

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 630**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12M 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2015 PCT/US2015/034709**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15191462**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2015 E 15730933 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3152299**

54 Título: **Procesos encadenados de inóculo y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**09.06.2014 US 201462009553 P**

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

**13.07.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BRUNINGHAUS, MICHAEL;  
KONSTANTINOV, KONSTANTIN;  
WRIGHT, BENJAMIN y  
ZHOU, WEICHANG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 773 630 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**

Procesos encadenados de inóculo y usos de los mismos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/009553, presentada el 9 de junio de 2014.

Campo técnico

Esta invención se refiere a métodos de biotecnología y la biofabricación de proteínas recombinantes.

Antecedentes

10 Las células de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante a menudo se usan para para producir proteínas terapéutica o comercialmente importantes. En el entorno actual de productos en fase de desarrollo diversos, las empresas de biotecnología cada vez están dirigidas al desarrollo de soluciones innovadoras para una fabricación muy flexible y rentable de agentes terapéuticos.

15 Las células de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante a menudo se cultivan en biorreactores de producción grandes para producir proteínas terapéuticas de interés. Se usan procesos encadenados de inóculo para generar un número suficiente de dichas células de mamífero para inocular los biorreactores de producción grandes. Los procesos encadenados de inóculo convencionales empiezan con la descongelación de un vial de banco de células criopreservado, seguido de múltiples etapas de cultivo (por ejemplo, 5 o más) en recipientes de cultivo progresivamente más grandes. Los procesos encadenados de inóculo convencionales tienen varias desventajas que incluyen la necesidad de múltiples manipulaciones manuales durante  
20 cada etapa, lo que hace que el proceso completo sea vulnerable a contaminación y error del operario. Además, los procesos encadenados de inóculo convencionales son muy lentos debido al número de etapas de cultivo y debido a las bajas densidades celulares conseguidas en la etapa N-1 (penúltimo cultivo celular a la inoculación del biorreactor de producción) que puede producir únicamente una densidad celular de partida de menos de  $0,5 \times 10^6$  células/ml en biorreactores de producción a gran escala, que requiere una fase de crecimiento de 5-10 días para alcanzar la  
25 densidad celular de producción en estado de equilibrio.

Compendio

La presente invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de procesos encadenados de inóculo que producen varias ventajas incluyendo, por ejemplo, menos complejidad, un número reducido de etapas de cultivo, una reducción en la cantidad de tiempo desde un cultivo celular de partida (por ejemplo, un banco de células descongelado) hasta la inoculación de un biorreactor de producción, una cantidad reducida de manipulación manual, un riesgo reducido de contaminación, una mayor densidad de células viables de las células de partida en el biorreactor de producción y una fase de crecimiento más corta en el biorreactor de producción (por ejemplo, un periodo de tiempo corto necesario para alcanzar la densidad celular de producción en estado de equilibrio). Los procesos encadenados de inóculo proporcionados incluyen (a) disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes en un primer medio de cultivo incluido dentro de un recipiente para proporcionar un primer cultivo celular; (b) cultivar de manera discontinua el primer cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml; (c) disponer un volumen del primer cultivo celular de (b) en un segundo medio de cultivo incluido dentro de un biorreactor de perfusión para proporcionar un segundo cultivo celular con un densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml; (d) cultivar por perfusión el segundo cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $120 \times 10^6$  células/ml; y (e) disponer un volumen del segundo cultivo celular de (d) en un tercer medio de cultivo incluido dentro de un biorreactor de producción para proporcionar un cultivo celular de producción con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,20 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células/ml. También se divulgan  
45 en la presente memoria métodos de producción de una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) que incluye el uso de uno de los procesos encadenados de inóculo descritos en la presente memoria.

En la presente memoria se proporciona un método de producción de una proteína recombinante, que comprende:

50 (a) disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes en un primer medio de cultivo comprendido dentro de un recipiente para proporcionar un primer cultivo celular;

(b) cultivar de forma discontinua el primer cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml;

(c) disponer un volumen del primer cultivo celular de la etapa (b) en un segundo medio de cultivo comprendido dentro de un biorreactor de perfusión para proporcionar un segundo cultivo celular con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml;

5 (d) cultivar por perfusión el segundo cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $120 \times 10^6$  células/ml;

(e) disponer un volumen del segundo cultivo celular de la etapa (d) en un tercer medio de cultivo comprendido dentro de un biorreactor de producción para proporcionar un cultivo celular de producción con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml;

10 (f) cultivar por perfusión el cultivo celular de producción en condiciones que permitan que las células de mamífero recombinantes secreten una proteína recombinante; y

(g) recoger la proteína recombinante del cultivo celular de producción.

15 En algunas realizaciones, disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en (a) incluye: descongelar un banco de culas congelado; y disponer un volumen del banco de células descongelado en el primer medio de cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los procesos, el banco de células congelado contiene un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml a aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml. En algunas realizaciones, el banco de células descongelado contiene un porcentaje de células viables de al menos un 60 % (por ejemplo, al menos un 90 %).

20 En algunas realizaciones, disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en (a) incluye disponer un volumen de un tercer cultivo celular que contiene la pluralidad de células de mamífero recombinantes en el primer medio de cultivo. Algunas realizaciones de cualquier de los procesos incluyen además (1) disponer una pluralidad de las células de mamífero recombinantes en un cuarto medio de cultivo comprendido dentro de un recipiente para proporcionar el tercer cultivo celular; (2) cultivar de forma discontinua el tercer cultivo celular de (1) hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, donde se dispone un volumen del tercer cultivo celular de (2) en el primer medio de cultivo de (a). En algunas realizaciones, uno del recipiente de (a) o el recipiente de (1) o los dos son un biorreactor de un solo uso desechable (por ejemplo, un biorreactor de un solo uso desechable que incluye una bolsa estéril de plástico).

