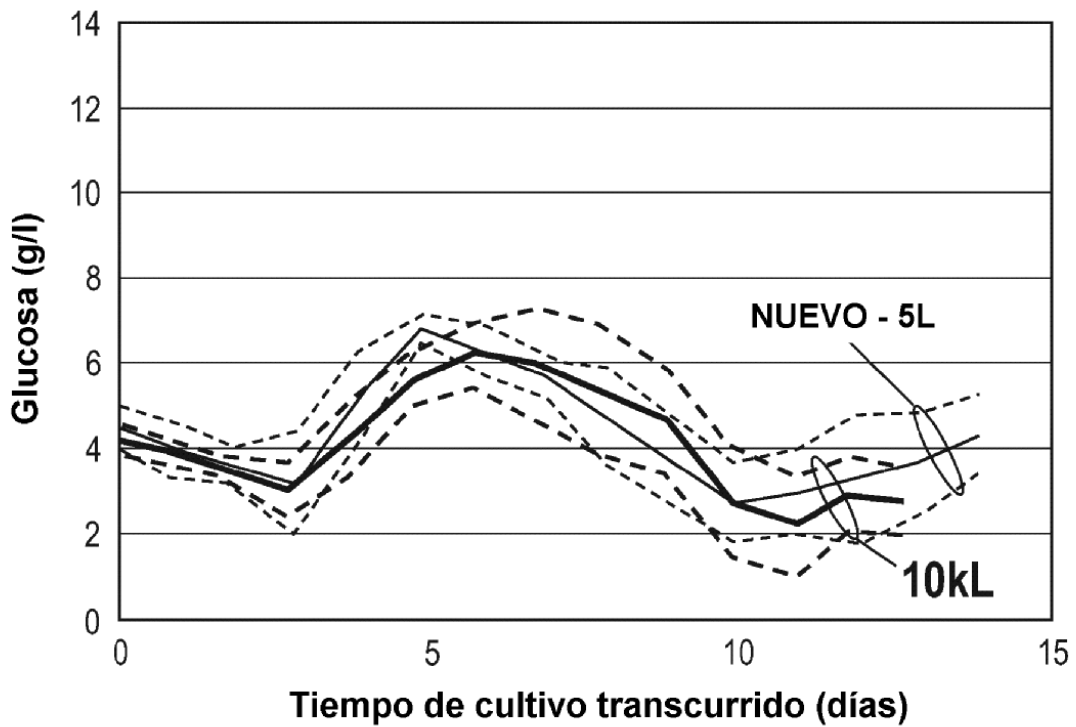


Fig. 11