

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 903**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**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/US2015/055276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16061065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2015 E 15795064 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3207132**

54 Título: **Métodos para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto proteico y sus usos**

30 Prioridad:

**15.10.2014 US 201462064397 P**

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

**21.02.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MALANSON, HUNTER F.;  
JALURIA, PRATIK y  
ALFORD, RACHAEL**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 743 903 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 cambiar el perfil isoeléctrico de un producto proteico y sus usos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos de cultivo celular y a la fabricación de proteínas recombinantes.

10 **Antecedentes**

10 Las células de mamíferos que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante a menudo se utilizan para producir proteínas terapéuticamente o comercialmente importantes. El producto de proteína recombinante resultante contiene una variedad de moléculas de proteína, cada una tiene su propio conjunto de propiedades biofísicas. Por ejemplo, un producto proteico recombinante producido por un cultivo de células de mamífero puede tener una o más subpoblaciones de proteínas, teniendo cada subpoblación su propio punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico de una subpoblación de proteínas puede afectar a una o más de las cargas netas de las proteínas, solubilidad, plegado, afinidad de unión al sustrato, actividad biológica y tasa de eliminación en un cuerpo humano. En vista del efecto del punto isoeléctrico en las proteínas, puede ser deseable cambiar o redistribuir las subpoblaciones dentro del perfil isoeléctrico de un producto proteico recombinante. Por ejemplo, puede ser deseable aumentar o disminuir un nivel (o cantidad) de una o más de las subpoblaciones de proteínas que tienen un punto isoeléctrico específico en un producto de proteína recombinante con respecto a un perfil isoeléctrico de referencia o de partida.

20 **Sumario**

25 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la incubación de un producto de proteína recombinante durante un período de tiempo adicional bajo ciertas condiciones da como resultado un cambio en el perfil isoeléctrico del producto de proteína recombinante. El período de tiempo adicional puede medirse como que ocurre después de que un cultivo de células de mamífero alcanza un punto crítico de tiempo, tal como un período de tiempo adicional durante la fase de declive de un cultivo de células de mamífero. Por tanto, la presente memoria descriptiva incluye métodos para cambiar un perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante. También se proporcionan métodos para fabricar un producto proteico recombinante y métodos para fabricar una sustancia farmacológica que incluyen el uso de estos métodos para cambiar un perfil isoeléctrico de un producto proteico recombinante.

35 La invención proporciona un método para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante que tiene siete subpoblaciones de proteínas con un punto isoeléctrico entre aproximadamente 5,45 y aproximadamente 6,55, en donde el producto proteico recombinante es eculizumab, cuyo método comprende: (a) el cultivo semicontinuo de células de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo que consiste en una fase de crecimiento o una fase de crecimiento y una fase estacionaria de las células de mamífero o que comprende una fase de crecimiento de las células de mamífero y termina en un punto temporal crítico; (b) incubar el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido durante un segundo período de tiempo que consiste en al menos 6 horas de una fase de disminución de las células de mamífero en donde el perfil más ácido comprende un aumento en la cantidad de las cuartas subpoblaciones de proteínas más ácidas de las siete subpoblaciones de proteínas, y una disminución en la cantidad de la primera y segunda subpoblaciones de proteínas más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas, en donde las condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido comprenden (i) incubar en una concentración de oxígeno disuelto (dO<sub>2</sub>) de entre aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %; (ii) incubar en un medio que tiene un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,3; y/o (iii) incubar a una temperatura de entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 37,5 °C; y opcionalmente (c) analizar el producto para determinar el perfil isoeléctrico y repetir la etapa (b) si el perfil isoeléctrico requiere un cambio adicional hacia un perfil más ácido.

En algunas realizaciones de los métodos, el primer período de tiempo es entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 12 días. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el segundo período de tiempo está entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 120 horas.

En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el producto incubado en la etapa (b) incluye una mezcla de la proteína recombinante y las células de mamífero en el cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el producto se incuba en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el producto se incuba en un recipiente de almacenamiento.

En algunas realizaciones, el método incluye además entre las etapas (a) y (b) una etapa para clarificar el cultivo y donde el producto incubado en la etapa (b) incluye la proteína recombinante en un medio de cultivo tisular clarificado. En algunas realizaciones, el producto se incuba en un recipiente de almacenamiento.

Algunas realizaciones del método incluyen además entre las etapas (a) y (b) una etapa de purificación de la proteína recombinante y donde el producto incubado en la etapa (b) incluye la proteína recombinante purificada en un diluyente.

5 En algunas realizaciones del método, la etapa (a) puede incluir el cultivo semicontinuo de las células de mamífero en al menos una condición que produce un producto que tiene un perfil básico, y la etapa (c) cambia el producto a un perfil más ácido. En algunas realizaciones de los métodos, la etapa (a) puede incluir el cultivo semicontinuo de las células de mamífero en al menos una condición que produce un producto que tiene un perfil básico, y la etapa (b) cambia el producto a un perfil más ácido. En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la condición incluye el cultivo en un medio de cultivo que incluye suero bovino de Nueva Zelanda.

15 En algunas realizaciones del método descritos en el presente documento, la concentración de oxígeno disuelto ( $dO_2$ ) entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 45 % puede estar entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 40 % o entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 35 %.

En algunas realizaciones del método, el medio que tiene un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,3 puede tener un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,25, entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,20, o entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,15.

20 En algunas realizaciones del método, la temperatura entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 37,5 °C puede estar entre aproximadamente 33 °C y aproximadamente 37,5 °C.

25 En algunas realizaciones del método, las condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto a un perfil más ácido incluyen incubar a una velocidad de agitación de entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 400 RPM (por ejemplo, entre aproximadamente 220 RPM y aproximadamente 350 RPM o entre aproximadamente 220 RPM y aproximadamente 300 RPM).

30 En algunas realizaciones del método, la etapa (c) puede incluir electroforesis de enfoque isoeléctrico. En algunas realizaciones, la electroforesis de enfoque isoeléctrico es la electroforesis capilar o la electroforesis en gel.

En algunas realizaciones del método, eculizumab comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1 y la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones del método, eculizumab incluye una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO: 2.

35 Algunas realizaciones del método incluyen además (d) formular el producto en una composición farmacéutica.

40 En algunas realizaciones del método, el perfil más ácido es un perfil isoeléctrico, donde: la cantidad de proteína que puebla cada una de la segunda, tercera y cuarta subpoblaciones de proteínas más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\geq 10\%$  de la masa total de proteínas en el perfil; la cantidad de proteína que puebla cada una de las subpoblaciones de proteínas tercera y cuarta más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas es menor que la cantidad de la segunda subpoblación de proteínas más básica de las siete subpoblaciones de proteínas; la cantidad de proteína que puebla la subpoblación de proteínas más ácida de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 3\%$  de la masa total de proteínas en el perfil; la cantidad de proteína que puebla la segunda subpoblación de proteínas más ácida de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 6\%$  de la masa total de proteínas en el perfil; la cantidad de proteína que puebla la tercera subpoblación de proteínas más ácida de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 9\%$  de la masa total de proteínas en el perfil; la cantidad de proteína que puebla la subpoblación de proteínas más básica de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 8\%$  de la masa total de proteínas en el perfil; y no hay otras subpoblaciones de proteínas que tengan una cantidad de proteína de  $\leq 6\%$  de la masa total de proteínas, aparte de la subpoblación de proteínas más ácida, la segunda más ácida, la tercera subpoblación más ácida y más básica de las siete subpoblaciones de proteínas. En algunas realizaciones del método, la incubación en (b) puede dar como resultado un producto de proteína recombinante que tiene el perfil más ácido.

55 Tal como se usa en el presente documento, la palabra "un/uno" o "pluralidad" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo en concreto. Por ejemplo, la frase "una célula de mamífero" representa "una o más células de mamífero".

60 La expresión "perfil isoeléctrico" se conoce en la técnica y se refiere al uso del enfoque isoeléctrico para separar los componentes de un producto proteico en solución en subpoblaciones con puntos isoeléctricos discretos. Las proteínas en solución están compuestas por una población de moléculas que tienen una cantidad variable de modificaciones químicas. En general, para enfoque isoeléctrico, se establece un gradiente de pH y se introduce una muestra de proteína que comprende una población de moléculas de proteína. Las moléculas de proteínas individuales en la población de muestra pueden migrar a un punto que se corresponde con su punto isoeléctrico individual (pI). El perfil isoeléctrico de un producto proteico se puede determinar utilizando técnicas conocidas en la materia, como la electroforesis de enfoque isoeléctrico, la electroforesis capilar o la electroforesis en gel. En algunos casos, un perfil isoeléctrico se refiere a la distribución de la población de sustancialmente todos los miembros de la población de proteínas de un producto proteico dentro de un gradiente de pH. En otros ejemplos, un perfil isoeléctrico se refiere a

un subconjunto de los miembros o a un subconjunto de las subpoblaciones de la población de proteínas de un producto proteico. Un perfil isoeléctrico puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o 6, o más subpoblaciones (por ejemplo, bandas de proteínas isoeléctricas) de un producto proteico, donde cada uno tiene un pI diferente. Cada banda en un perfil isoeléctrico representa una subpoblación de moléculas que tienen un pI que se corresponde con el pH en el punto del gradiente donde se encuentra la banda.

El término "proteína recombinante" se conoce en la materia y se refiere a una proteína fabricada usando un sistema de cultivo celular. Las células pueden provenir de cualquiera de una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de levadura o una célula bacteriana, donde en general, las células en el cultivo celular contienen un ácido nucleico introducido que codifica la proteína recombinante de interés. El ácido nucleico que codifica la proteína recombinante también puede contener un promotor heterólogo unido operativamente a un ácido nucleico que codifica la proteína.

La expresión "producto de proteína recombinante" se refiere a una composición que comprende una proteína recombinante fabricada usando un sistema de cultivo celular. En algunos casos, el producto puede incluir múltiples miembros de la proteína recombinante que poseen propiedades biofísicas ligeramente diferentes que surgen de modificaciones químicas y procesos de degradación, y dan como resultado subpoblaciones con puntos isoeléctricos discretos. Un producto de proteína recombinante puede ser, por ejemplo, proteína recombinante en un medio de cultivo tisular clarificado, una proteína recombinante purificada en un diluyente, o una mezcla de la proteína recombinante, medio de cultivo líquido y células de mamífero en un cultivo.

La expresión "biorreactor de producción", como se usa en el presente documento, se refiere a un recipiente adecuado para incubar un cultivo de células de mamífero en condiciones suficientes para el crecimiento 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. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de biorreactores de producción. Se conocen en la materia ejemplos adicionales de biorreactores de producción.

La frase "condiciones suficientes para producir un producto" se refiere a un conjunto de parámetros físicos, tal como la temperatura, oxígeno disuelto, composición de medios, tasa de mezcla y densidad celular, que permite la producción de una proteína recombinante por un cultivo de células de mamífero. En la materia se conocen ejemplos no limitantes de condiciones suficientes para producir un producto. Algunos ejemplos de condiciones suficientes para producir un producto se describen en el presente documento.

La expresión "fase de crecimiento" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un período de tiempo durante el cultivo de una célula de mamífero donde la densidad de células viables aumenta con el tiempo. Esto contrasta con la falta de cambio sustancial en la densidad de células viables observada con el tiempo durante la fase estacionaria o la disminución de la densidad de células viables observada con el tiempo durante la fase de disminución de un cultivo celular.

La expresión "fase estacionaria" se conoce en la materia del cultivo celular y se refiere a un período de tiempo en el cultivo celular en el que la densidad celular viable permanece sustancialmente igual.

La frase "fase de declive de las células de mamífero" como se usa en el presente documento se refiere a un período de tiempo en cultivo celular en el que la densidad de células viables comienza a disminuir.

La frase "analizar el producto", como se usa en el presente documento, se refiere a realizar un método analítico para determinar una o más propiedades físicas y/o funcionales del producto (por ejemplo, un producto de proteína recombinante). Ejemplos no limitantes de propiedades físicas incluyen peso molecular, secuencia proteica, perfil isoeléctrico, porcentaje de agregación, huella digital de glicosilación, fosforilación, acilación, fragmentación y desnaturalización. Ejemplos no limitativos de propiedades funcionales de un producto que pueden determinarse incluyen actividad enzimática, especificidad de unión y afinidad de unión.

La frase "condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico" se refiere a un conjunto de parámetros (por ejemplo, uno o más de tiempo, temperatura, pH, velocidad de agitación, CO<sub>2</sub>, temperatura, dO<sub>2</sub>, y/o reactivos presentes en el medio de cultivo de tejidos) que pueden usarse para cambiar (por ejemplo, un cambio ácido o un cambio básico) el perfil isoeléctrico del producto (por ejemplo, un producto de proteína recombinante).

La frase "cambio a un perfil más ácido" tal como se usa en el presente documento se refiere a la aplicación de condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto a un perfil más ácido en comparación con el perfil del producto en ausencia de aplicar esas condiciones.

La frase "cambio a un perfil más básico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación de condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto a un perfil más básico en comparación con el perfil del producto en ausencia de aplicar esas condiciones.

El término "punto de tiempo crítico", como se usa en el presente documento, se refiere a un punto de tiempo en el que

se reconoce que un cultivo celular (por ejemplo, un cultivo semicontinuo) comienza a deteriorarse significativamente en la viabilidad. Después de este punto, los atributos de calidad de la proteína recombinante pueden verse cada vez más afectados negativamente. Por ejemplo, después de los picos de densidad celular viables en un biorreactor semicontinuo, la densidad de células viables comenzará a disminuir. El punto temporal crítico puede estar relacionado con una cierta densidad de células viables en la fase de disminución del crecimiento celular. El punto temporal crítico puede basarse en el tiempo en que la densidad de células viables disminuye a una cierta densidad de células viables, por ejemplo,  $15 \times 10^5$  células/ml, en la fase de declive. De manera similar, para un proceso particular, el punto temporal crítico puede establecerse en otros valores, por ejemplo, el tiempo en que la densidad de células viables disminuye a una densidad de células viables como  $10 \times 10^5$  células/ml,  $11 \times 10^5$  células/ml,  $12 \times 10^5$  células/ml,  $13 \times 10^5$  células/ml,  $14 \times 10^5$  células/ml,  $16 \times 10^5$  células/ml,  $17 \times 10^5$  células/ml,  $18 \times 10^5$  células/ml,  $19 \times 10^5$  células/ml,  $20 \times 10^5$  células/ml,  $30 \times 10^5$  células/ml,  $40 \times 10^5$  células/ml, o  $50 \times 10^5$  células/ml, en la fase de declive.

El término "recipiente de almacenamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un recipiente cerrado que puede usarse para incubar un producto de proteína recombinante (por ejemplo, cualquiera de los productos de proteína recombinante descritos en el presente documento) bajo un conjunto de condiciones físicas que proporcionan un cambio en el perfil isoeléctrico del producto de proteína recombinante. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de condiciones físicas que proporcionan un cambio en el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante.

La expresión "clarificar un cultivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a eliminar o separar células de mamífero de un cultivo de células de mamífero para producir un medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células de mamífero (es decir, un medio de cultivo tisular clarificado). En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de métodos para clarificar un cultivo. En la materia se conocen métodos adicionales para clarificar un cultivo.

La expresión "medio de cultivo tisular clarificado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un medio de cultivo líquido usado en un cultivo celular que ha sido procesado, de tal manera que está sustancialmente libre de células de mamíferos.

La expresión "albúmina de suero bovino de Nueva Zelanda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína sérica derivada de un bovino nacido y criado en Nueva Zelanda (por ejemplo, un bovino nacido y criado en una población libre de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) u otra enfermedad priónica conocida). Los profesionales expertos apreciarán que dicha albúmina sérica esté disponible comercialmente.

La expresión "célula de mamífero" se refiere a cualquier célula de o derivada 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 indiferenciada.

La expresión "sustancialmente libre" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición (por ejemplo, un medio de cultivo líquido) que está al menos o aproximadamente libre al 90 %, o aproximadamente al 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o al menos o aproximadamente libre al 99 %, o aproximadamente libre al 100 % de una sustancia específica.

La expresión "cultivo" o "cultivo de células", tal como se usa en el presente documento, se refiere al mantenimiento o a la proliferación de una célula de mamífero en un medio de cultivo líquido en un conjunto de condiciones físicas controladas.

La expresión "medio de cultivo líquido" o "medio de cultivo" se refiere a un fluido que contiene suficientes nutrientes para permitir que una célula de mamífero crezca *in vitro* en el medio. 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 metales traza necesarios, y bicarbonato de sodio. Un medio de cultivo líquido puede incluir suero o componentes de suero de un mamífero. En algunos casos, un medio de cultivo líquido no contiene suero u otro extracto de un mamífero (un medio de cultivo líquido definido químicamente). Un medio de cultivo líquido puede contener metales traza, una hormona de crecimiento de mamíferos y/o un factor de crecimiento de mamíferos. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de medio de cultivo líquido y se conocen ejemplos adicionales en la materia y están disponibles comercialmente.

La expresión "medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animales" se refiere a un medio de cultivo líquido que no contiene ningún componente (por ejemplo, proteínas o suero) derivado de un animal.

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

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

animal.

La expresión "medio de cultivo líquido definido químicamente" 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, albúmina de suero bovino, o albúmina de suero humano, ya que estas preparaciones suelen contener una mezcla compleja de albúminas y lípidos.

La expresión "medio de cultivo líquido sin proteínas" se refiere a un medio de cultivo líquido que no contiene ninguna proteína (por ejemplo, ninguna proteína detectable).

"Agitación rotatoria" es un término bien conocido en la materia y se refiere a la agitación de un cultivo en un biorreactor (por ejemplo, un biorreactor de producción) de una manera generalmente circular, por ejemplo, en sentido horario o en sentido antihorario, con el fin de, por ejemplo, aumentar la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el cultivo en el biorreactor. La agitación se puede realizar usando cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, un instrumento que mueve el cultivo en un movimiento circular o elipsoidal, como un impulsor. Los dispositivos ejemplares que se pueden usar para realizar agitación rotatoria son conocidos en la materia y están disponibles comercialmente.

El término "inmunoglobulina" se refiere a un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 15 aminoácidos (por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos, o más de 100 aminoácidos) de una proteína de inmunoglobulina (por ejemplo, una secuencia de dominio variable, una secuencia marco, o una secuencia de dominio constante). La inmunoglobulina puede, por ejemplo, incluir al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena ligera, por ejemplo, al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena pesada, tal como una CDRH3. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo aislado (por ejemplo, una IgG, IgE, IgD, IgA o IgM). La inmunoglobulina puede ser una subclase de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). La inmunoglobulina puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, o un scFv. La inmunoglobulina también puede ser un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo trispecífico, o un anticuerpo dímero, trímero o multímero, o un díacuerpo, un DVD-Ig, un CODV-Ig, un Affibody® o un Nanobody®. La inmunoglobulina también puede ser una proteína genomanipulada que contiene al menos un dominio de inmunoglobulina (por ejemplo, una proteína de fusión). En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de inmunoglobulinas y en la materia se conocen ejemplos adicionales de inmunoglobulinas.

La expresión "fragmento de proteína" o "fragmento de polipéptido" se refiere a una porción de una secuencia de polipéptidos que es de al menos o aproximadamente 4 aminoácidos, al menos o aproximadamente 5 aminoácidos, al menos o aproximadamente 6 aminoácidos, al menos o aproximadamente 7 aminoácidos, al menos o aproximadamente 8 aminoácidos, al menos o aproximadamente 9 aminoácidos, al menos o aproximadamente 10 aminoácidos, al menos o aproximadamente 11 aminoácidos, al menos o aproximadamente 12 aminoácidos, al menos o aproximadamente 13 aminoácidos, al menos o aproximadamente 14 aminoácidos, al menos o aproximadamente 15 aminoácidos, al menos o aproximadamente 16 aminoácidos, al menos o aproximadamente 17 aminoácidos, al menos o aproximadamente 18 aminoácidos, al menos o aproximadamente 19 aminoácidos, o al menos o aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, o más de 20 aminoácidos de longitud.