30 En algunas realizaciones, disponer la pluralidad de las células de mamífero recombinantes en (1) incluye descongelar un banco de células congelado y disponer un volumen del banco de células descongelado en el cuarto medio de cultivo. En algunas realizaciones, el banco de células congelado comprende un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml a aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml. En algunas realizaciones el banco de células descongelado contiene un porcentaje de células viables de al menos un 60 % (por ejemplo, al menos un 90 %).

35 En algunas realizaciones, el primer cultivo celular en (a) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 1,0 l a aproximadamente 50 l (por ejemplo, de aproximadamente 5,0 l a aproximadamente 10 l). En algunas realizaciones, el segundo cultivo celular en (c) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 5 l a aproximadamente 600 l (por ejemplo, de aproximadamente 10 l a aproximadamente 300 l). En algunas realizaciones, el cultivo celular de producción en (e) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 50 l a aproximadamente 20 000 l (por ejemplo, de aproximadamente 100 l a aproximadamente 10 000 l). En algunas realizaciones, el cuarto medio de cultivo en (1) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 500 ml a aproximadamente 20 l (por ejemplo, de aproximadamente 500 ml a aproximadamente 10 l).

45 En algunas realizaciones, el recipiente en (a) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 1,5 l a aproximadamente 100 l (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 l a aproximadamente 50 l). En algunas realizaciones, el biorreactor de perfusión en (c) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 7,5 l a aproximadamente 1000 l (por ejemplo, de aproximadamente 50 l a aproximadamente 1000 l). En algunas realizaciones, el biorreactor de producción en (e) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 150 l a aproximadamente 25 000 l (por ejemplo, de aproximadamente 150 l a aproximadamente 10 000 l). En algunas realizaciones, el recipiente en (1) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 1 l a aproximadamente 40 l (por ejemplo, de aproximadamente 1 l a aproximadamente 20 l).

50 En algunas realizaciones, el cultivo por perfusión en (c) se realiza usando un biorreactor de perfusión equipado con un dispositivo de filtración de flujo tangencial alterno. En algunas realizaciones, la densidad celular inicial en (e) está en un intervalo de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml. En algunas realizaciones, la densidad celular inicial en (e) es de al menos un 10 % (por ejemplo, al menos un 20 %) de la densidad celular de producción en estado de equilibrio.

También se divulgan procesos de producción de una proteína recombinante, que incluye:

55 (a) disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes en un primer medio de cultivo comprendido dentro de un recipiente para proporcionar un primer cultivo celular; (b) cultivar de forma discontinua el primer cultivo

celular hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml; (c) disponer un volumen del primer medio de cultivo celular de (b) en un segundo medio de cultivo comprendido dentro de un biorreactor de perfusión para proporcionar un segundo cultivo celular con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml; (d) cultivar por perfusión el segundo cultivo células hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^6$  células/ml; (e) disponer un volumen del segundo cultivo celular de (d) en un tercer medio de cultivo comprendido dentro de un biorreactor de producción para proporcionar un cultivo celular de producción con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml; (f) cultivar por perfusión el cultivo celular de producción en condiciones que permitan que las células de mamífero recombinantes secreten una proteína recombinante; y (g) recoger la proteína recombinante del cultivo celular de producción. En algunas realizaciones de cualquiera de los procesos, disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en (a) incluye: descongelar un banco de células congelado; y disponer un volumen del banco de células descongelado en el primer medio de cultivo. En algunas realizaciones, el banco de células congelado tiene un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml a aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml. En algunas realizaciones, el banco de células descongelado contiene un porcentaje de células viables de al menos un 60 % (por ejemplo, al menos un 90 %).

En algunas realizaciones, disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en (a) incluye disponer un volumen de un tercer cultivo celular que comprende la pluralidad de células de mamífero recombinantes en el primer medio de cultivo. Algunas realizaciones de cualquiera de los procesos incluyen además: (1) disponer una pluralidad de las células de mamífero recombinantes en un cuarto medio de cultivo comprendido dentro de un recipiente para proporcionar el tercer cultivo celular; y (2) cultivar de forma discontinua el tercer cultivo celular en (1) hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, donde un volumen del tercer cultivo celular en (2) se dispone en el primer medio de cultivo en (a). En algunas realizaciones, uno del recipiente de (a) o el recipiente de (1) o ambos son un biorreactor de un solo uso desechable (por ejemplo, un biorreactor de un solo uso desechable que incluye una bolsa estéril de plástico).

En algunas realizaciones, disponer la pluralidad de las células de mamífero recombinantes en (1) incluye: descongelar un banco de células congelado; y disponer un volumen del banco de células descongelado en el cuarto medio de cultivo. En algunas realizaciones de cualquiera de los procesos, el banco de células congelado comprende un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  células/ml a aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml). En algunas realizaciones, el banco de células descongelado contiene un porcentaje de células viables de al menos un 60 % (por ejemplo, al menos un 90 %).

En algunas realizaciones, el primer cultivo celular en (a) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 1,0 l a aproximadamente 50 l (por ejemplo, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 10,0 l). En algunas realizaciones, el segundo cultivo celular en (c) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 5 l a aproximadamente 600 l (por ejemplo, de aproximadamente 10 l a aproximadamente 300 l). En algunas realizaciones, el cultivo celular de producción en (e) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 50 l a aproximadamente 20 000 l (por ejemplo, de aproximadamente 100 l a aproximadamente 10 000 l). En algunas realizaciones, el cuarto medio de cultivo en (1) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 500 ml a aproximadamente 20 l (por ejemplo, de aproximadamente 500 ml a aproximadamente 10 l).