El término "proteína genomanipulada" se refiere a un polipéptido que no está codificado de forma natural por un ácido nucleico endógeno presente dentro de un organismo (por ejemplo, un mamífero). Los ejemplos de proteínas modificadas genéticamente incluyen enzimas modificadas con una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones, inserciones o adiciones que dan como resultado un aumento en la estabilidad y/o en la actividad catalítica de la enzima modificada, proteínas de fusión, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos divalentes, anticuerpos trivalentes, anticuerpos de cuatro dominios de unión, un díacuerpo y proteínas de unión a antígeno que contienen al menos una secuencia de andamiaje recombinante.

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 celular o lisado de cultivo celular. Se puede especificar el alcance de la purificación, tal como al menos o aproximadamente el 5 %, por ejemplo, al menos o alrededor del 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o al menos o aproximadamente el 95 % al 99,9 % puro en peso. Los métodos no limitantes para recuperar una proteína de un medio de cultivo líquido o de un lisado de células de mamífero se describen en el presente documento y se conocen otros en la materia.

La expresión "proteína secretada" o "proteína recombinante secretada" se refiere a una proteína recombinante que originalmente incluía una secuencia de señal de secreción cuando se traduce dentro de una célula de mamífero. La secuencia señal generalmente se elimina a través de la escisión enzimática en la célula de mamífero y la proteína se libera en el espacio extracelular (por ejemplo, un medio de cultivo líquido).

La frase "perfusión en gradiente", como se usa en el presente documento, se refiere al cambio escalonado (por ejemplo, aumento o disminución) en el volumen de medio de cultivo eliminado y agregado a un cultivo celular inicial durante periodos de tiempo escalonados. Los periodos pueden ser aproximadamente un período de 24 horas, o un período de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas, o un período de más de 24 horas) durante

el primer período de tiempo en un método de cultivo que utiliza el cultivo de perfusión (por ejemplo, la tasa de realimentación del medio de cultivo a diario). La fracción de medios eliminados y reemplazados cada día puede variar dependiendo de las células particulares que se cultivan, la densidad inicial de siembra y la densidad celular en un momento particular.

5 La expresión "cultivo celular semicontinuo" o "cultivo semicontinuo" significa la adición escalonada o continua de un segundo medio de cultivo (por ejemplo, medio de cultivo líquido o sólido) a un cultivo celular inicial sin eliminación sustancial o significativa del primer medio de cultivo líquido del cultivo celular. En algunos casos, el segundo medio de cultivo líquido es el mismo que el primer medio de cultivo líquido. En otros ejemplos, el segundo medio de cultivo líquido es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido y/o se añade como un polvo seco.

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

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

20 Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la presente invención; otros, métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica también pueden usarse. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

25 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.

### 30 Descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico del porcentaje de intensidad de banda para cada banda en el perfil isoelectrico de ecilizumab producido por una primera ejecución de cultivo semicontinuo realizado usando un biorreactor de 10.000 litros desde el día 5 hasta el día 13.

La Figura 2 es otro gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda en el perfil isoelectrico de ecilizumab producido por una primera ejecución de cultivo semicontinuo realizada en un biorreactor de 10.000 litros desde el día 5 hasta el día 13.

La Figura 3 es un gráfico del porcentaje de intensidad de banda para cada banda en el perfil isoelectrico de ecilizumab producido por una segunda ejecución de cultivo semicontinuo realizada usando un biorreactor de 10.000 litros desde el día 5 hasta el día 12.

La Figura 4 es otro gráfico del porcentaje de intensidad de banda para cada banda en el perfil isoelectrico de ecilizumab producido por una segunda ejecución de cultivo semicontinuo realizada usando un biorreactor de 10.000 litros desde el día 5 hasta el día 12.

45 La Figura 5 es un gráfico de la densidad de células viables a lo largo del tiempo en ejecuciones de cultivo semicontinuo realizadas usando un biorreactor de 2 litros y una de las siguientes combinaciones de pH y dO<sub>2</sub>: pH 7,0 y dO<sub>2</sub> del 15 %; pH 7,32 y dO<sub>2</sub> del 50 %; pH 7,32 y dO<sub>2</sub> del 5 %; pH 6,95 y dO<sub>2</sub> del 50 %; y pH 6,95 y dO<sub>2</sub> del 5 %. Se muestran los datos medios (n = 2).

La Figura 6 es un gráfico que compara los mg/l de ecilizumab producidos por cultivos semicontinuos en biorreactor de 2 litros en comparación con la concentración integral de células viables en los mismos cultivos. Las diferentes ejecuciones de cultivo semicontinuo en biorreactor de 2 litros se realizaron usando un biorreactor de 2 litros y una de las siguientes combinaciones de pH y dO<sub>2</sub>: pH 7,0 y dO<sub>2</sub> del 15 %; pH 7,32 y dO<sub>2</sub> del 50 %; pH 7,32 y dO<sub>2</sub> del 5 %; pH 6,95 y dO<sub>2</sub> del 50 %; y pH 6,95 y dO<sub>2</sub> del 5 %. Se muestran los datos medios (n = 2).

La Figura 7 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoelectrico de ecilizumab recolectado de una ejecución de cultivo semicontinuo realizado usando un biorreactor de 2 litros, un pH de 7,0 y una dO<sub>2</sub> del 15 % en el día 10, en el día 12, en el día 14 y en el día 16 del cultivo.

La Figura 8 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoelectrico de ecilizumab recolectado de una ejecución de cultivo semicontinuo realizado usando un biorreactor de 2 litros, un pH de 7,32 y una dO<sub>2</sub> del 5 % en el día 10, en el día 12, en el día 14 y en el día 16 del cultivo.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoelectrico de ecilizumab recolectado de una ejecución de cultivo semicontinuo realizado usando un biorreactor de 2 litros, un pH de 6,95 y una dO<sub>2</sub> del 50 % en el día 5, en el día 8, en el día 10 y en el día 14 del cultivo.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un

perfil isoeléctrico de ecilizumab recolectado de una ejecución de cultivo semicontinuo realizado usando un biorreactor de 2 litros, un pH de 7,32 y una dO<sub>2</sub> del 50 % en el día 10, en el día 12, en el día 14 y en el día 16 del cultivo.

La Figura 11 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoeléctrico de ecilizumab recolectado de ejecuciones de cultivos semicontinuos realizados utilizando un biorreactor de 2 litros y una de las siguientes combinaciones de pH y dO<sub>2</sub>: pH de 7,32 y dO<sub>2</sub> del 5 %, pH de 7,32 y una dO<sub>2</sub> del 50 %, pH de 7,0 y una dO<sub>2</sub> del 15 %, y pH de 6,95 y dO<sub>2</sub> del 50 %, en el día 14 de cada cultivo, respectivamente.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la densidad de células viables a lo largo del tiempo en ejecuciones de cultivo semicontinuo realizadas utilizando un biorreactor de 2 litros y una de las siguientes combinaciones de fuente celular y materia prima: células de origen A y primer conjunto de materias primas (Ejecución de cultivo celular 11); células de origen B y primer conjunto de materias primas (Ejecución de cultivo celular 12); células de origen A y segundo conjunto de materias primas (Ejecuciones de cultivo celular 14 y 15); y células de origen B y segundo conjunto de materias primas (Ejecuciones de cultivo celular 13, 16, 17 y 18).

La Figura 13 es un gráfico que muestra el porcentaje de viabilidad celular a lo largo del tiempo en ejecuciones de cultivos semicontinuos realizadas usando un biorreactor de 2 litros y una de las siguientes combinaciones de fuente celular y materia prima: células de origen A y primer conjunto de materias primas (Ejecución de cultivo celular 11); células de origen B y primer conjunto de materias primas (Ejecución de cultivo celular 12); células de origen A y segundo conjunto de materias primas (Ejecuciones de cultivo celular 14 y 15); y células de origen B y segundo conjunto de materias primas (Ejecuciones de cultivo celular 13, 16, 17 y 18).

La Figura 14 es un gráfico que muestra la productividad (mg de ecilizumab/l en comparación con la concentración integral de células viables) en ejecuciones de cultivo semicontinuo realizadas usando un biorreactor de 2 litros y una de las siguientes combinaciones de fuente celular y materia prima: células de origen A y primer conjunto de materias primas (Ejecución de cultivo celular 11); células de origen B y primer conjunto de materias primas (Ejecución de cultivo celular 12); células de origen A y segundo conjunto de materias primas (Ejecuciones de cultivo celular 14 y 15); y células de origen B y segundo conjunto de materias primas (Ejecuciones de cultivo celular 13, 16, 17 y 18).

La Figura 15 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoeléctrico de ecilizumab recolectado de un ciclo de cultivo semicontinuo (Ejecución de cultivo celular 11) realizado usando un biorreactor de 2 litros, células de origen A, y el primer conjunto de materias primas en el día 8, en el día 11, en el día 14, en el día 15 y en el día 16 del cultivo.

La Figura 16 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoeléctrico de ecilizumab recolectado de un ciclo de cultivo semicontinuo (Ejecución de cultivo celular 12) realizado usando un biorreactor de 2 litros, células de origen B, y el primer conjunto de materias primas en el día 8, en el día 11, en el día 14, en el día 15 y en el día 16 del cultivo.

La Figura 17 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoeléctrico de ecilizumab recolectado de un ciclo de cultivo semicontinuo (Ejecución de cultivo celular 13) realizado usando un biorreactor de 2 litros, células de origen B, y el segundo conjunto de materias primas en el día 13, en el día 14, en el día 15 y en el día 16 del cultivo.

La Figura 18 es un gráfico que muestra el porcentaje de intensidad de banda para cada banda de proteína en un perfil isoeléctrico de ecilizumab recolectado de un ciclo de cultivo semicontinuo (Ejecución de cultivo celular 14) realizado usando un biorreactor de 2 litros, células de origen A, y el segundo conjunto de materias primas en el día 13, en el día 14, en el día 15 y en el día 16 del cultivo.

#### 45 Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan métodos para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante. Los métodos descritos en el presente documento pueden lograr un producto de proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico deseado. Por ejemplo, una proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico deseado puede tener uno o más de: una carga neta óptima (por ejemplo, carga superficial neta), un nivel de precipitación reducido (en comparación con la misma proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico diferente al mismo pH), una elevada solubilidad en un fluido deseado (en comparación con la misma proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico diferente en el mismo fluido y en las mismas condiciones), una elevada actividad biológica (por ejemplo, unión a un sustrato, diana o antígeno, especificidad de unión, o actividad enzimática en comparación con la misma proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico diferente y analizado en las mismas condiciones), un elevado nivel de proteína plegada adecuadamente en el producto de proteína recombinante (en comparación con el nivel de proteína plegada adecuadamente en la misma proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico diferente cuando se analiza en las mismas condiciones), y una tasa de eliminación reducida en el cuerpo de un ser humano (en comparación con la tasa de eliminación de la misma proteína recombinante que tiene un perfil isoeléctrico diferente, cuando se analiza en las mismas condiciones). A continuación se describen aspectos no limitantes de los métodos de cambio del perfil isoeléctrico de un producto proteico recombinante. Cualquiera de los aspectos descritos a continuación se puede usar en cualquier combinación o con cualquier otro elemento conocido en la materia.

#### 65 Perfiles isoeléctricos y métodos para determinar el perfil isoeléctrico

Un perfil isoeléctrico se refiere a la naturaleza ácida y/o básica de al menos una subpoblación de la población de

proteínas de un producto de proteína. Un perfil isoeléctrico también puede referirse a la cantidad de proteína en una o más subpoblaciones en un producto de proteína. En algunos ejemplos, el perfil isoeléctrico se refiere a la naturaleza ácida y/o básica de al menos dos subpoblaciones de proteínas de un producto de proteína (por ejemplo, un producto de proteína recombinante), en donde cada una de las al menos dos subpoblaciones de proteínas tiene un punto isoeléctrico diferente en comparación con otras subpoblaciones de proteínas en el producto de proteína. Un perfil isoeléctrico puede referirse a la naturaleza ácida y/o básica de todas las subpoblaciones de proteínas detectadas en un producto de proteína recombinante, o un perfil isoeléctrico puede referirse a la naturaleza ácida y/o básica de un subconjunto de al menos 2 de las subpoblaciones de proteínas detectadas para un producto de proteína recombinante. Por ejemplo, un perfil isoeléctrico puede referirse a la naturaleza ácida y/o básica de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 subpoblaciones de proteínas. Dichas subpoblaciones de proteínas se denominan bandas en un gel de enfoque isoeléctrico.

Los ejemplos no limitantes de un perfil isoeléctrico de eculizumab contienen siete u ocho subpoblaciones de proteínas que tienen puntos isoeléctricos de entre aproximadamente 5,45 y aproximadamente 6,55, según lo determinado por electroforesis de enfoque isoeléctrico. En los ejemplos se describe un ejemplo adicional de un perfil isoeléctrico de referencia para eculizumab.

En la materia se conocen los métodos para determinar un perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante. Por ejemplo, la electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico (por ejemplo, electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico capilar) y microplacas se conocen en la materia (véase, por ejemplo, los métodos descritos en Greene et al., *Methods Biochem. Anal.* 54:379-409, 2011; Friedman et al., *Methods Enzymol.* 463:515-540, 2009; Koshel et al., *Proteomics* 12:2918-2926, 2012; Sommer et al., *Electrophoresis* 30:742-757, 2009; Shimura et al., *Electrophoresis* 30:11-28, 2009). En la materia se conocen métodos adicionales para determinar el perfil isoeléctrico de una proteína recombinante. Los ensayos para determinar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante pueden incluir el rendimiento de la electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico (por ejemplo, electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico capilar). Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir uno o más etapas para determinar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante en uno o más puntos de tiempo (por ejemplo, al final del primer período de tiempo, al final del segundo período de tiempo, o en uno o más puntos de tiempo durante el segundo período de tiempo). En algunas realizaciones, el producto de proteína recombinante se purifica antes del análisis del perfil isoeléctrico. La proteína recombinante puede purificarse a partir de un medio de cultivo tisular o un medio de cultivo tisular clarificado. En algunos ejemplos, el producto de proteína recombinante se almacena a una temperatura de aproximadamente 15 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 4 °C, 0 °C, -20 °C, -70 °C o -80 °C durante un período de tiempo. El tiempo de almacenamiento suele ser de menos de 24 horas, menos de 48 horas, menos de 3 días, menos de 4 días o menos de una semana, antes de realizar un ensayo para determinar el perfil isoeléctrico del producto de proteína recombinante.

Un perfil isoeléctrico de referencia en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede ser un perfil isoeléctrico antes de incubar en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido o un perfil más básico o un perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante que tenga una o más propiedades biofísicas más beneficiosas. Las propiedades biofísicas beneficiosas pueden incluir una mayor solubilidad, aumento de la actividad enzimática o de unión, mayor semivida *in vivo* y reducción de la eliminación *in vivo*. En el presente documento se describe un ejemplo no limitante de un perfil isoeléctrico de referencia para eculizumab.

#### **Cultivo de células de mamíferos**

Los métodos descritos en el presente documento incluyen una etapa de cultivo de células de mamífero que incluye un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo. Por ejemplo, el primer período de tiempo comprende, consiste, o consiste esencialmente en una fase de proliferación y una fase estacionaria. El primer período de tiempo generalmente incluye una fase de proliferación y una fase estacionaria. En algunas realizaciones, el primer período de tiempo incluye una parte de la fase de disminución de la proliferación. En algunas realizaciones, las células de mamífero se cultivan en condiciones suficientes para producir el producto y promover la división de las células de mamífero durante el primer período de tiempo. A continuación se describen ejemplos no limitantes de los aspectos del cultivo de células de mamífero que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

#### **Cultivo semicontinuo**

La etapa de cultivo en los métodos descritos en el presente documento puede incluir el cultivo semicontinuo. Tal como se conoce en la técnica, el cultivo semicontinuo incluye la adición escalonada o continua de un segundo medio de cultivo a un cultivo celular inicial sin una eliminación sustancial o significativa del primer medio de cultivo líquido del cultivo celular. En algunos casos, el segundo medio de cultivo es el mismo que el primer medio de cultivo líquido. El segundo medio de cultivo puede estar en forma líquida o en polvo seco. En otros ejemplos, el segundo medio de cultivo es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido y/o se agrega como un polvo seco.

El segundo medio de cultivo se puede agregar al cultivo celular inicial en un punto de tiempo específico o en múltiples

puntos de tiempo durante el primer período de tiempo. Por ejemplo, el segundo medio de cultivo se puede agregar al cultivo celular inicial en un punto de tiempo que es 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 2 días y aproximadamente 2 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 3 días y aproximadamente 3 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 2 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, después del inicio del primer período de tiempo.

El segundo medio de cultivo puede agregarse de manera continua al cultivo celular inicial, o puede agregarse periódicamente (por ejemplo, diariamente) al cultivo celular inicial durante el primer período de tiempo. En algunos ejemplos, cuando el segundo medio de cultivo se agrega periódicamente al cultivo celular inicial, el segundo medio de cultivo se puede agregar una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o seis veces. El volumen de un segundo medio de cultivo líquido o la cantidad de un segundo medio de cultivo sólido añadido al cultivo celular inicial puede cambiar (por ejemplo, aumentar) durante el primer período de tiempo. El volumen de un segundo medio de cultivo líquido agregado al cultivo celular inicial durante cualquier período de 24 horas en el primer período de tiempo puede ser una fracción del volumen inicial del biorreactor. El volumen de un segundo medio de cultivo líquido agregado al cultivo celular inicial durante cualquier período de 24 horas en el primer período de tiempo puede estar entre 0,01 X y aproximadamente 0,3 X el volumen del biorreactor. La fracción puede estar entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,28 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,26 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,24 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,22 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,20 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,18 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,16 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,14 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,12 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,10 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,08 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,06 X, entre aproximadamente 0,01 X y aproximadamente 0,04 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,3 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,28 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,26 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,24 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,22 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,20 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,18 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,16 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,14 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,12 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,10 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,08 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,06 X, entre aproximadamente 0,025 X y aproximadamente 0,04 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,3 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,28 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,26 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,24 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,22 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,20 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,18 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,16 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,14 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,12 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,10 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,08 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,06 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,04 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,28 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,26 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,24 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,22 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,20 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,18 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,16 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,14 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,12 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,10 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,08 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,06 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,04 X, entre aproximadamente 0,15 X y aproximadamente 0,3 X, entre aproximadamente 0,15 X y aproximadamente 0,2 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,3 X, o entre aproximadamente 0,25 X y aproximadamente 0,3 X, del volumen del biorreactor.

En otras realizaciones, el volumen de un segundo medio de cultivo líquido agregado al cultivo celular inicial durante cualquier período de 24 horas en el primer período de tiempo puede estar entre 0,02 X y aproximadamente 1,0 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,9 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,8 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,7 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,6 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,5 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,4 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,3 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,2 X, entre aproximadamente 0,02 X y aproximadamente 0,1 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 1,0 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,8 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,7 X,

entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,6 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,5 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,4 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,3 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,2 X, entre aproximadamente 0,05 X y aproximadamente 0,1 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 1,0 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,9 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,8 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,7 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,6 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,5 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,4 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,3 X, entre aproximadamente 0,1 X y aproximadamente 0,2 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 1,0 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,9 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,8 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,7 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,6 X, entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,5 X, o entre aproximadamente 0,2 X y aproximadamente 0,4 X del volumen del cultivo celular inicial, al comienzo del primer período de tiempo.

Cuando el cultivo semicontinuo se usa en los presentes métodos, el primer período de tiempo puede ser entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 12 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 11 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 10 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 8 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 12 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 11 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 10 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 8 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 6 días y aproximadamente 12 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 11 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 10 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 8 días, entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 12 días, entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 11 días, entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 10 días, entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 8 días y aproximadamente 12 días, entre aproximadamente 8 días y aproximadamente 11 días, entre aproximadamente 8 días y aproximadamente 10 días, entre aproximadamente 9 días y aproximadamente 12 días, entre aproximadamente 9 días y aproximadamente 11 días, o entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 12 días.