En algunas realizaciones, el recipiente en (a) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 1,5 l a aproximadamente 100 l (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 l a aproximadamente 50 l). En algunas realizaciones, el biorreactor de perfusión en (c) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 7,5 l a aproximadamente 1000 l (por ejemplo, de aproximadamente 50 l a aproximadamente 1000 l). En algunas realizaciones, el biorreactor de producción en (e) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 150 l a aproximadamente 25 000 l (por ejemplo, de 150 l a aproximadamente 10 000 l). En algunas realizaciones, el recipiente en (1) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 1 l a aproximadamente 40 l (por ejemplo, de aproximadamente 1 l a aproximadamente 20 l).

En algunas realizaciones, el cultivo por perfusión en (c) se realiza usando un biorreactor de perfusión equipado con un dispositivo de filtración de flujo tangencial alterno. En algunas realizaciones, la densidad celular inicial en (e) está en un intervalo de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml. En algunas realizaciones, la densidad celular inicial en (e) es de al menos un 10 % (por ejemplo, al menos un 20 %) de la densidad celular de producción en estado de equilibrio. En algunas realizaciones, la densidad celular de producción en estado de equilibrio es entre  $5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^6$  células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^6$  células/ml). En algunas realizaciones, el cultivo por perfusión en (f) provoca la producción de cultivo celular que alcanza la densidad celular de producción en estado de equilibrio en un periodo entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 10 días (por ejemplo, entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 5 días).

En algunas realizaciones, la recogida en (g) incluye retirar (por ejemplo, retirar de forma continua) el medio de cultivo del biorreactor de producción. Algunas realizaciones de cualquiera de los procesos incluyen además aislar la proteína recombinante del medio de cultivo retirado. En algunas realizaciones, el aislamiento se realizó usando un

proceso integrado y continuo. Algunas realizaciones de cualquiera de los procesos incluyen además formular la proteína recombinante aislada en un agente farmacéutico.

5 Como se usa en la presente memoria, la palabra "uno/una" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo particular. Por ejemplo, la expresión "una célula de mamífero recombinante" representa "una o más células de mamífero recombinantes".

10 La expresión "célula de mamífero" significa cualquier célula de o derivada de cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca o un conejo). Por ejemplo, una célula de mamífero puede ser una célula inmortalizada. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula diferenciada. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula indiferenciada. Ejemplos no limitantes de células de mamífero se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de células de mamífero son conocidos en la técnica.

15 La expresión "proceso encadenado de inóculo" es conocido en la técnica y significa un método de múltiples etapas por el que un número de partida de células (por ejemplo, células de mamífero recombinantes) en un primer cultivo celular se expande en un cultivo celular N-1 que contiene un número suficiente de células para inocular un biorreactor de producción típico a una densidad celular inicial de más de  $0,25 \times 10^6$  células/ml.

La expresión "sustancialmente libre" significa una composición (por ejemplo, un medio de cultivo líquido) que está al menos o aproximadamente un 90 % libre (por ejemplo, al menos o aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o al menos o aproximadamente un 99 % libre, o aproximadamente un 100 % libre) de una sustancia especificada (por ejemplo, una célula de mamífero).

20 La expresión "volumen 0,5x" significa aproximadamente un 50 % del volumen. La expresión "volumen 0,6x" significa aproximadamente un 60 % del volumen. Asimismo, 0,7x, 0,8x, 0,9x y 1,0x significa aproximadamente un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 100 % del volumen, respectivamente.

La expresión "cultivo" o "cultivo celular" significa el mantenimiento o proliferación de una célula de mamífero (por ejemplo, una célula de mamífero recombinante) en un conjunto controlado de condiciones físicas.

25 La expresión "cultivo de células de mamífero" o "cultivo celular" significa un medio de cultivo líquido que contiene una pluralidad de células de mamífero que se mantiene o prolifera en un conjunto controlado de condiciones físicas.

30 La expresión "medio de cultivo líquido" o "medio de cultivo" significa un fluido que contiene suficientes nutrientes para permitir que una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) crezca o prolifere *in vitro*. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido puede contener uno o más de: aminoácidos (por ejemplo, 20 aminoácidos), una purina (por ejemplo, hipoxantina), una pirimidina (por ejemplo, timidina), colina, inositol, tiamina, ácido fólico, biotina, calcio, niacinamida, piridoxina, riboflavina, timidina, cianocobalamina, piruvato, ácido lipoico, magnesio, glucosa, sodio, potasio, hierro, cobre, cinc y bicarbonato de sodio. En algunas realizaciones, el medio de cultivo líquido puede contener suero de un mamífero. En algunas realizaciones, un medio de cultivo líquido no contiene suero u otro extracto de un mamífero (un medio de cultivo líquido definido). En algunas realizaciones, un medio cultivo líquido puede contener oligometales, una hormona de crecimiento de mamífero y/o un factor de crecimiento de mamífero. Otro ejemplo de medio de cultivo líquido es medio mínimo (por ejemplo, un medio que contiene únicamente sales orgánicas, una fuente de carbono y agua). Ejemplos no limitantes de medio de cultivo líquido se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de medio de cultivo líquido son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Un medio de cultivo líquido puede contener cualquier densidad de células de mamífero. Por ejemplo, como se usa en la presente memoria, un volumen de medio de cultivo líquido retirado de un biorreactor de producción puede estar sustancialmente libre de células de mamífero.

35 La expresión "medio de cultivo líquido sin componentes de origen animal" significa un medio de cultivo líquido que no contiene ningún componente (por ejemplo, proteínas o suero) derivados de un mamífero.

40 La expresión "medio de cultivo líquido sin suero" significa un medio de cultivo líquido que no contiene un suero de mamífero.

La expresión "medio de cultivo líquido que contiene suero" significa un medio de cultivo líquido que contiene un suero de mamífero.

45 La expresión "medio de cultivo líquido definido químicamente" es una expresión de la técnica y significa un medio de cultivo líquido en que todos los componentes químicos son conocidos. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido definido químicamente no contiene suero bovino fetal, seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana, ya que estas preparaciones contienen típicamente una mezcla compleja de albuminas y lípidos.

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

El término "agitación" significa revolver o mover de otro modo una parte del medio de cultivo líquido en un recipiente (por ejemplo, biorreactor). Esto se realiza para, por ejemplo, aumentar la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo líquido en un recipiente (por ejemplo, biorreactor). La agitación puede realizarse usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, un instrumento o propulsor. Por ejemplo, la agitación puede realizarse colocando un recipiente en una plataforma que se inclina y/o rota. Dispositivos ejemplares y métodos que pueden usarse para realizar la agitación de una parte del medio de cultivo líquido en un recipiente (por ejemplo, un biorreactor) son conocidos en la técnica.

La expresión "proceso integrado" significa un proceso que se realiza usando elementos estructurales que funcionan de manera cooperativa para conseguir un resultado específico (por ejemplo, la generación de una proteína recombinante aislada a partir de un medio de cultivo líquido).

La expresión "proceso continuo" significa un proceso que alimenta de forma continua el fluido a través de al menos una parte del sistema.

El término "inmunoglobulina" significa un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 15 aminoácidos (por ejemplo, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos) de una proteína inmunoglobulina (por ejemplo, una secuencia de dominio variable, una secuencia estructural o una secuencia de dominio constante). La inmunoglobulina puede incluir, por ejemplo, al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena ligera, por ejemplo, al menos 15 aminoácidos de una inmunoglobulina de cadena pesada. 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 fragmento scFv. La inmunoglobulina también puede ser un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo trispecífico, o un anticuerpo dimérico, trimérico o multimérico o un diacuerpo, 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). Ejemplos no limitantes de inmunoglobulinas se describen en la presente memoria y ejemplos adicionales de inmunoglobulinas son conocidos en la técnica.

La expresión "fragmento proteínico" o "fragmento polipeptídico" significa una parte de una secuencia polipeptídica 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. Un fragmento de proteína recombinante puede producirse usando cualquiera de los procesos.

La expresión "proteína genomanipulada" significa un polipéptido que no está codificado de manera natural por un ácido nucleico endógeno presente dentro de un organismo (por ejemplo, un mamífero). Ejemplos de proteínas genomanipuladas incluyen enzimas (por ejemplo, con una o más sustituciones, eliminaciones, inserciones o adiciones aminoacídicas que provocan un aumento en la estabilidad y/o actividad catalítica de la enzima genomanipulada), proteínas de fusión, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos divalentes, anticuerpos trivalentes o un diacuerpo) y proteínas de unión a antígeno que contienen al menos una secuencia de armazón recombinante.

La expresión "sistema de cromatografía de múltiples columnas" o "MCCS" significa un sistema de un total de dos o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas interconectadas o conmutables. Un ejemplo no limitante de un sistema de cromatografía de múltiples columnas es un sistema de cromatografía a contracorriente periódico (PCC) que contiene un total de dos o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas interconectadas o conmutables. Ejemplos adicionales de sistemas de cromatografía de múltiples columnas se describen en la presente memoria y son conocidos en la técnica.

El término "capturar" significa una etapa realizada para purificar parcialmente o aislar (por ejemplo, al menos o aproximadamente un 5 %, por ejemplo, al menos o aproximadamente un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o al menos o aproximadamente un 95 % puro en peso), concentrar y estabilizar una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) de uno o más componentes distintos presentes en un medio de cultivo líquido o un medio de cultivo líquido diluido (por ejemplo, proteínas del medio de cultivo o uno o más componentes distintos (por ejemplo, ADN, ARN u otras proteínas) presentes en o secretados de una célula de mamífero). Típicamente, la captura se realiza usando una resina que se une a una proteína recombinante (por ejemplo, a través del uso de cromatografía de afinidad). Métodos no limitantes para capturar una proteína recombinante de un medio de cultivo líquido o medio de cultivo líquido diluido se describen en la presente memoria y otros son conocidos en la técnica. Una proteína recombinante puede capturarse de un medio de cultivo líquido usando al menos una columna de cromatografía y/o membrana cromatográfica (por ejemplo, cualquiera de las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas descritas en la presente memoria).

5 El término "purificar" significa una etapa realizada para aislar una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) de una o más impurezas distintas (por ejemplo, impurezas en bruto) o componentes presentes en un fluido que contiene una proteína recombinante (por ejemplo, proteínas del medio de cultivo líquido o uno o más componentes distintos (por ejemplo, ADN, ARN, otras proteínas, endotoxinas, virus, etc.) presentes en o secretados de una célula de mamífero). Por ejemplo, la purificación puede realizarse durante o después de una etapa de captura inicial. La purificación puede realizarse usando una resina, membrana o cualquier otro soporte sólido que se una a una proteína recombinante o contaminantes (por ejemplo, a través del uso de cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico o cromatografía de tamiz molecular. Una proteína recombinante puede purificarse de un fluido que contiene una proteína recombinante usando al menos una columna de cromatografía y/o membrana cromatográfica (por ejemplo, cualquiera de las columnas de cromatografía o membranas cromatográficas descritas en la presente memoria).