**Cultivo de perfusión**

La etapa de cultivo en los métodos descritos en el presente documento puede ser el cultivo de perfusión. Tal como se conoce en la técnica, el cultivo de perfusión incluye la eliminación de un biorreactor de producción de un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido y la adición al biorreactor de producción de un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido, en donde el primer volumen y el segundo volumen son aproximadamente iguales. Las células de mamíferos se retienen en el biorreactor mediante algún dispositivo de retención celular o mediante técnicas, tales como el asentamiento celular en un cono de asentamiento. La eliminación y adición de medios en el cultivo de perfusión se puede realizar de forma simultánea o secuencial, o alguna combinación de los dos. Además, la eliminación y la adición se pueden realizar de forma continua, tal como a una velocidad que elimina y reemplaza un volumen de entre el 0,1 % y el 800 %, entre el 1 % y el 700 %, entre el 1 % y el 600 %, entre el 1 % y el 500 %, entre el 1 % y el 400 %, entre el 1 % y el 350 %, entre el 1 % y el 300 %, entre el 1 % y el 250 %, entre el 1 % y el 100 %, entre el 100 % y el 200 %, entre el 5 % y el 150 %, entre el 10 % y el 50 %, entre el 15 % y el 40 %, entre el 8 % y el 80 %, o entre el 4 % y el 30 % del volumen del biorreactor de producción.

El primer volumen del primer medio de cultivo líquido eliminado y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido agregado se puede mantener en algunos casos aproximadamente igual durante cada período de 24 horas. Tal como se conoce en la técnica, la velocidad a la que se elimina el primer volumen del primer medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la que se agrega el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) puede variar y depende sobre las condiciones del sistema de cultivo celular particular. La velocidad a la que se elimina el primer volumen del primer medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) y la velocidad a la que se agrega el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido (volumen/unidad de tiempo) puede ser aproximadamente la misma o puede ser diferente.

Como alternativa, el volumen eliminado y agregado puede cambiar al aumentar gradualmente durante cada período de 24 horas. Por ejemplo, el volumen del primer medio de cultivo líquido eliminado y el volumen del segundo medio de cultivo líquido agregado dentro de cada período de 24 horas puede aumentar durante el período de cultivo. Se puede aumentar el volumen durante el primer período de tiempo desde un volumen que está entre el 0,5 % y aproximadamente el 20 % del volumen del biorreactor de producción. Se puede aumentar el volumen durante el primer período de tiempo hasta aproximadamente el 25 % hasta aproximadamente el 150 % del volumen del biorreactor de producción o el primer volumen del medio de cultivo líquido.

En algunos ejemplos de los métodos descritos en el presente documento, después de las primeras 48 a 96 horas del primer período de tiempo, en cada período de 24 horas (dentro del primer período de tiempo), el primer volumen del primer medio de cultivo líquido eliminado y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido agregado es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 %, de

aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 40 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 50 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 70 % del volumen del primer medio de cultivo líquido.

Los expertos en la materia apreciarán que el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser el mismo tipo de medio. En otros ejemplos, el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser diferentes. El segundo medio de cultivo líquido puede estar más concentrado con respecto a uno o más componentes del medio.

El primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse utilizando cualquier sistema automatizado. Por ejemplo, se puede usar filtración de flujo tangencial alterna. Como alternativa, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse mediante filtración o flujo por gravedad del primer volumen del primer medio de cultivo líquido a través de una membrana estéril con un umbral de peso molecular que excluye la célula de mamífero. Como alternativa, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse deteniendo o disminuyendo significativamente la velocidad de agitación durante un período de al menos 1 minuto, al menos 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, o 1 hora, y eliminando o aspirando el primer volumen del primer medio de cultivo líquido desde la parte superior del biorreactor de producción.

El segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido puede agregarse al primer medio de cultivo líquido mediante una bomba. El segundo medio de cultivo líquido se puede agregar al primer medio de cultivo líquido manualmente, tal como pipeteando o inyectando el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido directamente sobre el primer medio de cultivo líquido o de manera automatizada.

#### ***Primer período de tiempo***

En los métodos descritos en el presente documento, las células de mamífero que incluyen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante se cultivan en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo. En algunas realizaciones, el primer período de tiempo consiste en una fase de proliferación, o consiste en la fase de proliferación y la fase estacionaria de las células de mamíferos. En algunas realizaciones, el primer período de tiempo consiste en la fase de proliferación, la fase estacionaria, y una parte de la fase de disminución de las células de mamíferos que se cultivan. En otros ejemplos, el primer período de tiempo incluye la fase de proliferación de las células de mamíferos y termina en un punto temporal crítico. En la materia se conocen ejemplos no limitantes de un punto de tiempo crítico. Por ejemplo, punto temporal crítico es un punto temporal en el cual el cultivo celular comienza a deteriorarse significativamente en la viabilidad y puede causar un deterioro en los atributos críticos de calidad de la proteína recombinante. En otro ejemplo, un punto temporal crítico puede ser un tiempo en el que el producto de proteína recombinante en el medio de cultivo o cultivo celular comienza a deteriorarse significativamente en un atributo de calidad particular, tal como el aumento de la formación de productos de degradación, aumento de la desnaturalización, aumento de la formación de glucoformas no deseadas, aumento de la formación de agregados y/o pérdida de actividad biológica. Los métodos para detectar y determinar un punto de tiempo crítico para un cultivo celular dependen de la proteína que se produce y del uso previsto del producto de proteína. Por ejemplo, los métodos para detectar productos de degradación de proteínas, proteína recombinante desnaturalizada, los agregados de proteínas recombinantes y la actividad biológica de proteínas recombinantes son bien conocidos en la materia.

En ejemplos no limitantes, el punto temporal crítico es de entre aproximadamente 5 días a aproximadamente 12 días, de entre aproximadamente 5 días a aproximadamente 11 días, de entre aproximadamente 5 días a aproximadamente 10 días, de entre aproximadamente 5 días a aproximadamente 9 días, de entre aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 días, de entre aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días, de entre aproximadamente 6 días a aproximadamente 12 días, de entre aproximadamente 6 días a aproximadamente 11 días, de entre aproximadamente 6 días a aproximadamente 10 días, de entre aproximadamente 6 días a aproximadamente 9 días, de entre aproximadamente 6 días a aproximadamente 8 días, de entre aproximadamente 7 días a aproximadamente 12 días, de entre aproximadamente 7 días a aproximadamente 11 días, de entre aproximadamente 7 días a aproximadamente 10 días, de entre aproximadamente 7 días a aproximadamente 9 días, de entre aproximadamente 8 días a aproximadamente 12 días, de entre aproximadamente 8 días a aproximadamente 11 días, de entre aproximadamente 8 días a aproximadamente 10 días, de entre aproximadamente 9 días a aproximadamente 12 días, de entre aproximadamente 9 días a aproximadamente 11 días, o de entre aproximadamente 8 días a aproximadamente 10 días, después del inicio del primer período de tiempo. Los ejemplos adicionales de puntos temporales críticos se describen en los Ejemplos.

#### ***Células de mamífero***

Las células de mamífero que se cultivan en los métodos descritos en el presente documento pueden ser una variedad

- de células de mamífero diferentes. En algunos ejemplos, la célula de mamífero es una célula adherente y el cultivo celular incluye microvehículos. En algunos ejemplos, la célula de mamífero puede ser una célula que crece en suspensión. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden cultivarse usando los métodos descritos en el presente documento incluyen: células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células CHO DG44, células CHO-K1s), células de mieloma Sp2/0, otras células de mieloma, tales como las células NS/0, linfocitos B, células de hibridoma, linfocitos T, células de riñón de embrionario humano (HEK) (por ejemplo, HEK 293E y HEK 293F), Células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero) y células epiteliales de riñón de Madin-Darby Canine (MDCK) (Cocker Spaniel). Las células de mamífero adicionales que pueden cultivarse usando los métodos descritos en el presente documento se conocen en la materia. En ejemplos no limitantes de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la densidad celular de las células de mamíferos presentes en el biorreactor de producción al comienzo del primer período de tiempo es de aproximadamente  $0,1 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml, aproximadamente  $0,2 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,4 \times 10^6$  células/ml, o aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml.
- Las células de mamífero utilizadas en los métodos descritos en el presente documento pueden contener un ácido nucleico recombinante que se integra de manera estable en el genoma de la célula de mamífero y codifica una proteína recombinante. En algunas realizaciones, la proteína recombinante es secretada por la célula de mamífero en el medio de cultivo tisular. En algunos casos, las células de mamífero cultivadas provienen de un cultivo de semillas. Más en particular, el cultivo celular inicial es el resultado de un proceso de tren de semillas o un cultivo de otro biorreactor de producción.

### **Medio de cultivo**

- Los medios de cultivo líquidos que pueden usarse en la etapa de cultivo se conocen en la materia. El medio de cultivo líquido puede complementarse con un suero de mamífero o un componente de suero de mamífero, tal como una hormona de crecimiento o un factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico). El suero o el componente sérico de mamífero puede ser suero bovino fetal y puede provenir exclusivamente del suero bovino de Nueva Zelanda. Como alternativa, el medio de cultivo líquido puede ser un medio de cultivo líquido definido químicamente, un medio de cultivo líquido sin componentes de origen animal, un medio de cultivo líquido sin suero, o un medio de cultivo líquido que contiene suero. Los ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos definidos químicamente, medios de cultivo líquidos sin componentes de origen animal, los medios de cultivo líquidos sin suero y los medios de cultivo líquidos que contienen suero están disponibles comercialmente.

- Un medio de cultivo líquido generalmente contiene una fuente de energía de un carbohidrato, tal como glucosa, aminoácidos (por ejemplo, el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína), vitaminas, ácidos grasos libres, oligoelementos y otros compuestos orgánicos necesarios a bajas concentraciones. El medio de cultivo líquido puede complementarse con sales y tampones (por ejemplo, sales de calcio, 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 líquidos que pueden ser útiles en los métodos descritos actualmente 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 de fusión CD CHO Ex-cell (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO) y medio PowerCHO (Lonza Group, Ltd.; Basel, Suiza). Los componentes del medio que también pueden ser útiles en los presentes métodos incluyen, pero sin limitación, hidrolizados químicamente definidos (CD, del inglés *chemically-defined*), por ejemplo, Peptona CD, Polipéptidos CD (dos o más aminoácidos) y factores de crecimiento CD. En la materia se conocen ejemplos adicionales de medio de cultivo tisular líquido y componentes del medio.

- Los medios de cultivo utilizados en el cultivo de las células de mamíferos pueden tener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, 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 6,6 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 6,7 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 7,0, 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 7,0 y aproximadamente 7,5, 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 7,1 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 utilizado en el cultivo puede ser el mismo o puede cambiar durante el primer periodo de tiempo dependiendo de las condiciones del cultivo celular.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo añadido a un cultivo semicontinuo puede ser una composición sólida. En la materia se conocen ejemplos de medios de cultivo sólidos que se pueden agregar a un cultivo semicontinuo.

### 15 **Agitación**

El cultivo de una célula de mamífero normalmente incluye alguna forma de agitación para mezclar el cultivo. Por ejemplo, la agitación utilizada en el cultivo puede ser la agitación rotatoria utilizando un impulsor. La agitación puede tener lugar a una frecuencia de aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 500 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y 480 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 460 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 440 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 420 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 300 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 260 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 240 RPM, entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 220 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 500 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 480 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 460 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 440 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 420 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 300 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 240 RPM y aproximadamente 260 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 500 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 480 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 460 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 440 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 420 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 300 RPM, entre aproximadamente 260 RPM y aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 500 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 480 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 460 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 440 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 420 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 300 RPM, entre aproximadamente 280 RPM y aproximadamente 500 RPM, entre aproximadamente 380 RPM y aproximadamente 480 RPM, entre aproximadamente 380 RPM y aproximadamente 460 RPM, entre aproximadamente 380 RPM y aproximadamente 440 RPM, entre aproximadamente 380 RPM y aproximadamente 420 RPM, entre aproximadamente 380 RPM y aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 400 RPM y aproximadamente 480 RPM, entre aproximadamente 400 RPM y aproximadamente 460 RPM, entre aproximadamente 400 RPM y aproximadamente 440 RPM, o entre aproximadamente 400 RPM y aproximadamente 420 RPM. La agitación se puede realizar de forma continua o periódica.

### **Temperatura**

La etapa de cultivo descrita en el presente documento puede realizarse a una temperatura de 32 °C a aproximadamente 39 °C, aproximadamente 32 °C a aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 34 °C y aproximadamente 37 °C, o entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 37 °C. Por ejemplo, las células de mamíferos pueden incubarse a una temperatura de aproximadamente 37 °C desde el principio hasta el final del primer periodo de tiempo. Los expertos en la materia apreciarán que la temperatura se puede cambiar o puede variar ligeramente durante el primer periodo de tiempo, por ejemplo, por hora o por día. Por ejemplo, la temperatura se puede cambiar o desplazarse (por ejemplo, aumentar o disminuir) aproximadamente en 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 del inicio del primer período de tiempo, o en cualquier momento dentro del primer período de tiempo. Por ejemplo, la temperatura puede desplazarse hacia arriba 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 desplazarse hacia abajo

5 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.

**CO<sub>2</sub>**

10 La etapa de cultivo se puede realizar usando una atmósfera que contiene aproximadamente del 1 % al 15 % de CO<sub>2</sub>, como máximo o aproximadamente el 14 % de CO<sub>2</sub>, el 12 % de CO<sub>2</sub>, el 10 % de CO<sub>2</sub>, el 8 % de CO<sub>2</sub>, el 6 % de CO<sub>2</sub>, el 5 % de CO<sub>2</sub>, el 4 % de CO<sub>2</sub>, el 3 % de CO<sub>2</sub>, el 2 % de CO<sub>2</sub>, o como máximo o aproximadamente el 1 % de CO<sub>2</sub>. Los métodos para burbujear de CO<sub>2</sub> en un biorreactor de producción son bien conocidos en la materia.

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

20 **dO<sub>2</sub>**

La etapa de cultivo puede realizarse manteniendo un oxígeno disuelto 1 (dO<sub>2</sub>) en el cultivo celular de entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 3 % y aproximadamente el 15 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 15 %, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 10 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 20 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 40 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 35 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 50 %, entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 55 %, entre aproximadamente el 45 % y aproximadamente el 50 %, o entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 55 %.

**Proteínas recombinantes**

60 La proteína recombinante es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a la proteína C5 del complemento humano, más particularmente eculizumab  
 Eculizumab puede incluir 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. El ácido nucleico que codifica las cadenas pesadas y ligeras de eculizumab se conoce en la materia (véase, por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico en la patente de EE.UU. N.º 6.355.245 y las secuencias de la región Fc en An et al., mAbs 1:6, 572-579, 2009).

**Métodos para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína**

5 El método proporcionado en el presente documento también incluye una etapa de incubación del producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido durante un segundo período de tiempo. Los aspectos no limitantes de esta etapa de incubación se describen en el presente documento.

**Producto de proteína recombinante incubado**

10 El producto de proteína recombinante incubado durante el segundo período de tiempo puede ser una mezcla de la proteína recombinante y las células de mamífero en cultivo. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además una etapa para aclarar el cultivo a través de alguna forma de filtración. El producto de proteína recombinante incubado durante el segundo período de tiempo también puede ser la proteína recombinante en un medio de cultivo tisular clarificado. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además una etapa de purificación de la proteína  
15 recombinante antes de la incubación durante el segundo período de tiempo y el producto de proteína recombinante incubado durante el segundo período de tiempo es el producto de proteína purificado en un diluyente. El diluyente puede ser un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato.

**Recipientes usados para la incubación**

20 En cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento, el producto de proteína recombinante puede incubarse en el biorreactor de producción (por ejemplo, cualquiera de los biorreactores de producción ejemplares descritos en el presente documento) o en un recipiente de almacenamiento. Se puede equipar un recipiente de almacenamiento para incubar el producto de proteína recombinante en condiciones suficientes para cambiar (por  
25 ejemplo, un cambio ácido o básico) el perfil isoeléctrico del producto de proteína recombinante. Por ejemplo, el recipiente de almacenamiento puede estar equipado para regular uno o más del nivel de  $dO_2$ , la temperatura, el pH y el nivel de  $CO_2$  del producto de proteína recombinante (en cualquier forma descrita en el presente documento). El recipiente de almacenamiento también puede, por ejemplo, estar equipado para regular la agitación del producto de proteína recombinante. El recipiente de almacenamiento puede tener un volumen de, por ejemplo, entre  
30 aproximadamente 20 litros y aproximadamente 5.000 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 4.000 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 2.000 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 1.000 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 800 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 600 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 400 litros, entre  
35 aproximadamente 20 litros y aproximadamente 200 litros, entre aproximadamente 20 litros y aproximadamente 100 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 5.000 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 4.000 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 2.000 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 1.000 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 800 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 600 litros, entre aproximadamente 50 litros y  
40 aproximadamente 400 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 200 litros, entre aproximadamente 50 litros y aproximadamente 100 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 5.000 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 4.000 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 2.000 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 1.000 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 800 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 600 litros, entre aproximadamente 100 litros y aproximadamente 400 litros, entre  
45 aproximadamente 200 litros y aproximadamente 5.000 litros, entre aproximadamente 200 litros y aproximadamente 4.000 litros, entre aproximadamente 200 litros y aproximadamente 2.000 litros, entre aproximadamente 200 litros y aproximadamente 1.000 litros, entre aproximadamente 200 litros y aproximadamente 800 litros, entre aproximadamente 200 litros y aproximadamente 600 litros, entre aproximadamente 200 litros y aproximadamente 400 litros, entre aproximadamente 500 litros y aproximadamente 5.000 litros, entre aproximadamente 500 litros y  
50 aproximadamente 4.000 litros, entre aproximadamente 500 litros y aproximadamente 2.000 litros, entre aproximadamente 500 litros y aproximadamente 1.000 litros, entre aproximadamente 500 litros y aproximadamente 800 litros, entre aproximadamente 1.000 litros y aproximadamente 5.000 litros, entre aproximadamente 1.000 litros y aproximadamente 4.000 litros, o entre aproximadamente 1.000 litros y aproximadamente 2.000 litros.

**Segundo período de tiempo**

55 En cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento, el segundo período de tiempo puede ser de al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos  
60 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas, al menos 24 horas, al menos 25 horas, al menos 26 horas, al menos 27 horas, al menos 28 horas, al menos 29 horas, al menos 30 horas, al menos 31 horas, al menos 32 horas, al menos 33 horas, al menos 34 horas, al menos 35 horas, al menos 36 horas, al menos 37 horas, al menos 38 horas, al menos 39 horas, al menos 40 horas, al menos 41 horas, al menos 42 horas, al menos 43 horas, al menos  
65 44 horas, al menos 45 horas, al menos 46 horas, al menos 47 horas, al menos 48 horas, al menos 49 horas, al menos 50 horas, al menos 55 horas, al menos 60 horas, al menos 65 horas, al menos 70 horas, al menos 75 horas, al menos

80 horas, al menos 85 horas, al menos 90 horas, al menos 95 horas, al menos 100 horas, al menos 105 horas, al menos 110 horas, al menos 115 horas, al menos 120 horas, al menos 125 horas, al menos 130 horas, al menos 135 horas, al menos 140 horas, al menos 145 horas, al menos 150 horas, al menos 155 horas, al menos 160 horas, al menos 165 horas, al menos 170 horas, al menos 175 horas, al menos 180 horas, al menos 185 horas, al menos 190 horas, al menos 195 horas, o al menos 200 horas después del período de tiempo crítico del cultivo.

En cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento (por ejemplo, métodos para cambiar el producto de proteína a un perfil isoeléctrico más ácido), el segundo período de tiempo puede ser entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 200 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 180 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 160 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 140 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 40 horas, entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 180 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 160 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 140 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 40 horas, entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 200 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 180 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 160 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 140 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 40 horas, entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 200 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 180 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 160 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 140 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 40 horas, entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 20 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 200 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 180 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 160 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 140 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 40 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 200 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 180 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 160 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 140 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 120 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 100 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 80 horas, entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 60 horas, o entre aproximadamente 25 horas y aproximadamente 40 horas, de una fase de declive del cultivo.

***Condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido***

Las condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más ácido pueden incluir uno o más de: un intervalo de temperaturas, un intervalo de valores de  $dO_2$ , un intervalo de valores de pH, un intervalo de velocidades de agitación y la adición de uno o más agentes a un líquido que contiene el producto de proteína recombinante (por ejemplo, un medio de cultivo celular que contiene células y la proteína recombinante, un medio de cultivo clarificado que contiene la proteína recombinante o tampón que contiene la proteína recombinante). Los ejemplos de valores de pH que pueden cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más ácido durante el segundo período de tiempo están entre aproximadamente pH 7,00 a aproximadamente pH 7,30, entre aproximadamente pH 7,00 a aproximadamente pH 7,25, entre aproximadamente pH 7,00 a aproximadamente pH 7,20, entre aproximadamente pH 7,00 a aproximadamente pH 7,15, entre aproximadamente pH 7,00 a aproximadamente pH 7,10, entre aproximadamente pH 7,00 a aproximadamente pH 7,05, entre aproximadamente pH 7,05 a aproximadamente pH 7,30, entre aproximadamente pH 7,05 a aproximadamente pH 7,25, entre aproximadamente pH 7,05 a aproximadamente pH 7,20, entre aproximadamente pH 7,05 a aproximadamente pH 7,15, entre aproximadamente pH 7,05 a aproximadamente pH 7,10, entre aproximadamente pH 7,10 a aproximadamente pH 7,30, entre aproximadamente pH 7,10 a aproximadamente pH 7,25, entre aproximadamente pH 7,10 a aproximadamente pH 7,20, entre aproximadamente pH 7,10 a aproximadamente pH 7,15, entre aproximadamente pH 7,15 a aproximadamente pH 7,30, entre aproximadamente pH 7,15 a aproximadamente pH 7,25, entre aproximadamente pH 7,15 a aproximadamente pH 7,20, entre aproximadamente pH 7,20 a aproximadamente pH 7,30, entre aproximadamente pH 7,20 a aproximadamente pH 7,25, o entre aproximadamente pH 7,25 a aproximadamente pH 7,30.

Los ejemplos de los valores de  $dO_2$  que pueden cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más ácido durante el segundo período de tiempo son, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente

el 45 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 35 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 30 %, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 25 %, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 35 %, de entre aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 30 %, o de entre aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 35 %.

5

Los ejemplos de temperaturas que pueden cambiar el perfil isoelectrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más ácido durante el segundo período de tiempo son entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 36 °C, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 34 °C, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C, entre aproximadamente 30 °C a aproximadamente 32 °C, entre aproximadamente 31 °C a aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 31 °C a aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 31 °C a aproximadamente 36 °C, entre aproximadamente 31 °C a aproximadamente 35 °C, entre aproximadamente 31 °C a aproximadamente 34 °C, entre aproximadamente 31 °C a aproximadamente 33 °C, entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 36 °C, entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 35 °C, entre aproximadamente 32 °C a aproximadamente 34 °C, entre aproximadamente 33 °C a aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 33 °C a aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 33 °C a aproximadamente 36 °C, entre aproximadamente 33 °C a aproximadamente 35 °C, entre aproximadamente 34 °C a aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 34 °C a aproximadamente 37 °C, entre aproximadamente 34 °C a aproximadamente 36 °C, entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C, de entre aproximadamente 36 °C a aproximadamente 37,5 °C, o de entre aproximadamente 36 °C a aproximadamente 37 °C.

25

Los ejemplos de velocidades de agitación que pueden cambiar el perfil isoelectrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más ácido durante el segundo período de tiempo están entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 260 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 240 RPM, entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 220 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 300 RPM, entre 220 RPM a aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 260 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 240 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 300 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 240 RPM a aproximadamente 260 RPM, entre aproximadamente 260 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 260 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 260 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 260 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 260 RPM a aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 280 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 280 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 280 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 280 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre 280 RPM a aproximadamente 320 RPM, entre aproximadamente 280 RPM a aproximadamente 300 RPM, entre aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 340 RPM, entre aproximadamente 340 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 340 RPM a aproximadamente 380 RPM, entre aproximadamente 340 RPM y aproximadamente 360 RPM, entre aproximadamente 360 RPM a aproximadamente 400 RPM, entre aproximadamente 360 RPM a aproximadamente 380 RPM, o entre aproximadamente 380 RPM a aproximadamente 400 RPM.

Los ejemplos no limitantes de una condición que puede inducir un cambio ácido en el perfil isoelectrico de un producto de proteína recombinante durante el segundo período de tiempo incluyen uno o más de: una velocidad de agitación de entre aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 280 RPM, entre aproximadamente 210 RPM a aproximadamente 270 RPM, entre aproximadamente 220 RPM a aproximadamente 260 RPM, entre aproximadamente 230 RPM a aproximadamente 250 RPM, o aproximadamente 240 RPM; una temperatura de entre aproximadamente 31,5 °C y aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 32,5 °C y aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 33,5 °C y aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 34,5 °C y aproximadamente 37,5 °C, entre aproximadamente 35,5 °C y aproximadamente 37,5 °C, o aproximadamente 36,5 °C; un pH de entre aproximadamente 7,10 y aproximadamente 7,30 (por ejemplo, entre aproximadamente 7,15 y aproximadamente 7,30,

65

entre aproximadamente 7,20 y aproximadamente 7,30, entre aproximadamente 7,25 y aproximadamente 7,30, o aproximadamente 7,30; y un valor de  $dO_2$  de entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 45 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %, entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %, o aproximadamente el 20 %.

5

#### **Cambios logrados en el perfil isoeléctrico**

Algunas realizaciones incluyen el uso de una condición que produce un producto que tiene un perfil básico. Por ejemplo, el uso de la materia prima suero bovino de Nueva Zelanda o albúmina de suero bovino de Nueva Zelanda produce un producto que tiene un perfil isoeléctrico más básico y la incubación cambia el producto a un perfil más ácido.

10

Algunas realizaciones de los métodos que incluyen una etapa de incubación del producto de proteína recombinante en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico de una proteína recombinante hacia un perfil más ácido dan como resultado un aumento en el nivel (o cantidad) de al menos dos, tres, o cuatro de las subpoblaciones de proteínas más ácidas en el perfil y una disminución en el nivel (o cantidad) de al menos una, dos, tres, o cuatro de las subpoblaciones de proteínas más básicas en el perfil. En algunas realizaciones, cuando el perfil isoeléctrico comprende siete subpoblaciones de proteínas que tienen un punto isoeléctrico de entre aproximadamente 5,45 y aproximadamente 6,55, el método da como resultado un aumento en el nivel (o cantidad) de al menos dos, tres, cuatro, o cinco de las subpoblaciones de proteínas más ácidas y una disminución en el nivel (o cantidad) de al menos dos, tres, o cuatro de las subpoblaciones de proteínas más básicas.

15

20

Algunas realizaciones de los métodos que incluyen una etapa de incubación del producto de proteína recombinante en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico de una proteína recombinante hacia un perfil más básico dan como resultado un aumento en el nivel (o cantidad) de al menos una, dos, tres, o cuatro de las subpoblaciones de proteínas más básicas en el perfil y/o una disminución en el nivel (o cantidad) de al menos una, dos, tres, o cuatro de las subpoblaciones de proteínas más ácidas en el perfil.

25

En un ejemplo particular, cuando un producto de proteína recombinante tiene siete subpoblaciones de proteínas con un punto isoeléctrico entre aproximadamente 5,45 y aproximadamente 6,55 (por ejemplo, eculizumab), el perfil más ácido comprende, consiste, o consiste esencialmente en lo siguiente: (1) una cantidad de proteína que puebla cada una de la segunda, tercera y cuarta subpoblaciones de proteínas más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas de  $\geq 10$  % de la masa total de proteínas; (2) la cantidad de proteína que puebla cada una de la tercera y cuarta subpoblaciones de proteínas más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas que es menor que la cantidad de proteína que puebla la segunda subpoblación de proteínas más básica de las siete subpoblaciones de proteínas; (3) la cantidad de proteína que puebla la subpoblación de proteínas más ácida es  $\leq 3$  % de la masa total de proteínas; (4) la cantidad de proteína que puebla la segunda subpoblación de proteínas más ácida es  $\leq 6$  % de la masa total de proteínas; (5) la cantidad de proteína que puebla la tercera subpoblación de proteínas más ácida es  $\leq 9$  % de la masa total de proteína; (6) la cantidad de proteína que puebla la subpoblación de proteínas más básica es  $\leq 8$  % de la masa total de proteínas; (7) no hay otras subpoblaciones de proteínas menores que tengan una cantidad de proteína de  $\leq 6$  % de la masa total de proteína, aparte de la subpoblación de proteínas más ácida, la segunda más ácida, la tercera subpoblación más ácida y más básica de las siete subpoblaciones de proteínas. La incubación da como resultado un producto de proteína recombinante (eculizumab) que tiene este perfil más ácido.

30

35

40

#### **Determinación del perfil isoeléctrico del producto de proteína recombinante**

Algunas realizaciones incluyen además una o más etapas de análisis del producto para determinar el perfil isoeléctrico. Por ejemplo, se puede realizar una etapa de análisis del producto para determinar su perfil isoeléctrico inmediatamente después del final del primer período de tiempo y antes de la etapa de incubación. Esto se hace para determinar si se incuba el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más ácido durante el segundo período de tiempo o para determinar si se incuba el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante hacia un perfil más básico durante el segundo período de tiempo.

50

Algunas realizaciones incluyen además una etapa adicional de análisis del producto para determinar el perfil isoeléctrico inmediatamente después del final del segundo período de tiempo para determinar si es necesario un cambio adicional del producto de proteína isoeléctrico. Por ejemplo, la etapa de análisis inmediatamente después del segundo período de tiempo puede usarse para determinar si una etapa de incubación adicional, tal como la repetición de una etapa de incubación, es necesaria cambiarla a un perfil más ácido o más básico. Dicha decisión se puede tomar comparando el perfil isoeléctrico determinado al final del segundo período de tiempo con un perfil de referencia (por ejemplo, cualquiera de los perfiles de referencia descritos en el presente documento o conocidos en la materia).

55

60

#### **Purificación del producto de proteína recombinante**

Tal como se conoce en la técnica, un producto proteico recombinante (por ejemplo, un producto proteico recombinante cambiado) se puede purificar usando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, una o más etapas de filtración y

65

5 cromatografía, tales como la cromatografía de afinidad, la cromatografía de captura de proteína A, la cromatografía de intercambio aniónico, la cromatografía de intercambio catiónico, la cromatografía de resina en modo mixto, la cromatografía de tamiz molecular y la cromatografía de interacción hidrofóbica pueden usarse para purificar el producto proteico recombinante, antes o después del cambio. Los métodos adicionales para purificar un producto de proteína recombinante (por ejemplo, un producto de proteína recombinante cambiado) son bien conocidos en la materia.

10 El producto de proteína purificado (por ejemplo, un producto de proteína recombinante desplazado) puede entonces, opcionalmente, mezclarse o añadirse a un excipiente farmacéuticamente aceptable para generar una sustancia farmacológica. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables no naturales) son bien conocidos en la materia.

### Productos de proteína recombinante

15 También se describen productos proteicos recombinantes producidos por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se desvelan productos de proteína recombinante (por ejemplo, eculizumab) producidos por un método que incluye: (a) cultivar células de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo que consiste en una fase de proliferación y/o una fase estacionaria de las células de mamífero; (b) analizar el producto al final del primer período de tiempo para el perfil isoelectrico; y (c) incubar el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoelectrico del producto hacia un perfil más ácido durante un segundo período de tiempo que consiste en al menos 6 horas de una fase de disminución de las células de mamífero, o incubar el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoelectrico del producto hacia un perfil más básico durante un segundo período de tiempo de una fase de disminución de las células de mamífero; y de manera opcional, (d) analizar el producto para determinar el perfil isoelectrico y repetir la etapa (c) si el perfil isoelectrico requiere un cambio adicional.

20 También se describen productos de proteínas recombinantes (por ejemplo, eculizumab) producidos por un método que incluye: (a) cultivar células de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo que comprende una fase de proliferación de las células de mamífero y termina en un punto temporal crítico; (b) incubar el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoelectrico del producto hacia un perfil más ácido durante un segundo período de tiempo que consiste en al menos 6 horas de una fase de disminución de las células de mamífero; y opcionalmente (c) analizar el producto para determinar el perfil isoelectrico y repetir la etapa (b) si el perfil isoelectrico requiere un cambio adicional hacia un perfil más ácido. Además se desvelan productos de proteínas recombinantes (por ejemplo, eculizumab) producidos por un método que incluye: (a) cultivar células de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo que comprende una fase de proliferación de las células de mamífero y termina en un punto temporal crítico; (b) incubar el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoelectrico del producto hacia un perfil más básico durante un segundo período de tiempo de una fase de disminución de las células de mamífero; y opcionalmente (c) analizar el producto para determinar el perfil isoelectrico y repetir la etapa (b) si el perfil isoelectrico requiere un cambio adicional hacia un perfil más básico.

30 Los aspectos no limitantes de los métodos utilizados para producir los productos de proteína recombinante descritos en el presente documento se describen anteriormente, y se pueden usar en cualquier combinación sin limitación.

### Ejemplos

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

#### Ejemplo 1. Cambio del perfil isoelectrico de eculizumab

55 Se realizó un conjunto de experimentos para determinar si el perfil isoelectrico de eculizumab podría cambiar al continuar la incubación de un cultivo celular en un biorreactor de 10.000 litros. En estos experimentos, se tomaron muestras de cultivo diariamente y el eculizumab recombinante se purificó usando una cromatografía de afinidad de proteína A. El perfil isoelectrico del eculizumab purificado resultante se determinó usando enfoque isoelectrico. Los métodos y materiales utilizados en estos experimentos se describen a continuación.

#### 60 **Materiales**

Los materiales utilizados para estos experimentos incluyen: muestras aclaradas de biorreactores de un cultivo de células de mamíferos que contienen un ácido nucleico que codifica eculizumab y columnas Sepharose de proteína A.

#### 65 **Métodos**

Se sembró un biorreactor de producción de 10.000 litros con células de mamífero que contenían un ácido nucleico que codifica eculizumab. A los 5-15 días posteriores a la inoculación, se tomaron muestras del cultivo celular del biorreactor de 10.000 litros en los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 en un primer experimento y en un segundo experimento. Cada muestra se aclaró por centrifugación y filtración de 0,22  $\mu\text{m}$ , y se almacenó a 2-8 °C. A continuación, cada muestra aclarada se filtró por segunda vez y se pasó a través de una columna de proteína A, para purificar el eculizumab. Después se realizó un perfil isoeléctrico en las muestras de eculizumab purificadas.

**Resultados**

10 Las tablas 1 y 2 resumen los datos recopilados en el primer y segundo cultivo de células de 10.000 litros, respectivamente, en las cantidades relativas de las bandas de proteína isoeléctrica 1a, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Las bandas se numeraron en orden de la más ácida a la más básica según se determinó usando electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico en cada muestra obtenida de cultivos celulares durante los días 5-13. Se determinó que el punto de tiempo crítico en estos cultivos celulares semicontinuos de 10.000 litros era el punto de tiempo en el que la densidad de células viables disminuye en la fase de declive para alcanzar una densidad de células viables de  $\sim 15 \times 10^5$  células/ml.

15 Los datos en las Tablas 1 y 2 demuestran que continuar cultivando las células de mamífero más allá del punto temporal crítico del cultivo podría producir un cambio ácido en el perfil isoeléctrico de eculizumab en el cultivo. Las representaciones gráficas de los datos del primer cultivo celular del biorreactor de 10.000 litros se muestran en las Figuras 1 y 2, y las representaciones gráficas de los datos del segundo cultivo celular del biorreactor de 10.000 litros se muestran en las Figuras 3 y 4.

20

Los datos que se muestran en las Figuras 1-4 también demuestran que a medida que se continúa cultivando las células de mamíferos más allá del punto temporal crítico del cultivo, la distribución de moléculas de eculizumab correspondientes a bandas diferentes pero discretas dentro de los perfiles isoeléctricos en el cultivo cambia de un perfil isoeléctrico más básico a un perfil isoeléctrico más ácido. En el primer cultivo de células de 10.000 litros, hubo un aumento en el nivel (o cantidad) de las bandas ácidas 1a (0 % a 2 %), 1 (2 % a 6 %), 2 (4 % a 5 %) y 3 (20 % a 29 %) observados entre el día 5 y el día 13 del cultivo. Este cambio de material hacia las bandas ácidas en el primer cultivo celular se reflejó en una disminución en las cantidades de las bandas básicas 4 (40 % a 32 %), 5 (21 % a 19 %), 6 (11 % a 7 %) entre el día 5 y el día 13 del cultivo. Una banda más básica que la banda 6 desapareció por completo después de 10 días. Los datos en el segundo cultivo de células de 10.000 litros mostraron un desplazamiento similar de material dentro del perfil isoeléctrico de eculizumab con el tiempo.

25

30

Tabla 1. Primer experimento: Perfil isoelectrico de ecilizumab en el tiempo

|                 | Día 5     | Día 6     | Día 7     | Día 8     | Día 9     | Día 10    | Día 11    | Día 12    | Día 13    |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| QC-ID           | 0311-0270 | 0311-0271 | 0311-0272 | 0311-0387 | 0311-0388 | 0311-0456 | 0311-0457 | 0311-0458 | 0311-0459 |
| Banda 1a        | ND        | ND        | ND        | ND        | 1         | 2         | 2         | 2         | 3         |
| Banda 1         | 2         | 2         | 2         | 2         | 2         | 4         | 4         | 5         | 6         |
| Banda 2         | 4         | 4         | 4         | 4         | 4         | 5         | 5         | 6         | 6         |
| Banda 3         | 20        | 22        | 23        | 22        | 24        | 26        | 27        | 28        | 28        |
| Banda 4         | 40        | 38        | 37        | 41        | 38        | 35        | 34        | 33        | 33        |
| Banda 5         | 21        | 21        | 21        | 21        | 21        | 20        | 20        | 19        | 19        |
| Banda 6         | 11        | 10        | 11        | 9         | 9         | 8         | 8         | 8         | 7         |
| otros           | 2         | 3         | 2         | 1         | 2         | ND        | ND        | ND        | ND        |
| intervalo de pi | 5,64-6,39 | 5,64-6,38 | 5,64-6,38 | 5,64-6,64 | 5,57-6,65 | 5,56-6,33 | 5,57-6,32 | 5,57-6,32 | 5,56-6,38 |

Los datos en este ejemplo demuestran que continuar incubando el cultivo por un segundo período de tiempo que va más allá del punto temporal crítico del cultivo o prolonga la duración de la fase de declive del cultivo produce una redistribución del material dentro del perfil isoeléctrico o un "cambio ácido" en el perfil isoeléctrico de eculizumab en el cultivo.