15 El término "pulir" es un término de la técnica y significa una etapa realizada para retirar las cantidades mínimas o pequeñas restantes de contaminantes o impurezas de un fluido que contiene una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) que está cerca de una pureza deseada final. Por ejemplo, el pulido puede realizarse pasando un fluido que contiene la proteína recombinante a través de una o más columnas cromatográficas o uno o más absorbentes de membrana que se unen selectivamente a la proteína recombinante diana o a pequeñas cantidades de contaminantes o impurezas presentes en un fluido que contiene una proteína recombinante. En dicho ejemplo, el eluido/filtrado de la una o más columnas cromatográficas o uno o más absorbentes de membrana contiene la proteína recombinante.

20 El término "eluido/filtrado" es un término de la técnica y significa un fluido que se emite desde una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que contiene una cantidad detectable de una proteína recombinante (por ejemplo, proteína terapéutica recombinante).

25 El término "filtración" significa la retirada de al menos parte de (por ejemplo, al menos un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 %) de contaminantes biológicos indeseados (por ejemplo, una célula de mamífero, bacterias, células de levadura, virus o micobacterias) y/o materia en partículas (por ejemplo, proteínas precipitadas) de un líquido (por ejemplo, un medio de cultivo líquido o fluido presente en cualquier de los sistemas o procesos).

30 La expresión "proteína secretada" o "proteína recombinante secretada" significa una proteína (por ejemplo, una proteína recombinante) que contenía originalmente al menos una secuencia señal de secreción cuando se traduce dentro de una célula de mamífero y, al menos en parte, a través de escisión enzimática de la secuencia señal de secreción en la célula de mamífero, se secreta al menos parcialmente en el espacio extracelular (por ejemplo, un medio de cultivo líquido). Los expertos en la materia apreciarán que una proteína "secretada" no tiene que disociarse completamente de la célula para considerarse una proteína secretada.

35 La expresión "cultivo por perfusión" es una expresión de la técnica y significa el cultivo de un cultivo celular en un recipiente (por ejemplo, un biorreactor), en el que el cultivo del cultivo celular en el recipiente incluye la retirada periódica o continua de medio de cultivo líquido presente en el recipiente (por ejemplo, medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células) y al mismo tiempo o poco después de ello añadir sustancialmente el mismo volumen de un medio de cultivo líquido de remplazo al recipiente. En algunos ejemplos, hay un cambio creciente (por ejemplo, aumento o disminución) en el volumen de medio de cultivo líquido retirado y el volumen de medio de cultivo de remplazo añadido durante periodos crecientes (por ejemplo, un periodo de aproximadamente 24 horas, un periodo entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 24 horas o un periodo de más de 24 horas) durante el periodo de cultivo (por ejemplo, la tasa de realimentación de medio de cultivo en una base diaria). La fracción de medio retirado y remplazado cada día puede variar dependiendo de las células particulares que se estén cultivando, la densidad de inoculación inicial y la densidad celular en un momento particular. "RV" o "volumen del reactor" significa el volumen del medio de cultivo presente al inicio del proceso de cultivo (por ejemplo, el volumen total del medio de cultivo presente después de la inoculación).

50 El término "recipiente" es conocido en la técnica y significa un dispositivo que tiene un volumen interior adecuado para cultivar una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamífero recombinantes) en un medio de cultivo líquido en un conjunto controlado de condiciones físicas que permiten el mantenimiento o proliferación de las células. Ejemplos no limitantes de recipientes son biorreactores (por ejemplo, cualquiera de los biorreactores ejemplares descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica).

55 La expresión "biorreactor de perfusión" es conocido en la técnica y significa un biorreactor que tiene un volumen interior para cultivar una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamífero recombinantes) en un medio de cultivo líquido, y que tiene un medio (por ejemplo, una salida, una entrada, una bomba u otro dispositivo de este tipo) para retirar periódica o continuamente el medio de cultivo líquido en el biorreactor y que tiene un medio (por ejemplo, una salida, una entrada, una bomba u otros dispositivo de este tipo) para añadir sustancialmente el mismo volumen de un medio de cultivo líquido de remplazo al biorreactor. La adición del medio de cultivo líquido de remplazo puede realizarse sustancialmente al mismo tiempo o poco después de retirar el medio de cultivo líquido del biorreactor. El medio para retirar el medio de cultivo líquido del biorreactor y el medio para añadir el medio de cultivo líquido de remplazo puede ser un solo dispositivo o sistema.

La expresión "biorreactor de producción" es una expresión de la técnica y significa un biorreactor a gran escala (por ejemplo, que tiene un volumen interno de más de 500 l, 1000 l, 5000 l, 10 000 l, 20 000 l, 50 000 l o 100 000 l). Por ejemplo, un biorreactor de producción puede ser un biorreactor de perfusión.

5 La expresión "densidad celular de producción en estado de equilibrio" es una expresión de la técnica y significa una concentración diana de células viables (por ejemplo, células de mamífero recombinantes viables) en un medio de cultivo que se mantiene durante el cultivo de perfusión a lo largo del tiempo.

10 La expresión "cultivo discontinuo" es una expresión de la técnica y significa un recipiente (por ejemplo, biorreactor) que contiene una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamífero) en un medio de cultivo líquido, en el que el cultivo de las células presentes en el recipiente (por ejemplo, biorreactor) no incluye la adición de una cantidad sustancial o significativa de medio de cultivo líquido nuevo al cultivo celular y no incluye la retirada de una cantidad sustancial o significativa de medio de cultivo líquido del medio de cultivo durante el cultivo.

15 La expresión "cultivo semicontinuo" es una expresión de la técnica y significa un recipiente (por ejemplo, un biorreactor de producción) que incluye una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamífero) en un medio de cultivo líquido, en el que el cultivo de las células presente en el recipiente (por ejemplo, biorreactor de producción) incluye la adición periódica o continua de medio de cultivo líquido nuevo al recipiente sin retirada sustancial o significativa de medio de cultivo líquido del recipiente durante el cultivo. El medio de cultivo líquido reciente puede ser igual que el medio de cultivo líquido presente en el recipiente al inicio del cultivo. En algunos ejemplos de cultivo semicontinuo, el medio de cultivo líquido nuevo es una forma concentrada del medio de cultivo líquido presente en el recipiente al inicio del cultivo. En algunos ejemplos de cultivo discontinuo, el medio de cultivo nuevo se añade como un polvo seco.

20 La expresión "maniobra unitaria" es una expresión de la técnica y significa una etapa funcional que puede realizarse en un proceso de aislamiento de una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) de un medio de cultivo líquido. Por ejemplo, una maniobra unitaria puede ser filtración (por ejemplo, retirada de bacterias contaminantes, levaduras, virus o micobacterias, y/o materia en forma de partículas de un fluido que contiene una proteína recombinante), captura, retirada de marcas epitópicas, purificación, mantenimiento o almacenamiento, pulido, inactivación vírica, ajuste de la concentración iónica y/o pH de un fluido que contiene la proteína recombinante, y retirada de sales indeseadas.

25 "Tasa de productividad específica" o "SPR" es una expresión de la técnica y, como se usa en la presente memoria, se refiere a la masa o actividad enzimática de una proteína recombinante (por ejemplo, proteína terapéutica recombinante) producida por célula de mamífero por día. La SPR para un anticuerpo recombinante se mide habitualmente como masa/célula/día. La SPR para una enzima recombinante se mide habitualmente como unidades/célula/día o (unidades/masa)/célula/día.

30 "Tasa de productividad en volumen" o "VPR" es una expresión de la técnica y, como se usa en la presente memoria, se refiere a la masa o actividad enzimática de proteína recombinante (por ejemplo, proteína terapéutica recombinante) producida por volumen de cultivo (por ejemplo, por litro del biorreactor, recipiente o volumen del tubo) por día. La VPR para un anticuerpo recombinante se mide habitualmente como masa/litro/día. La VPR para una enzima recombinante se mide habitualmente como unidades/litro/día o masa/litro/día.

35 "Plataforma rodante" es un término de la técnica y, como se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura sólida tridimensional que puede actuar como plataforma o soporte para un sistema descrito en la presente memoria. Una plataforma rodante puede conferir, si comprende una o más estructuras que permitan el movimiento (por ejemplo, ruedas, rodillos o similares), movilidad al sistema o una parte del mismo. Ejemplos no limitantes de plataformas rodantes se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de plataformas rodantes son conocidos en la técnica.

40 Salvo que se defina de otro modo todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Se describen métodos y materiales en la presente memoria 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 únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

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

50 Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un proceso encadenado de inóculo convencional que finaliza en la inoculación de un biorreactor de perfusión de producción de 500 l (parte superior) y un diagrama esquemático de un proceso encadenado de inóculo ejemplar que finaliza en la inoculación de un biorreactor de perfusión de producción de 500 l (parte inferior).

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un proceso encadenado de inóculo convencional que finaliza en la inoculación de un biorreactor discontinuo o semicontinuo de producción de 10 000 l (parte superior) y un diagrama esquemático de un proceso encadenado de inóculo ejemplar que finaliza en la inoculación de un biorreactor discontinuo o semicontinuo de producción de 10 000 l (parte inferior).

5 La figura 3 es un gráfico que muestra la densidad de células viables en todas las etapas de un proceso encadenado de inóculo ejemplar: cultivo discontinuo de un tercer cultivo celular de 1 l en un biorreactor de un solo uso desechable de 2 l, cultivo discontinuo de un primer cultivo celular de 7,5 l en un biorreactor de un solo uso desechable de 20 l y cultivo por perfusión de un segundo cultivo celular de 10 l en un biorreactor de perfusión de 15 l.

10 La figura 4 es un gráfico de la densidad de células viables como una función de la capacitancia del cultivo celular de perfusión N-1 en un proceso encadenado de inóculo ejemplar.

15 La figura 5 es un gráfico de la densidad de células viables (línea continua) y el porcentaje de viabilidad celular (línea discontinua) a lo largo del tiempo para tubos de centrifugación inoculados con un volumen de cultivo celular N-1 que tiene una densidad de células viables de  $25 \times 10^6$  células/ml (líneas azules),  $50 \times 10^6$  células/ml (líneas verdes) o  $100 \times 10^6$  células/ml (líneas rojas) para producir una densidad de células viables de partida de  $0,5 \times 10^6$  células/ml en tubos de centrifugación (que representan un biorreactor de producción). Las líneas continuas y discontinuas representan la media de los datos ( $n=3$ ). Las zonas sombreadas representan  $\pm 2$  desviaciones típicas.