5

**Tabla 2. Segundo experimento: Perfil isoeléctrico de eculizumab en el tiempo**

|                 | Día 5     | Día 6     | Día 7     | Día 8     | Día 9     | Día 10    | Día 11    | Día 12    |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| QC-ID           | 0411-0063 | 0411-0064 | 0411-0065 | 0411-0066 | 0411-0067 | 0411-0068 | 0411-0069 | 0411-0146 |
| Banda 1a        | ND        | ND        | ND        | ND        | ND        | 2         | 2         | 3         |
| Banda 1         | 2         | 2         | 2         | 2         | 3         | 3         | 5         | 6         |
| Banda 2         | 3         | 3         | 3         | 4         | 5         | 6         | 6         | 6         |
| Banda 3         | 25        | 26        | 26        | 24        | 27        | 28        | 27        | 29        |
| Banda 4         | 42        | 41        | 41        | 44        | 37        | 35        | 37        | 35        |
| Banda 5         | 20        | 21        | 21        | 19        | 19        | 18        | 18        | 15        |
| Banda 6         | 7         | 7         | 7         | 7         | 8         | 8         | 6         | 6         |
| otros           | ND        | ND        | ND        | ND        | 2         | 2         | ND        | ND        |
| intervalo de pI | 5,64-6,35 | 5,62-6,33 | 5,64-6,33 | 5,63-6,32 | 5,63-6,61 | 5,55-6,60 | 5,56-6,19 | 5,55-6,25 |

### Ejemplo 2. Efecto del pH y dO<sub>2</sub> sobre el cambio en el perfil isoeléctrico de eculizumab

10 A continuación, Los presentes inventores intentaron evaluar los efectos del pH y dO<sub>2</sub> sobre el perfil isoeléctrico resultante de una proteína recombinante producida por el cultivo celular. Para estos cultivos celulares a pequeña escala, se cultivaron células de mamífero NS0 que contenían un ácido nucleico que codifica eculizumab en biorreactores semicontinuos de 2 litros.

#### 15 **Métodos**

Se inoculó un conjunto de diez biorreactores semicontinuos a pequeña escala de 2 litros con células de mamífero NS0 que contenían un ácido nucleico que codifica eculizumab en un volumen de trabajo de 1,3 litros y se cultivaron durante un total de 16 días. Los biorreactores se cultivaron a una velocidad de agitación de 240 RPM a una temperatura controlada de 36,5 °C. La tasa de flujo de aire de lavado comenzó a 3 sL/h y aumentó a 9 sL/h antes de que se suplementase oxígeno adicional para mantener el punto de ajuste de dO<sub>2</sub> específico para la condición experimental. Los cultivos celulares se ejecutaron por duplicado en las cinco condiciones experimentales diferentes enumeradas a continuación (condiciones 1-5). Cada biorreactor se ejecutó con un punto de ajuste muerto de pH de la banda de 0,02 (por ejemplo, 7,32 ± 0,02). Las condiciones fueron las siguientes:

25

- (1) pH 7,0 y dO<sub>2</sub> del 15 % (Condiciones de control) (Ejecuciones de cultivo celular 1 y 2);
- (2) pH 7,32 y dO<sub>2</sub> del 5 % (Ejecuciones del cultivo celular 3 y 4);
- (3) pH 7,32 y dO<sub>2</sub> del 50 % (Ejecuciones del cultivo celular 5 y 6);
- (4) pH 6,95 y un dO<sub>2</sub> del 5 % (Ejecuciones del cultivo celular 7 y 8); y
- (5) pH 6,95 y dO<sub>2</sub> del 50 % (Ejecuciones del cultivo celular 9 y 10).

30

Cada uno de los cultivos del biorreactor de 2 litros se inoculó con una densidad inicial de células viables de 3,5 x 10<sup>5</sup> células/ml. Cada una de las fuentes celulares de inoculación para los biorreactores se obtuvo del mismo banco celular. Dos cultivos giratorios duplicados, cultivados a partir de un proceso de tren de semillas, fueron utilizados para inocular los biorreactores. Los biorreactores en las ejecuciones de los cultivos celulares 1, 7 y 8 se inocularon a partir de un primer cultivo giratorio, y los biorreactores en los cultivos celulares 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 10 se inocularon a partir del segundo cultivo giratorio. El número de generación de las células en el día cero de los 10 cultivos del biorreactor de 2 litros fue de aproximadamente 77,3.

35

40 Las alimentaciones definidas por el proceso se agregaron a cada cultivo de 2 litros al iniciar los criterios de alimentación. Los criterios de alimentación se designaron como cuando el cultivo celular alcanzó una densidad de células viables ≥ 14 x 10<sup>5</sup>. Al alcanzar los criterios de alimentación, se introdujeron dos medios de cultivo líquido diferentes en los biorreactores mediante jeringas estériles y tabiques laterales. Ambas alimentaciones líquidas para todos los biorreactores de 2 litros fueron el 4 % del volumen total del tanque. Las alimentaciones líquidas fueron de 52 ml y se distribuyeron (alimentaron) durante 133 horas. El método de adición de alimentación se realizó utilizando inyecciones diarias de alimentación en bolo de 9,4 ml de cada medio de cultivo líquido durante los primeros cinco días, y una alícuota final de 5,0 ml en el sexto y último día de alimentación. Se utilizó BSA de origen neozelandés en todos los medios de cultivo y soluciones de alimentación.

45

50 Para evaluar los perfiles isoeléctricos resultantes, se extrajeron muestras de 75 ml de cada biorreactor de 2 litros en

el siguiente esquema: se obtuvieron muestras el día 10, el día 12 y el día 14 para las ejecuciones de los cultivos de células 1, 3 y 5, y las muestras se obtuvieron el día 5, el día 8 y el día 10 para las ejecuciones de cultivo celular 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10. Para la ejecución de los cultivos celulares 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10, las muestras de recolección final se usaron para la purificación de proteína A de eculizumab y los posteriores ensayos de enfoque isoelectrico se realizaron el día 14. Para las ejecuciones de cultivo celular 1,3 y 5, se tomaron muestras de la recolección final el día 16. Se preparó una muestra aclarada de medio de cultivo a partir de cada cultivo celular y se purificó eculizumab y se almacenó a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Las muestras almacenadas de medio de cultivo que contiene eculizumab se purificaron posteriormente mediante cromatografía de proteína A y se determinó el perfil isoelectrico.

## 10 **Resultados**

Se determinó el crecimiento celular en los cinco conjuntos de condiciones de cultivo celular del biorreactor. Véase la Figura 5. La densidad de siembra inicial para todos los biorreactores de 2 litros fue constante. Los cuatro biorreactores con un pH de 7,32 proliferaron más rápido inicialmente. Esto no fue sorprendente porque el pH óptimo para el crecimiento en los medios de cultivo fue de 7,30. Sin embargo, estos cuatro biorreactores tenían cultivos celulares que entraron en la fase de disminución más rápidamente que los biorreactores en condiciones de control o los biorreactores establecidos a pH 6,95. Los cultivos celulares establecidos a pH 6,95 y pH 7,32 y un punto de ajuste de dO<sub>2</sub> del 5% no alcanzaron la misma concentración integral de células viables (CICV) que sus homólogos de oxígeno disuelto al 50%. Esto sugirió que el oxígeno era limitante en estos cultivos. Las condiciones de control de pH 7,0 y dO<sub>2</sub> del 15% estaban entre las condiciones de pH alto y bajo (pH 7,32 y pH de 6,95, respectivamente), lo que indica que incluso una ligera modificación de pH por debajo de pH 7 puede tener un impacto significativo sobre la proliferación celular.

Se determinó la productividad de las cinco condiciones diferentes de biorreactor. Véase la Figura 6. Se observaron diferencias significativas en la productividad específica entre las cinco condiciones diferentes de pH/dO<sub>2</sub> analizadas. La ejecución de los biorreactores a un punto de ajuste de pH de 7,32 con oxígeno alto o bajo tiene un impacto marcado en la productividad específica. La ejecución del biorreactor a pH 7,32 con alto contenido de oxígeno (50%) logró una mayor concentración integral de células viables y un título final más alto en comparación con su homólogo de 5% de dO<sub>2</sub>. Los biorreactores con un pH de 6,95 ± 0,02 tenían una productividad específica más alta y una productividad similar a la de los biorreactores de 2 litros en condiciones de control. Por lo tanto, a pH 6,95, el diferencial del punto de ajuste de dO<sub>2</sub> (5% frente al 50%) no tuvo tanto impacto en la productividad específica o el título final en comparación con el impacto de dO<sub>2</sub> a pH 7,32. Los biorreactores ejecutados en condiciones de control de pH 7,0 y dO<sub>2</sub> del 15% produjeron la concentración integral de células viables acumulativa más alta. Los biorreactores ejecutados en condiciones de control también superaron a los cultivos celulares del biorreactor a pH 7,32 y dO<sub>2</sub> al 50%. Los biorreactores ejecutados en condiciones de control produjeron eculizumab a 1600 mg/l, más de 400 mg/l de biorreactores superiores ejecutados en condiciones sin control.

Se determinó la evolución del perfil isoelectrico del anticuerpo producido en los cinco conjuntos de condiciones de cultivo celular. Véanse las figuras 7 a 10. Estos datos muestran cómo la cantidad de material que puebla bandas de proteínas particulares en el perfil isoelectrico para eculizumab cambia a lo largo de la duración del cultivo, incluso a medida que se acerca y supera el punto temporal crítico del cultivo. Estos datos también muestran que existe una interacción entre el pH y el dO<sub>2</sub> que parece afectar al perfil isoelectrico de eculizumab. Una tendencia general es que a medida que la duración del cultivo aumenta más allá del punto temporal crítico y entra en la fase de disminución del cultivo, la cantidad de material dentro de las bandas de proteínas ácidas (por ejemplo, bandas 1, 2 y 3) en el perfil isoelectrico también aumenta. De forma correspondiente, la cantidad de material que puebla las bandas de proteínas básicas (por ejemplo, las bandas 5 y 6) disminuye. Sorprendentemente, los datos también muestran que los puntos de ajuste de dO<sub>2</sub> bajos dan como resultado un mayor nivel (o cantidad) de bandas de proteínas ácidas en el perfil isoelectrico, mientras que los puntos de ajuste de dO<sub>2</sub> más altos aumentan el aspecto y los niveles (o cantidades) de bandas de proteínas básicas en el perfil isoelectrico.

La Figura 11 muestra los niveles (o cantidades) de diferentes bandas de proteínas en un perfil isoelectrico de eculizumab recolectado el día 14 de cuatro de los cultivos de biorreactor analizados. Los datos muestran claramente que el dO<sub>2</sub> bajo genera niveles más altos (o cantidades) de bandas de proteínas más ácidas, específicamente de bandas 1a, 1, 2 y 3, y un pH más alto genera niveles más altos (o cantidades) de bandas de proteínas más ácidas, específicamente, de bandas 1 y 2.

Los datos en este ejemplo muestran que se produjo un cambio a un perfil isoelectrico más ácido para eculizumab cuando el cultivo celular se cultivó durante un período de tiempo que se prolonga más allá del punto temporal crítico y en la fase de disminución (por ejemplo, en este ejemplo, la fase de disminución del cultivo celular comienza alrededor del día 6 o 7). El punto temporal crítico en este ejemplo es cuando el cultivo celular disminuye por debajo de  $15 \times 10^5$  células/ml en la fase de disminución de la proliferación.

### **Ejemplo 3. Efecto del origen celular y de las materias primas sobre el perfil isoelectrico**

Se realizó un conjunto adicional de experimentos para determinar el efecto del origen celular y de las materias primas sobre el perfil isoelectrico de eculizumab producido por un cultivo celular de mamífero. Los materiales y métodos utilizados para realizar estos experimentos se describen a continuación.

### Métodos

Ocho biorreactores de 2 litros se inocularon e incubaron durante un total de 18 días. El volumen de trabajo de cada cultivo de biorreactor fue de 1,3 litros. Cada uno de los cultivos de biorreactor semicontinuo de 2 litros se agitó en sentido antihorario a 240 RPM a una temperatura de termpoar de 36,5 °C. La velocidad de flujo del rociador comenzó a 3 sl/hora y aumentó hasta 9 sl/hora antes de que se usara la suplementación de oxígeno para mantener el punto de ajuste de  $dO_2$  al 15 %. Los cultivos de biorreactor se ejecutaron a un pH de 7,0 con una banda muerta de  $\pm 0,02$ . Cuatro de los cultivos de biorreactor semicontinuo de 2 litros se realizaron con células de origen A, y cuatro de los cultivos de biorreactor semicontinuo de 2 litros se ejecutaron con células de origen B. Dos de los cultivos del biorreactor semicontinuo de 2 litros, uno de cada origen celular, se cultivaron utilizando un primer conjunto de materias primas de medio de cultivo, los otros seis cultivos del biorreactor semicontinuo de 2 litros se cultivaron usando un segundo conjunto de materias primas de medio de cultivo: tres réplicas para cada origen celular. El conjunto exacto de condiciones experimentales analizadas se muestra en la Tabla 3. Los ocho biorreactores se inocularon con células de un cultivo giratorio (es decir, se preparó un cultivo giratorio para cada origen celular). Los ocho cultivos del biorreactor semicontinuo de 2 litros se inocularon a una densidad de semillas objetivo de  $3,0 \times 10^5$  células/ml.

En cada una de las ejecuciones del biorreactor, la alimentación de dos medios de cultivo líquidos en cada biorreactor se inició cuando el cultivo alcanzó los criterios de alimentación (densidad de células viables de  $\geq 14 \times 10^5$  células/ml) sobre el cual se introdujo un bolo IX de un suplemento de medio en cada biorreactor mediante una jeringa estéril y tabique lateral. Ambas alimentaciones para los 8 biorreactores fueron el 4 % del volumen total del tanque cada una, o 52 ml de cada uno de los medios de cultivo líquidos agregados, distribuidos en 133 horas. El método de adición de alimento se realizó utilizando inyecciones diarias de bolos, con 9,4 ml de cada alimento durante los primeros cinco días, y una inyección final de 5,0 ml en el sexto y último día de alimentación.

**Tabla 3.** Combinaciones de origen celular y materia prima analizadas

| N.º de ID de ejecución del biorreactor | Posición del tanque D-10 | Origen celular / Descripción de la condición del biorreactor |
|--|--------------------------|--|
| Ejecución del cultivo celular 11       | n.º 1                    | Células de origen A; Primer conjunto de materias primas      |
| Ejecución del cultivo celular 12       | n.º 2                    | Células de origen B; Primer conjunto de materias primas      |
| Ejecución del cultivo celular 13       | n.º 3                    | Células de origen B; Segundo conjunto de materias primas     |
| Ejecución del cultivo celular 14       | n.º 4                    | Células de origen A; Segundo conjunto de materias primas     |
| Ejecución del cultivo celular 15       | n.º 5                    | Células de origen A; Segundo conjunto de materias primas     |
| Ejecución del cultivo celular 16       | n.º 6                    | Células de origen B; Segundo conjunto de materias primas     |
| Ejecución del cultivo celular 17       | n.º 7                    | Células de origen B; Segundo conjunto de materias primas     |
| Ejecución del cultivo celular 18       | n.º 8                    | Células de origen A; Segundo conjunto de materias primas     |

Se recogieron muestras (75 ml) de cada biorreactor tal como se describe a continuación. Para las ejecuciones de cultivo celular 11 y 12, se tomaron muestras en el día 8, en el día 11, en el día 14, en el día 15 y en el día 16. Para las ejecuciones del biorreactor 13 y 14, se tomaron muestras en el día 13, en el día 14, en el día 15 y en el día 16. El eculizumab presente en cada muestra se purificó usando cromatografía de proteína A, y la proteína purificada resultante se analizó usando electroforesis de enfoque isoelectrico.

### Resultados

La proliferación celular para los ocho biorreactores semicontinuos se muestra en la Figura 12. La densidad de siembra inicial para los ocho biorreactores es constante de recipiente a recipiente. Las líneas negras continuas muestran los datos de los cultivos inoculados con células de origen B, y las líneas negras discontinuas muestran los datos de los cultivos inoculados con células de origen A. Las dos ejecuciones de subconjuntos que contenían el primer conjunto de materias primas se indican mediante flechas para su respectivo origen celular. Los datos muestran que las células derivadas de células de origen B proliferaron más rápido, alcanzaron un pico de mayor densidad de células viables (DCV) y una disminución en la DCV más lenta que los cultivos homólogos con células de origen A. Los cultivos incubados con el primer conjunto de materias primas son más bajos en densidad acumulativa de células viables en comparación con los cultivos incubados con el segundo conjunto de materias primas. Esto se puede ver fácilmente en los datos de la ejecución del cultivo celular 11.

En la Figura 13 se muestra el porcentaje de células viables presentes en el cultivo a lo largo del tiempo en cada cultivo

del biorreactor. Los datos entre las células de origen A y las células de origen B parecen similares, con la ejecución del cultivo celular 11 teniendo el menor porcentaje de densidad de células viables a lo largo del tiempo. Los biorreactores que contienen células de origen B parecen tener un porcentaje ligeramente mayor de células viables entre el día 0 y el día 14.

5 La productividad específica de los ocho cultivos de biorreactores se muestra en la Figura 14. El origen celular tiene un efecto sobre la productividad del cultivo. La proliferación de dos cultivos usando el primer conjunto de materias primas se indica con flechas en la Figura 14. Para cada fuente celular utilizada, células que utilizan el primer conjunto de materias primas tuvieron una productividad específica más baja en comparación con sus homólogas que utilizan el  
10 segundo conjunto de materias primas. El título promedio de los cuatro cultivos de biorreactor usando células de origen B fue de 1,64 gramos/litro en comparación con solo 1,11 gramos/litro para los cultivos de biorreactor usando células de origen A. Los cultivos de biorreactor que usan células de origen B también fueron más productivos por célula (observado por la pendiente de las líneas en la Figura 14).

15 Las Figuras 15-18 muestran la evolución temporal del perfil isoeléctrico del eculizumab purificado de las muestras obtenidas de cuatro de los ocho cultivos de biorreactores diferentes. Las cuatro ejecuciones de cultivo celular utilizadas en estos estudios de evolución temporal fueron las ejecuciones de cultivo celular 11, 12, 13 y 14 (como se muestra en la Tabla 4). Los datos en las Figuras 15-18 muestran que los cambios en el perfil isoeléctrico de eculizumab durante la duración del cultivo (a medida que el cultivo se incubaba durante un período de tiempo adicional más allá del período  
20 crítico y/o se incubaba durante el período de declive del cultivo). Los datos en las Figuras 15-18 muestran que el cambio en el perfil isoeléctrico a lo largo del tiempo es el mismo para los cultivos que usan células de origen A o células de origen B. Se observa una tendencia general de que a medida que la duración del cultivo aumenta más allá del punto temporal crítico y entra en la fase de declive de la proliferación, los niveles (o cantidades) de bandas de proteínas ácidas (bandas de proteínas 1, 2 y 3) aumentan, mientras que las bandas de proteínas básicas (bandas de proteínas  
25 5 y 6) disminuyen. Los datos también indican que un punto de ajuste de  $dO_2$  bajo aumenta los niveles (o cantidades) de bandas de proteínas más ácidas, mientras que el punto de ajuste de  $dO_2$  alto aumenta el aspecto y la frecuencia de bandas de proteínas más básicas. Los perfiles de células de origen A y células de origen B que usaban las mismas materias primas son similares, mientras que los perfiles del mismo origen celular que usan diferentes materias primas son menos similares. Estos datos indican que las materias primas utilizadas presentan más impacto en el perfil  
30 isoeléctrico que las fuentes celulares en estos experimentos. Los dos cultivos de biorreactor que usaron el primer conjunto de materias primas cumplieron los criterios de recolección antes que los cultivos que usaron el segundo conjunto de materias primas.

35 Las ejecuciones de cultivo celular 11 y 12 cumplieron con el siguiente perfil isoeléctrico de referencia el día 16: bandas de proteína 3, 4 y 5  $\geq 10\%$ ; bandas de proteína 3 y 4 > banda de proteína 5; banda de proteína 1a  $\leq 3\%$ ; banda de proteína 1  $\leq 6\%$ ; banda de proteína 2  $\leq 9\%$ ; banda de proteína 6  $\leq 8\%$ ; no hay bandas de proteínas menores que no sean las bandas de proteínas 1a, 1, 2 y 6; y todas las bandas de proteínas se resolvieron entre un punto isoeléctrico de 5,45 y 6,55. Las ejecuciones de cultivo celular 11 y 12 alcanzaron el perfil isoeléctrico de referencia 4 días después del punto temporal crítico (día 12) para la ejecución de cultivo celular 11 y 2 días después del punto temporal crítico  
40 (día 14) para la ejecución de cultivo celular 12. El punto temporal crítico utilizado en estos experimentos fue el punto temporal en que la densidad de células viables disminuye por debajo de  $15 \times 10^5$  células/ml. Hay un cambio general sutil en el perfil isoeléctrico hacia bandas de proteínas más básicas en todos los ámbitos cuando el cultivo utiliza componentes de suero bovino de Nueva Zelanda (por ejemplo, albúmina de suero bovino).