20 La figura 6 es un gráfico de la densidad de células viables (línea continua) y el porcentaje de viabilidad celular (línea discontinua) a lo largo del tiempo para tubos de centrifugación inoculados con un volumen de cultivo celular N-1 que tiene una densidad de células viables de  $25 \times 10^6$  células/ml (líneas azules),  $50 \times 10^6$  células/ml (líneas verdes) o  $100 \times 10^6$  células/ml (líneas rojas) para producir una densidad de células viables de partida de  $2,5 \times 10^6$  células/ml en tubos de centrifugación (que representan un biorreactor de producción). Las líneas continuas y discontinuas representan la media de los datos ( $n=3$ ). Las zonas sombreadas representan  $\pm 2$  desviaciones típicas.

25 La figura 7 es un gráfico de la densidad de células viables (línea continua) y el porcentaje de viabilidad celular (línea discontinua) a lo largo del tiempo para tubos de centrifugación inoculados con un volumen de cultivo celular N-1 que tiene una densidad de células viables de  $25 \times 10^6$  células/ml (líneas azules),  $50 \times 10^6$  células/ml (líneas verdes) o  $100 \times 10^6$  células/ml (líneas rojas) para producir una densidad de células viables de partida de  $5,0 \times 10^6$  células/ml en tubos de centrifugación (que presentan un biorreactor de producción). Las líneas continuas y discontinuas representan la media de los datos ( $n=3$ ). Las zonas sombreadas representan  $\pm 2$  desviaciones típicas.

30 La figura 8 es un gráfico de la densidad de células viables a lo largo del tiempo para biorreactores de producción de 10 l inoculados a  $0,5 \times 10^6$  células/ml desde un biorreactor de perfusión N-1 a  $2,5 \times 10^6$  células viables/ml ( $n=2$ ) (líneas rojas) en comparación con biorreactores de producción de 10 l inoculados a  $5,0 \times 10^6$  células viables/ml de un biorreactor de perfusión N-1 a  $50 \times 10^6$  células viables/ml ( $n=2$ ) (líneas verdes). La línea discontinua representa la densidad de células viables diana para una maniobra en estado de equilibrio del biorreactor de producción. Las líneas continuas representan la media de los datos ( $n=2$ ). Las zonas sombreadas representan  $\pm 2$  desviaciones típicas.

35 La figura 9 es un gráfico que muestra la actividad acumulada del producto (unidades/litro) como una función de la concentración de células viables integrada para biorreactores de producción de 10 l inoculados a  $0,5 \times 10^6$  células viables/ml a partir de un biorreactor de perfusión N-1 a  $2,5 \times 10^6$  células viables/ml (puntos rojos) en comparación con biorreactores de producción de 10 l inoculados a  $5,0 \times 10^6$  células viables/ml a partir de un biorreactor N-1 a  $50 \times 10^6$  células/ml (puntos verdes). Los puntos representan la media de los datos ( $n=2$ ) y las barras de error representan  $\pm 2$  desviaciones típicas.

#### Descripción detallada

45 En la presente memoria se divulgan procesos encadenados de inóculo que incluyen las etapas de (a) disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes en un primer medio de cultivo incluido dentro de un recipiente para proporcionar un primer cultivo celular; (b) cultivar de forma discontinua el primer cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml; (c) disponer un volumen del primer cultivo celular de la etapa (b) en un segundo medio de cultivo incluido dentro de un biorreactor de perfusión para proporcionar un segundo cultivo celular con una densidad celular mínima en un intervalo de  
50 aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml; (d) cultivar por perfusión el segundo cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $120 \times 10^6$  células/ml; y (e) disponer un volumen del segundo cultivo celular de la etapa (d) en un tercer medio de cultivo incluido dentro de un biorreactor de producción para proporcionar un cultivo celular de  
55 producción con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células/ml.

La sucesión de inóculo proporcionada descrita en la presente memoria proporciona muchos beneficios. En un primer aspecto, los presentes procesos encadenados de inóculo requieren menos etapas de cultivo (eliminación de 1 a 2 etapas de cultivo diferentes) antes de proporcionar el cultivo celular de producción (por ejemplo, disminuyendo el

número de fases de expansión a pequeña escala) en comparación con los procesos encadenados de inóculo convencionales, lo que, a su vez, proporciona menos manipulaciones manuales del cultivo celular y un riesgo disminuido de contaminación del cultivo celular de producción. Los procesos encadenados de inóculo pueden conseguir un cultivo celular N-1 (segundo cultivo celular usado para inocular el cultivo celular de producción) con altas densidades de células viables, por ejemplo, hasta  $100 \times 10^6$  células viables/ml, en 12 días sin comprometer las características de crecimiento del cultivo en el cultivo celular de producción. Las altas densidades celulares conseguidas en el cultivo N-1 (segundo cultivo celular) usando los procesos encadenados de inóculo permiten una mayor densidad celular inicial en el cultivo celular de producción en el biorreactor de producción. Por ejemplo, los presentes procesos encadenados de inóculo pueden usarse para conseguir una densidad celular inicial entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células viables/ml y  $10 \times 10^6$  células viables/ml, lo que, a su vez, provoca una cantidad disminuida de tiempo (por ejemplo, reducción en 4-6 días) para que el cultivo celular de producción alcance la densidad celular de producción en estado de equilibrio. Esta disminución en la cantidad de tiempo para que el cultivo celular de producción alcance la densidad celular de producción en estado de equilibrio puede proporcionar un aumento de un 10 % en la productividad global de una ejecución de cultivo de producción de 50 días. Los procesos encadenados de inóculo también pueden producir un cultivo celular de producción que tiene una tasa de productividad volumétrica y tasa de productividad específica mayores que los cultivos celulares de producción resultantes de otros procesos encadenados de inóculo.