45 En resumen, estos datos demuestran que continuar incubando un cultivo durante un período de tiempo adicional (más allá del período crítico o en la fase de disminución del cultivo) podría producir un cambio en el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante (por ejemplo, tal como eculizumab en los presentes ejemplos).

Apéndice de secuencias

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

55 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVT  
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR  
STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNV  
DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPR  
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD  
KSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 2

PRT

Homo sapiens

5 Cadena ligera de eculizumab

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVPSRFSGSGSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN  
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGEC

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> ALEXION PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> MÉTODOS PARA CAMBIAR UN PERFIL ISOELÉCTRICO DE UN PRODUCTO DE PROTEÍNA Y USOS  
DE LOS MISMOS
- 15 <130> AXJ-196PC
- <140>  
<141>
- 20 <150> 62/064.397  
<151> 15-10-2014
- <160> 2
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
<211> 448
- 30 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<221> fuente
- 35 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- <400> 1

ES 2 743 903 T3

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

ES 2 743 903 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |     |     |     |     |     |

ES 2 743 903 T3

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>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de 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

15

ES 2 743 903 T3

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 cambiar el perfil isoeléctrico de un producto de proteína recombinante que tiene siete subpoblaciones de proteínas con un punto isoeléctrico entre aproximadamente 5,45 y aproximadamente 6,55, en donde el producto de proteína recombinante es eculizumab y el método comprende:
- (a) el cultivo semicontinuo de células de mamífero que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante en un biorreactor de producción en condiciones suficientes para producir el producto durante un primer período de tiempo que consiste en una fase de crecimiento o una fase de crecimiento y una fase estacionaria de las células de mamífero o que comprende una fase de crecimiento de las células de mamífero y termina en un punto temporal crítico;
- (b) incubar el producto en condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido durante un segundo período de tiempo que consiste en al menos 6 horas de una fase de declive de las células de mamífero, en donde el perfil más ácido comprende un aumento en la cantidad de la cuarta subpoblación de proteínas más ácidas de las siete subpoblaciones de proteínas, y una disminución en la cantidad de la primera y segunda subpoblaciones de proteínas más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas, en donde las condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto hacia un perfil más ácido comprenden (i) incubar en una concentración de oxígeno disuelto (dO<sub>2</sub>) de entre aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %; (ii) incubar en un medio que tiene un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,3; y/o (iii) incubar a una temperatura de entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 37,5 °C.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el perfil más ácido es un perfil isoeléctrico, donde:
- la cantidad de proteína que puebla cada una de la segunda, tercera y cuarta subpoblaciones de proteínas más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\geq 10\%$  de la masa total de proteínas en el perfil;
- la cantidad de proteína que puebla cada una de las subpoblaciones de proteínas tercera y cuarta más básicas de las siete subpoblaciones de proteínas es menor que la cantidad de la segunda subpoblación de proteínas más básica de las siete subpoblaciones de proteínas;
- la cantidad de proteína que puebla la subpoblación de proteínas más ácida de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 3\%$  de la masa total de proteínas en el perfil;
- la cantidad de proteína que puebla la segunda subpoblación de proteínas más ácida de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 6\%$  de la masa total de proteínas en el perfil;
- la cantidad de proteína que puebla la tercera subpoblación de proteínas más ácida de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 9\%$  de la masa total de proteínas en el perfil;
- la cantidad de proteína que puebla la subpoblación de proteínas más básica de las siete subpoblaciones de proteínas es  $\leq 8\%$  de la masa total de proteínas en el perfil; y
- no hay otras subpoblaciones de proteínas que tengan una cantidad de proteína de  $\leq 6\%$  de la masa total de proteínas, aparte de la subpoblación de proteínas más ácida, la segunda más ácida, la tercera subpoblación más ácida y más básica de las siete subpoblaciones de proteínas.
3. El método de la reivindicación 1 o 2 que comprende además:
- (c) analizar el producto para determinar el perfil isoeléctrico y repetir la etapa (b) si el perfil isoeléctrico requiere un cambio adicional hacia el perfil más ácido.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la etapa (c) comprende la electroforesis de enfoque isoeléctrico.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la electroforesis de enfoque isoeléctrico es la electroforesis capilar o la electroforesis en gel.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de dO<sub>2</sub> está entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 40 %.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de dO<sub>2</sub> está entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 35 %.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,25.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,20.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,15.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la temperatura está entre aproximadamente 33 °C y aproximadamente 37,5 °C.

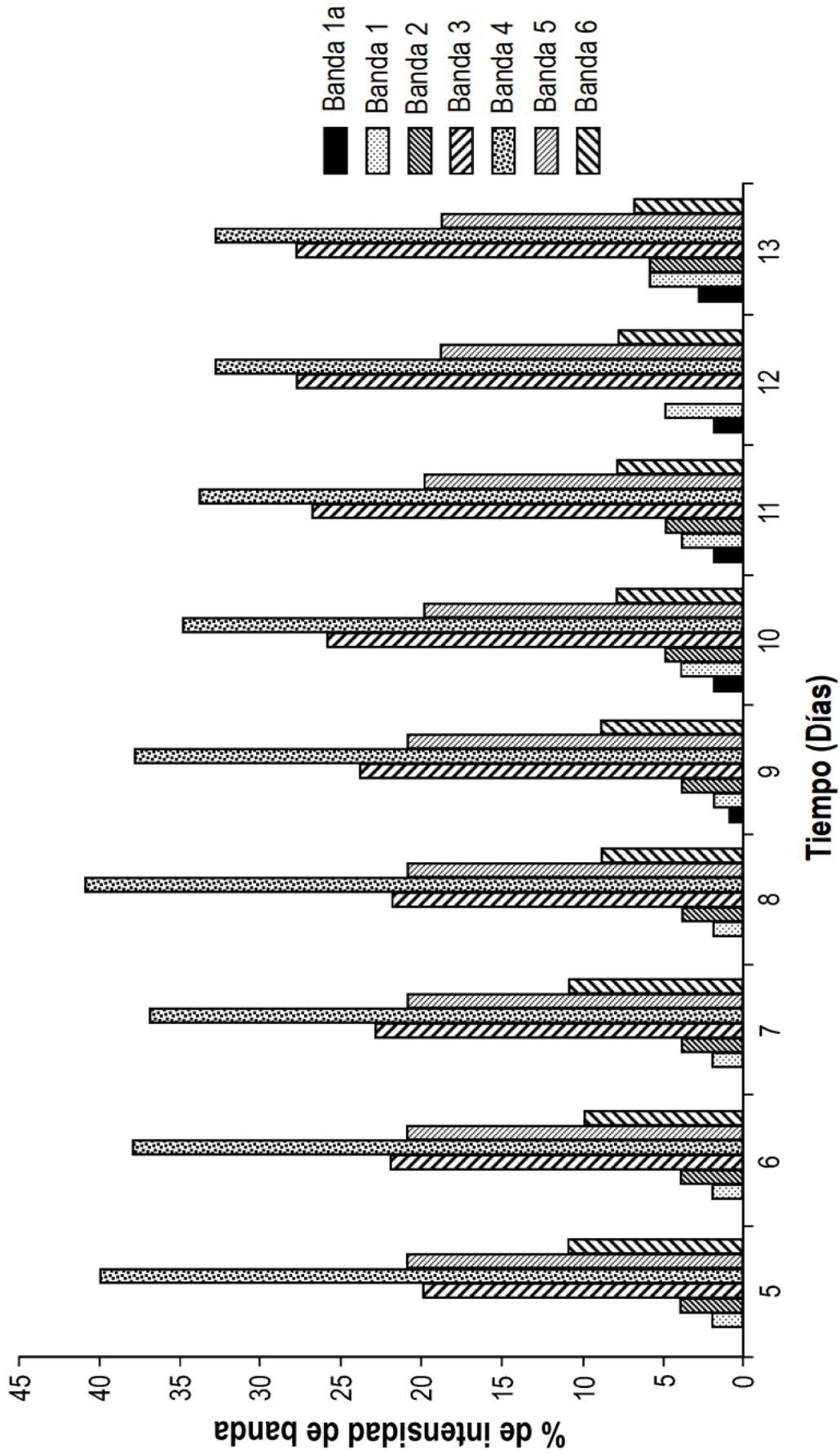
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las condiciones suficientes para cambiar el perfil isoeléctrico del producto a un perfil más ácido incluyen incubar a una velocidad de agitación de entre aproximadamente 200 RPM y aproximadamente 400 RPM.

5 13. El método de la reivindicación 12, en donde la velocidad de agitación está entre aproximadamente 220 RPM y aproximadamente 350 RPM, o entre aproximadamente 220 RPM y aproximadamente 300 RPM.

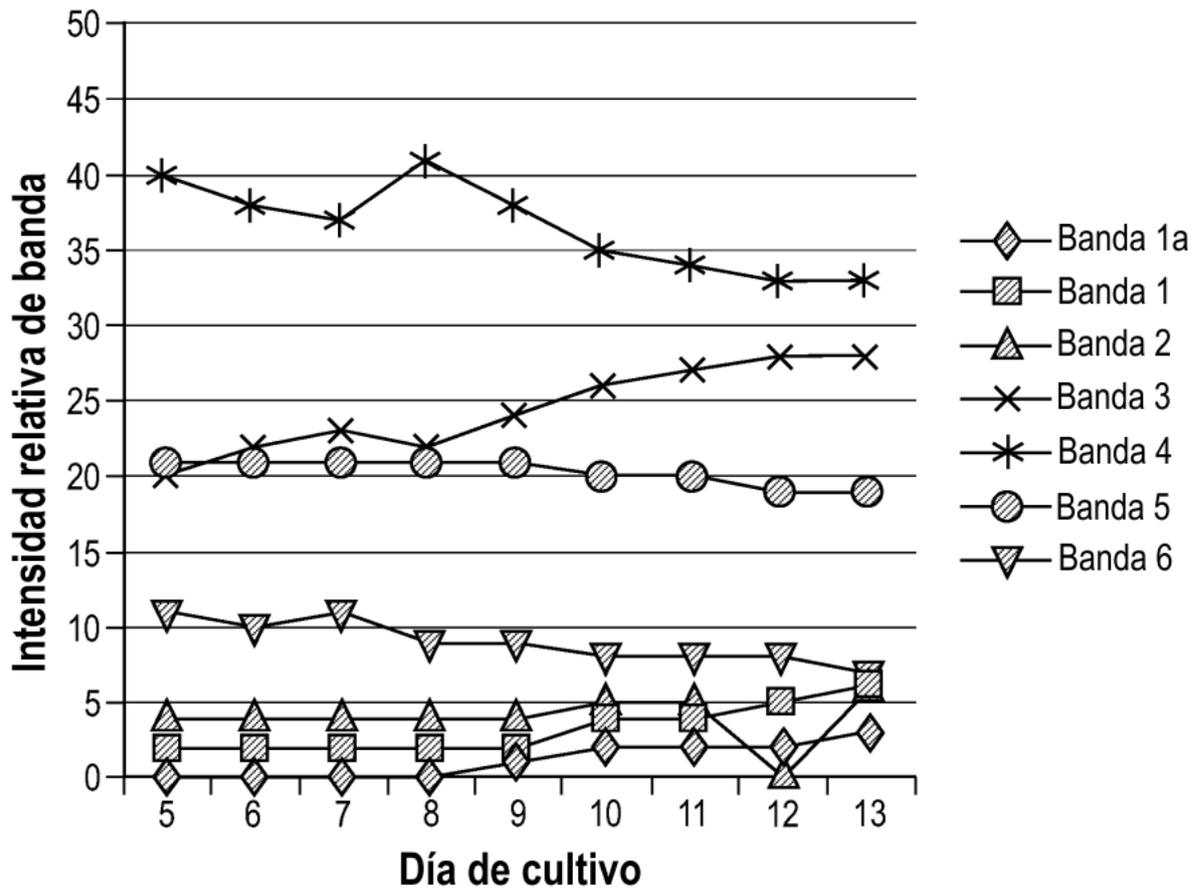
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde eculizumab comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1 y la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 2.

10

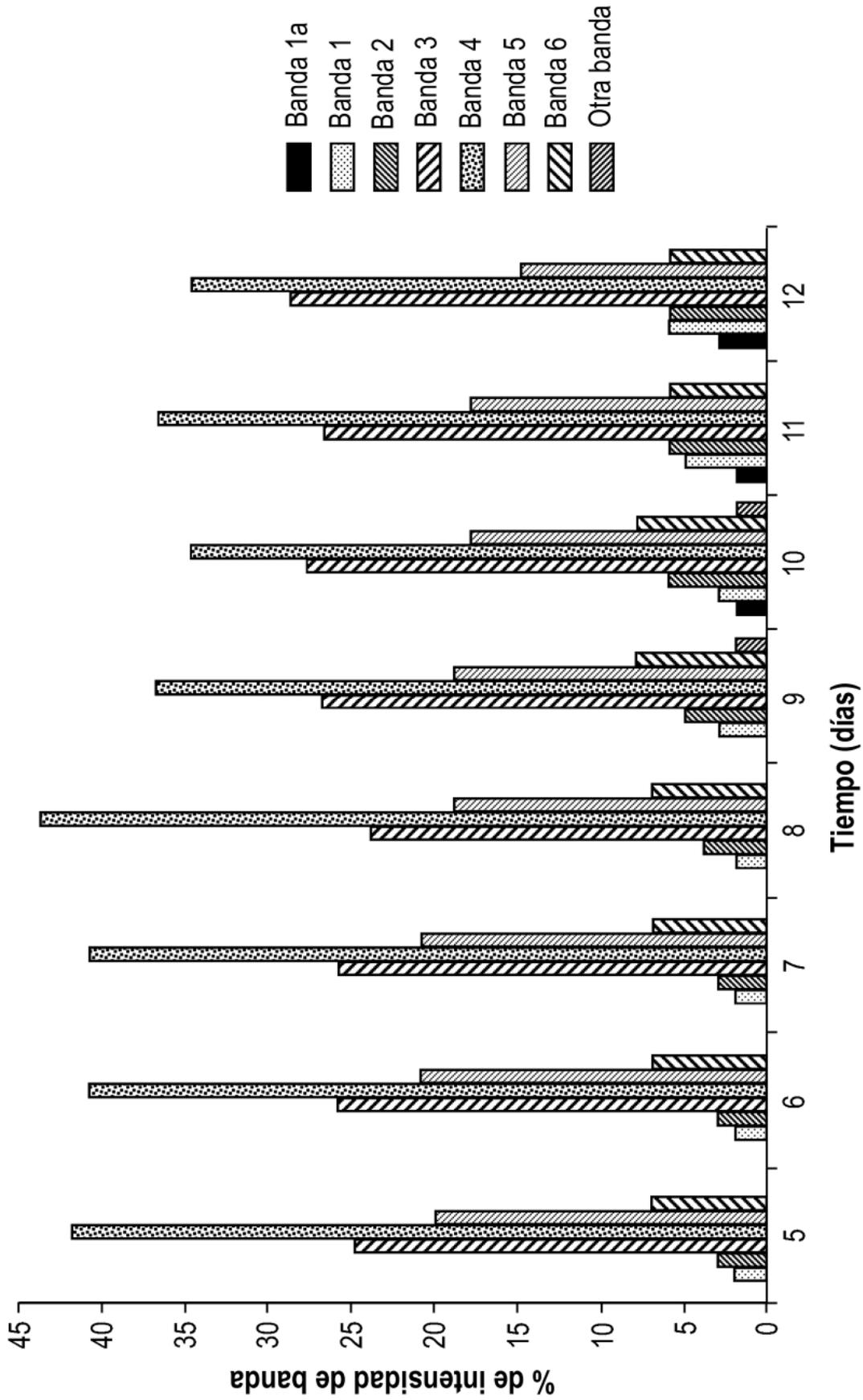
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además:  
(d) formular el producto en una composición farmacéutica.



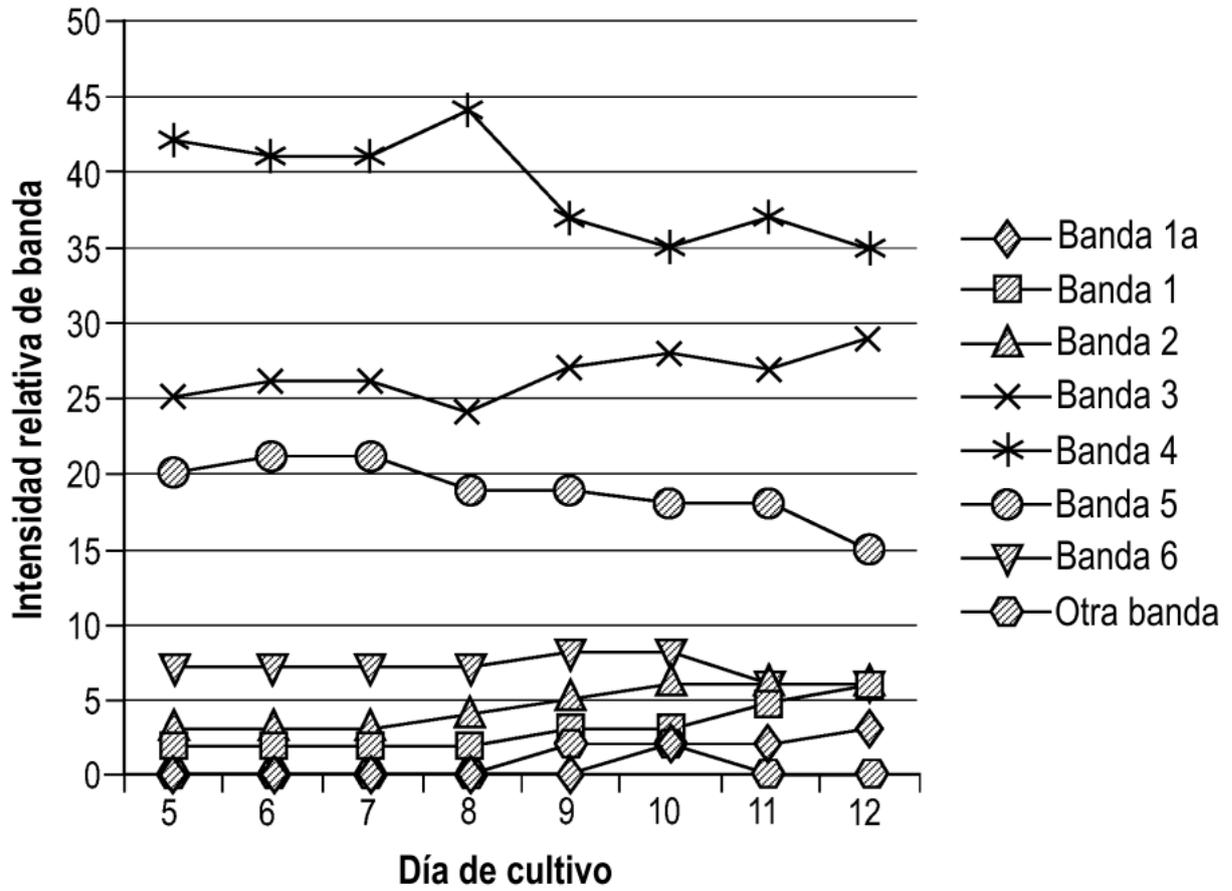
**Fig. 1**



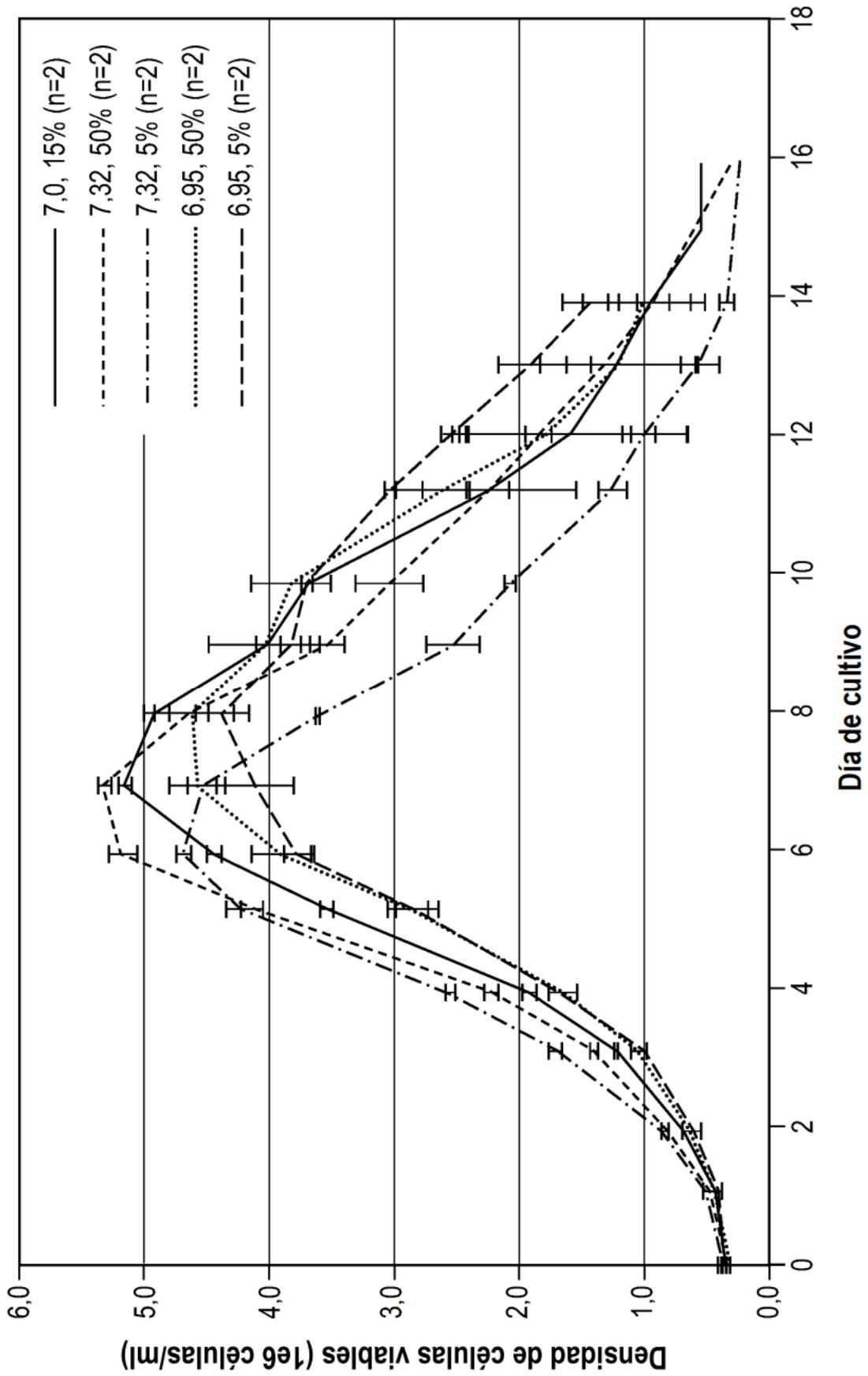
**Fig. 2**



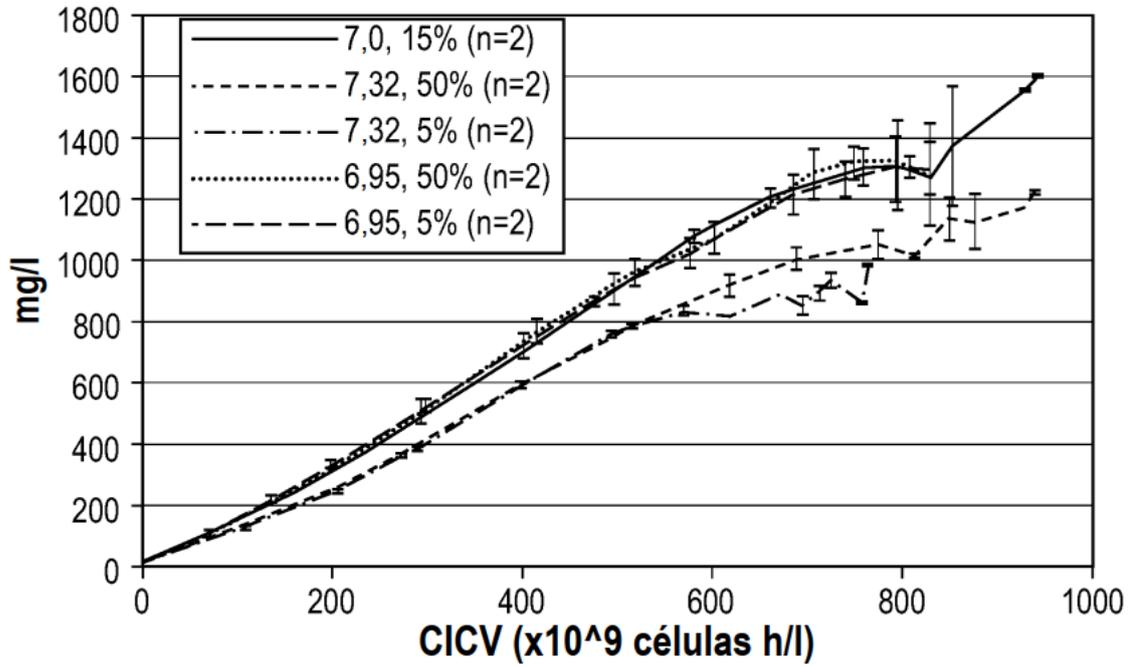
**Fig. 3**



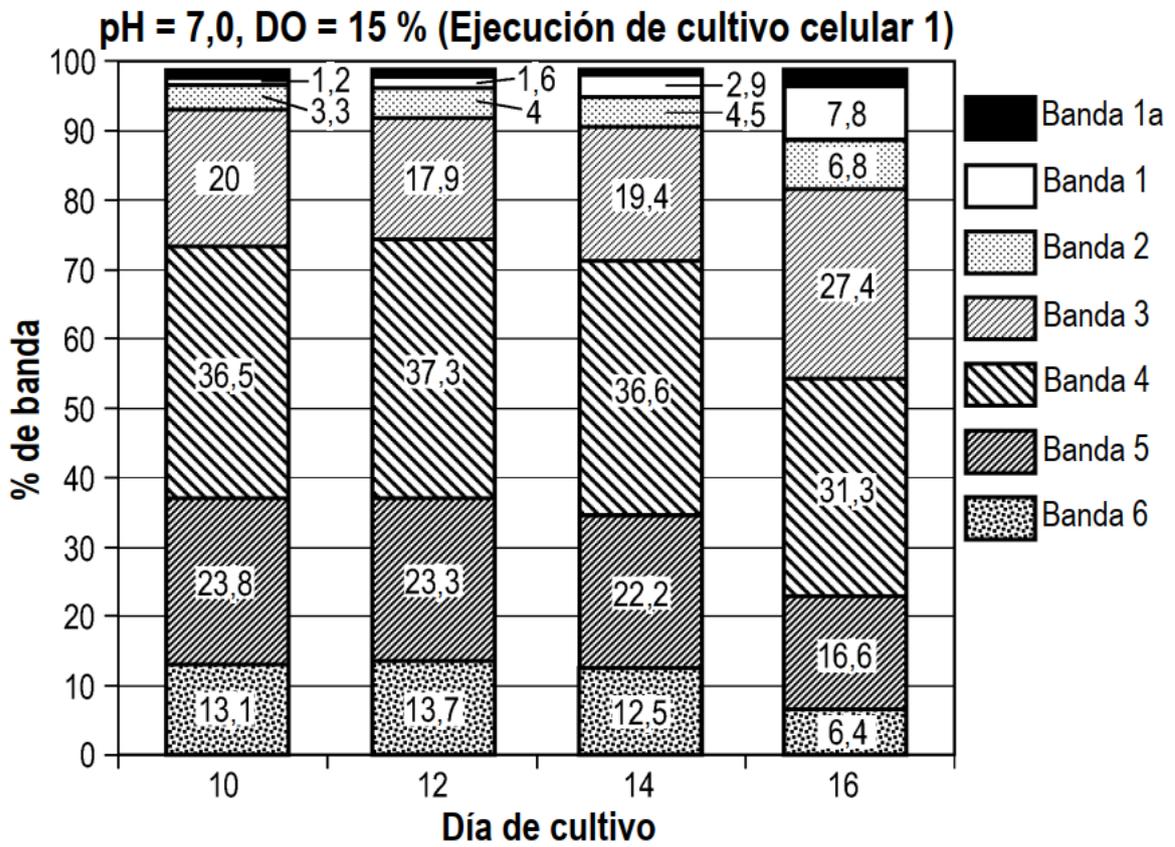
**Fig. 4**



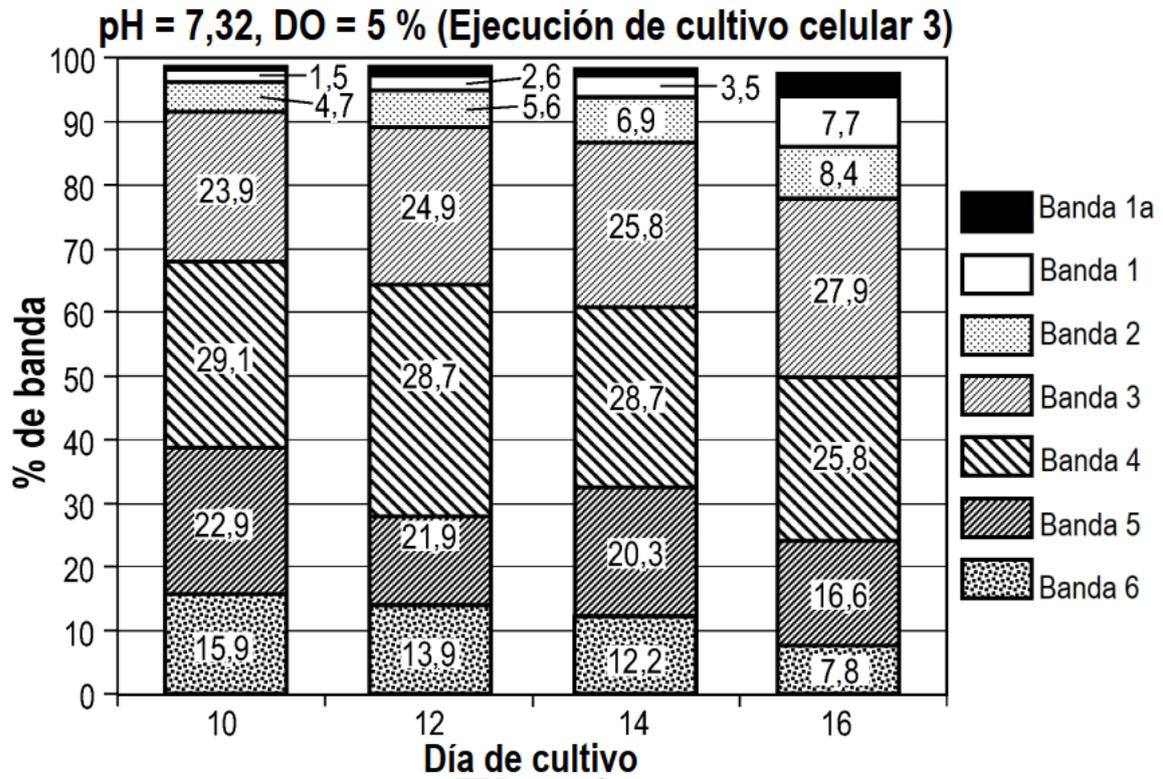
**Fig. 5**



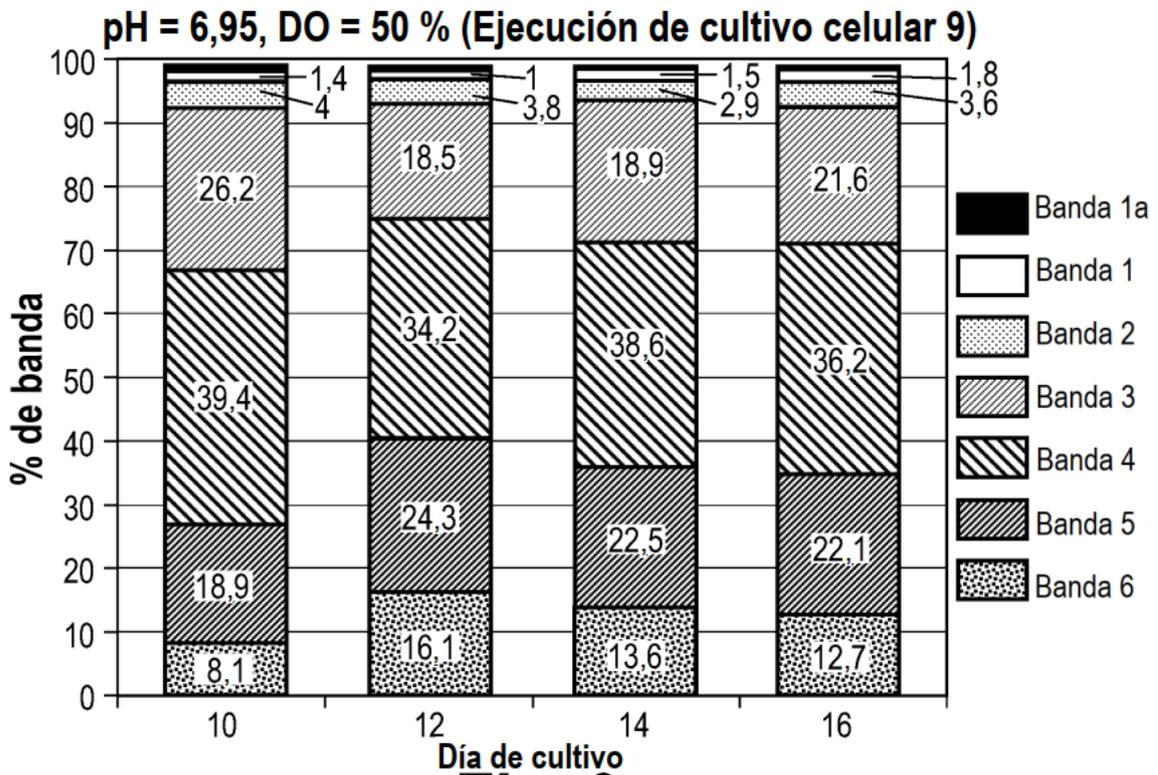
**Fig. 6**



**Fig. 7**

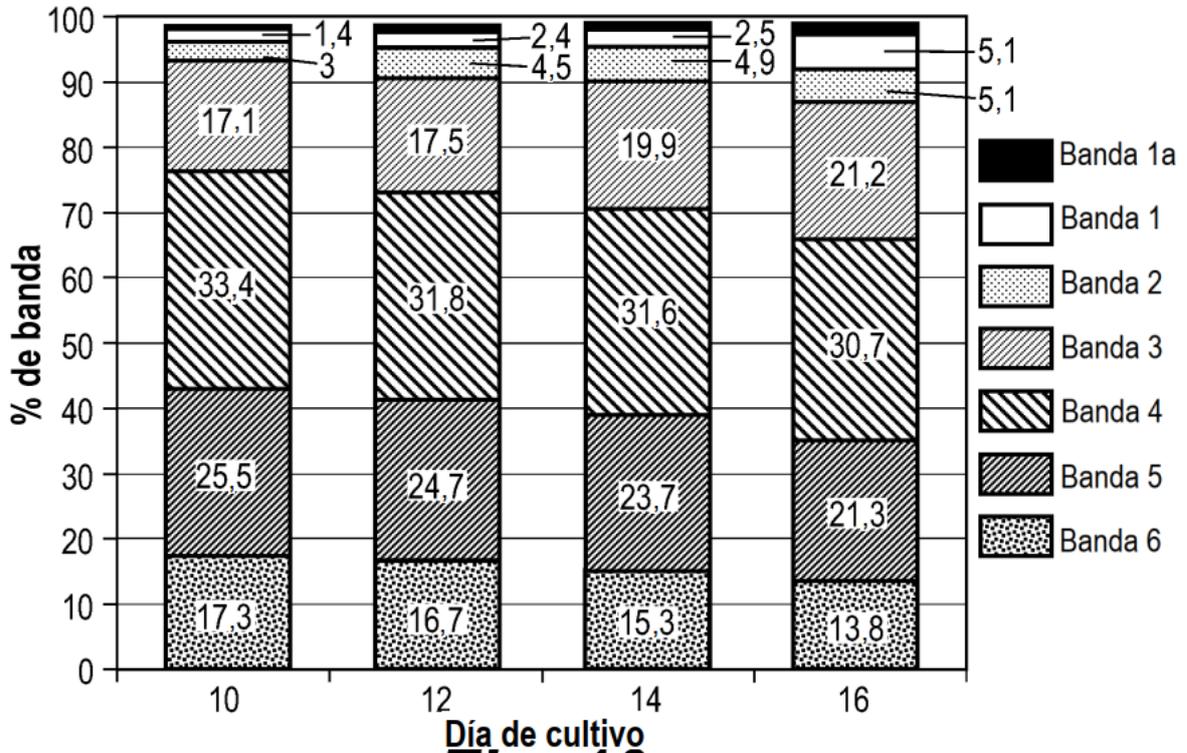


**Fig. 8**

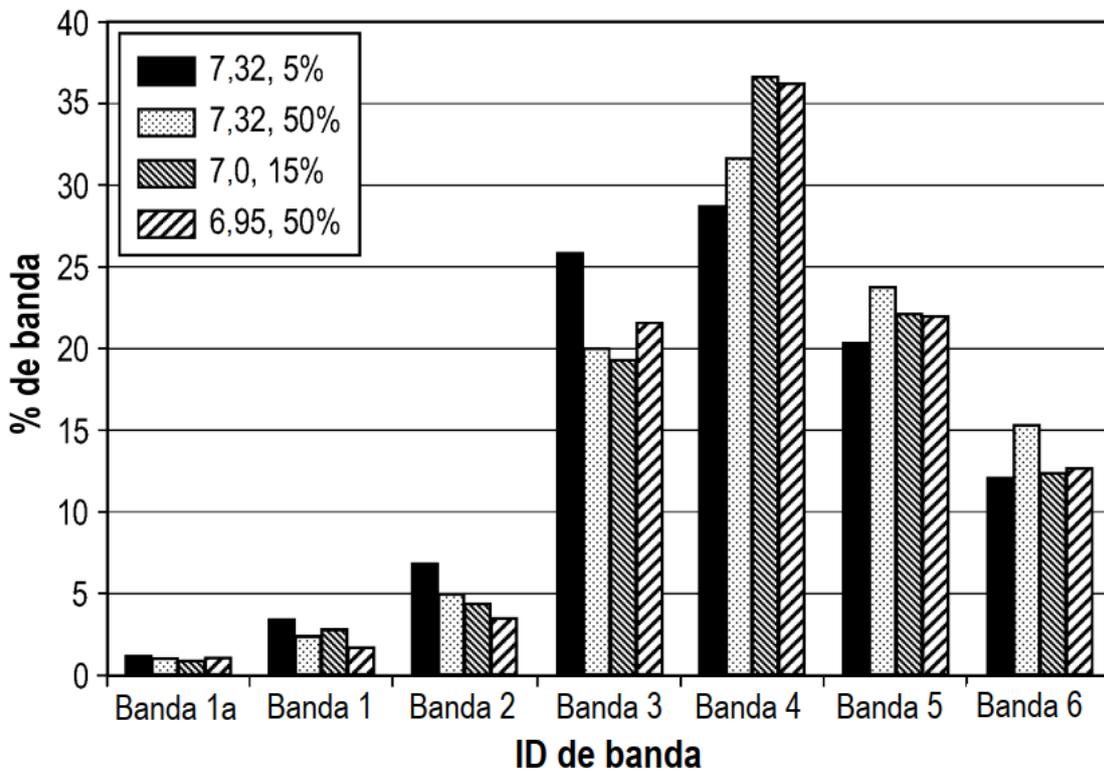


**Fig. 9**

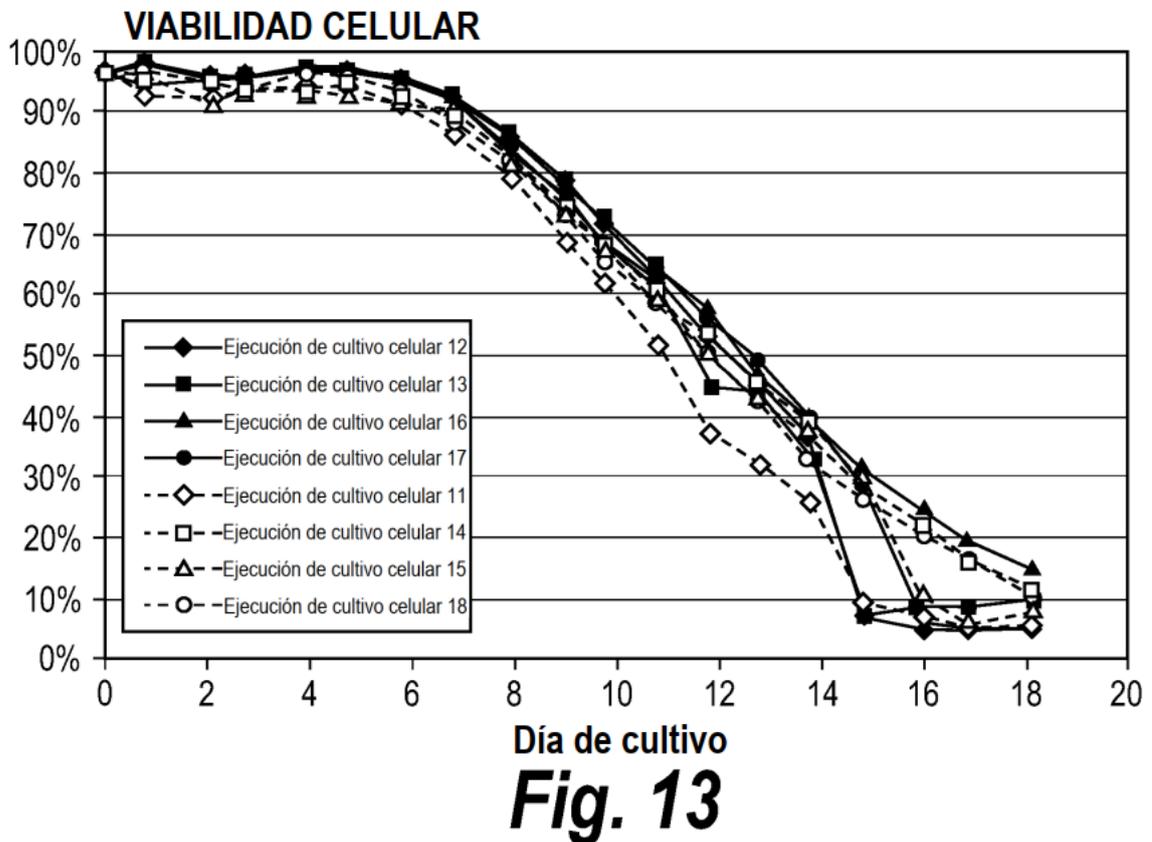
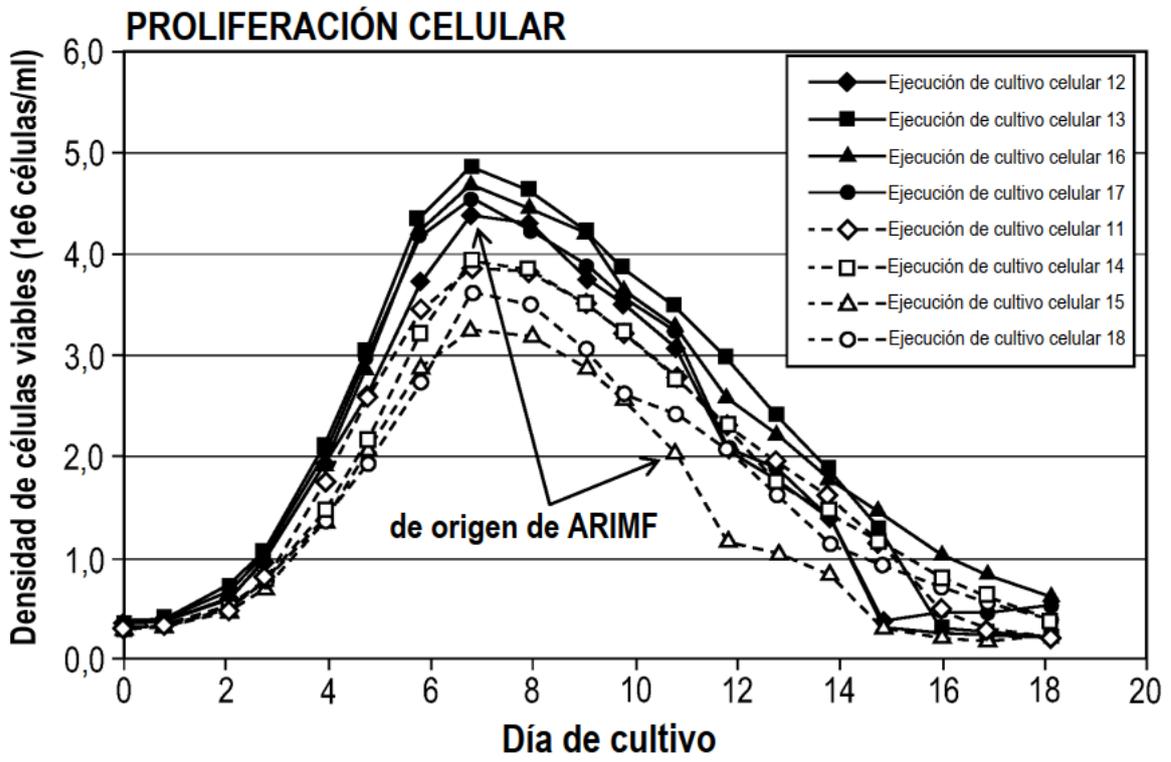
**pH = 7,32, DO = 50 % (Ejecución de cultivo celular 5)**

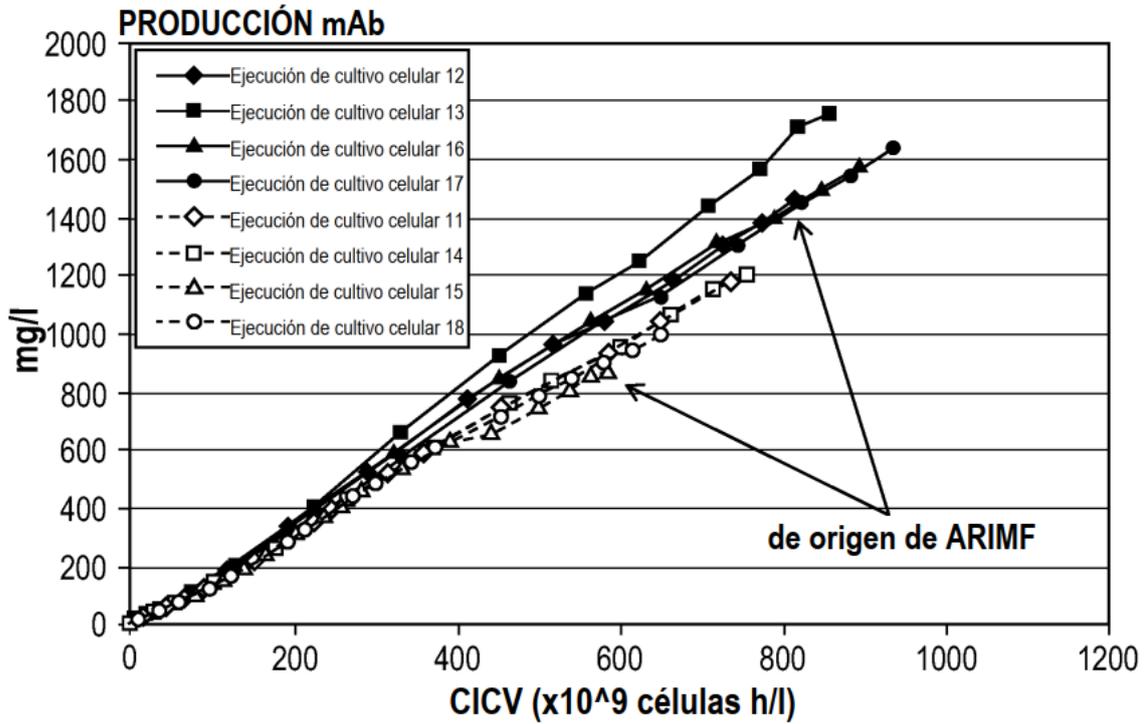


**Fig. 10**



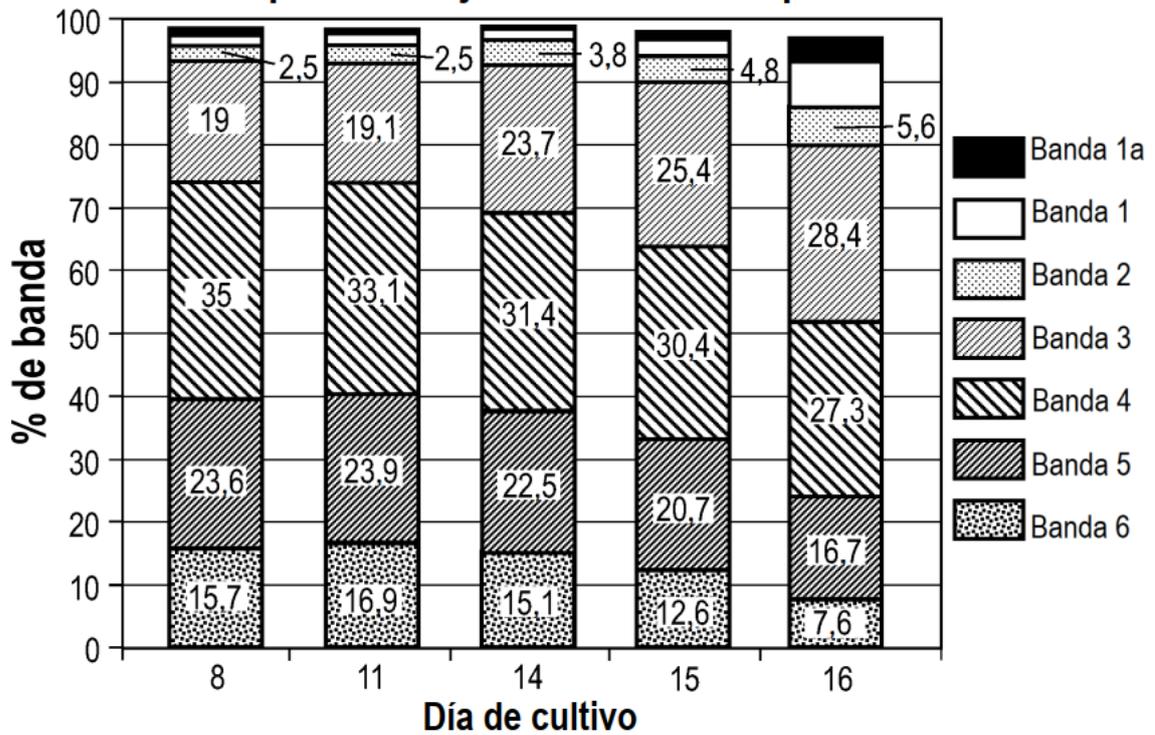
**Fig. 11**





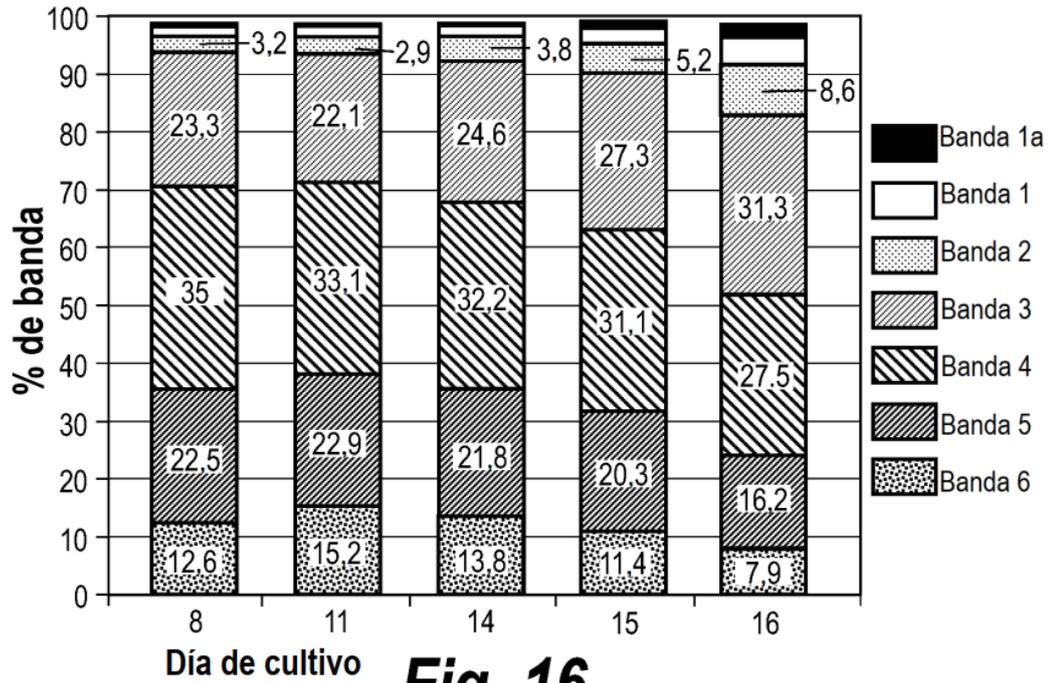
**Fig. 14**

**Ejecución de cultivo celular 11: células de Origen A  
+ primer conjunto de materias primas**

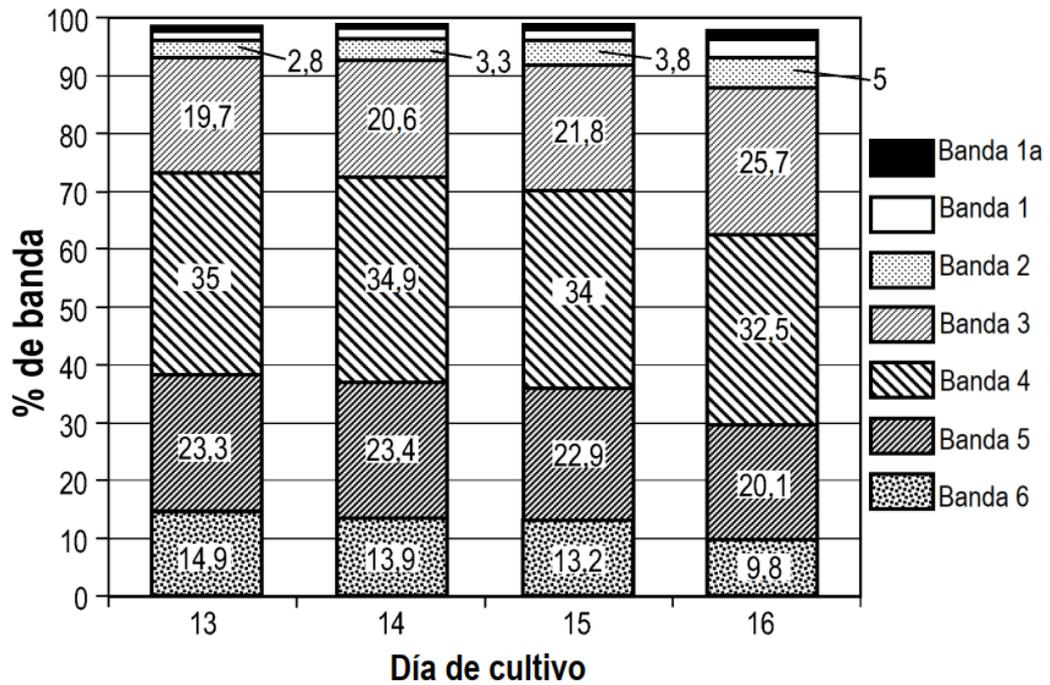


**Fig. 15**

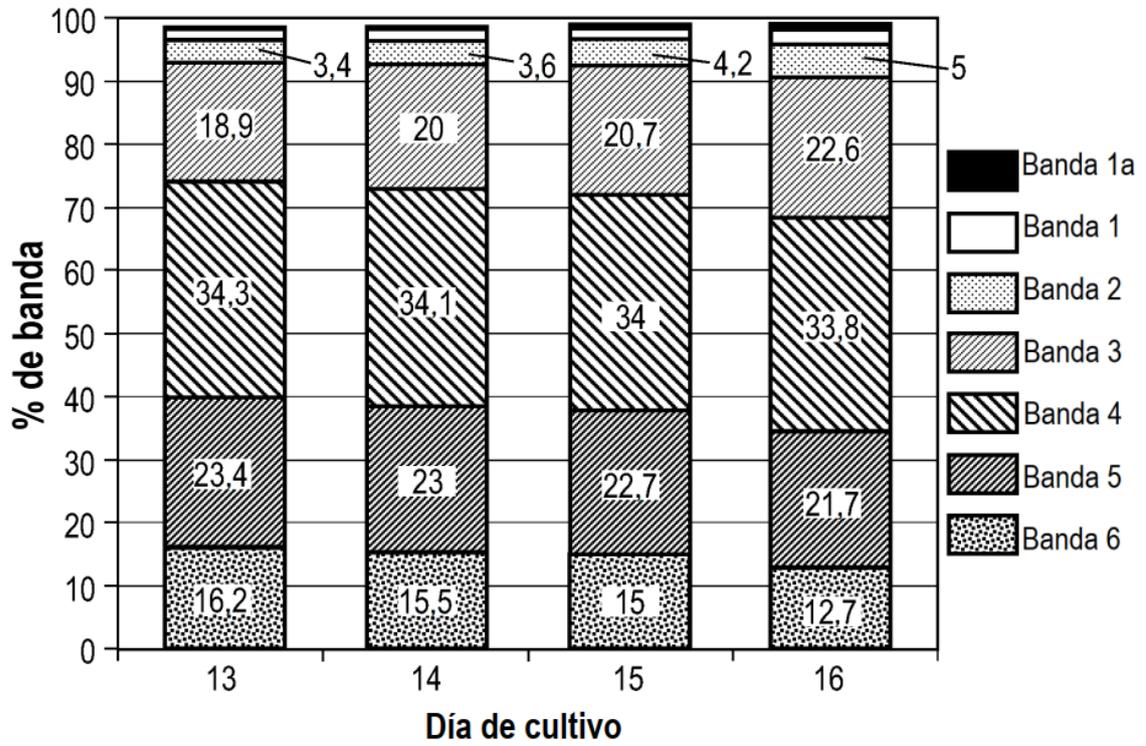
Ejecución de cultivo celular 12: células de Origen B + primer conjunto de materias primas



Ejecución de cultivo celular 13: células de Origen B + segundo conjunto de materias primas



Ejecución de cultivo celular 14: células de Origen A + segundo conjunto de materias primas



**Fig. 18**