#### Procesos encadenados de inóculo

En la presente memoria se divulgan procesos encadenados de inóculo que proporcionan varias ventajas sobre otros procesos encadenados de inóculo. Aspectos no limitantes de estos procesos encadenados de inóculo se describen en la presente memoria y pueden usarse en cualquier combinación.

#### *Proporcionar un primer cultivo celular*

Los procesos encadenados de inóculo incluyen una etapa de (a) disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes (por ejemplo, cualquiera de las células de mamífero recombinantes o conocidas en la técnica) en un primer medio de cultivo incluido dentro de un recipiente para proporcionar un primer cultivo celular. En algunos ejemplos, la pluralidad de células de mamífero recombinantes dispuesta en el primer medio de cultivo puede ser entre aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células (por ejemplo, entre aproximadamente  $9,0 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $22,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $45 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $67,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $90 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $112,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $135 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $157,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $180 \times 10^7$  y aproximadamente  $450 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $9,0 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $22,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $45 \times 10^7$  y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $67,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $90 \times 10^7$  y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $112,5 \times 10^7$  y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $135 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $157,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $180 \times 10^7$  células y aproximadamente  $405 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $9,0 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $22,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $45 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $67,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $90 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $112,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $135 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $157,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $180 \times 10^7$  células y aproximadamente  $360 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $9,0 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $22,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $45 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $67,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $90 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $112,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $135 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $157,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $180 \times 10^7$  células y aproximadamente  $315 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $9,0 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $22,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $45 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $67,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $90 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $112,5 \times 10^7$  células y aproximadamente  $270 \times 10^7$  células, entre aproximadamente  $135 \times 10^7$  células y



aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 0,50 l y  
aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 0,50 l y  
aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 0,50 l y  
aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,50 l y  
5 aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 180 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 160 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 140 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 120 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
10 aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,0 l y  
aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
aproximadamente 180 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 160 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
15 aproximadamente 140 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 120 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
20 aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,5 l y  
aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 180 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 160 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 140 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 120 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
25 aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,0 l y  
aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
30 aproximadamente 180 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 160 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
aproximadamente 140 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 120 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
35 aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2,5 l y  
aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 180 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
aproximadamente 160 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 140 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
40 aproximadamente 120 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 5,0 l y  
aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 20 l, o entre aproximadamente 5,0 l y  
45 aproximadamente 10 l).

Como puede apreciarse en la técnica, el recipiente que contiene el primer cultivo celular puede ser cualquier aparato  
usado en la técnica con el propósito de cultivar células de mamífero (por ejemplo, un matraz (por ejemplo, un matraz  
de centrifugación), un tubo de balanceo o un biorreactor). El recipiente puede incluir un medio interno para agitación  
50 (por ejemplo, un impulsor) o el recipiente puede agitarse externamente (por ejemplo, mediante el uso de una  
plataforma de rotación y/o inclinación). El recipiente puede estar hecho de acero inoxidable o plástico (por ejemplo,  
una bolsa estéril de plástico). En algunas realizaciones, el recipiente puede ser un biorreactor de un solo uso  
desechable (por ejemplo, un biorreactor desechable de 3 l Cellready Millipore™ Mobius®, biorreactor desechable  
de 20 l Pierre Guerin ATM1 Nucleo™, un biorreactor desechable de 50 l Sartorius Cultibag STR™, un Sartorius  
55 Cultibag RMTM 20 l, Sartorius Cultibag Orbital™ 50 l, GE Wave Bioreactor 2/10 System 5 l, GE Wave Bioreactor  
20/50 System 25 l, GE Wave Bioreactor 200 System 200 l, o GE Wave Bioreactor 500/1000 System 500 l). La  
superficie interior del recipiente puede tener al menos un recubrimiento (por ejemplo, al menos un recubrimiento de  
gelatina, colágeno, poli-L-orнитina, poliestireno y laminina), y como se sabe en la técnica, uno o más accesos para el  
rociado de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en el primer medio de cultivo líquido. El recipiente puede estar equipado con una o más  
60 sondas detectoras. Cuando el recipiente está compuesto de un material de plástico no rígido (por ejemplo, una bolsa  
estéril de plástico), el recipiente puede conectarse a un soporte exterior que rodea y sostiene el recipiente.

El primer cultivo celular puede tener una diversidad de volúmenes diferentes, por ejemplo, el primer cultivo celular  
puede tener un volumen entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 100 l (por ejemplo, entre  
aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 80 l, entre  
aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 60 l, entre

aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 40 l, entre  
aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 20 l, entre  
aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 5,0 l, entre  
aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 90 l, entre  
5 aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 70 l, entre  
aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 50 l, entre  
aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 30 l, entre  
aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 10 l, entre  
aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 100 l, entre  
10 aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 80 l, entre  
aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 60 l, entre  
aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 40 l, entre  
aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 20 l, entre  
aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 5,0 l, entre  
15 aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 90 l, entre  
aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 70 l, entre  
aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 50 l, entre  
aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 30 l, entre  
aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 10 l, entre  
20 aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 100 l, entre  
aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 80 l, entre  
aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 60 l, entre  
aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 40 l, entre  
aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 20 l, entre  
25 aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 5,0 l, entre  
aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 90 l, entre  
aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 70 l, entre  
aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 50 l, entre  
aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 30 l, entre  
30 aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 10 l, entre  
aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 100 l, entre  
aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 80 l, entre  
aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 60 l, entre  
aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 40 l, entre  
35 aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 20 l, o entre  
aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 10 l).

Como puede apreciarse en la técnica, hay muchas maneras en que puede disponerse una pluralidad de células en  
un primer medio de cultivo contenido en un recipiente. Por ejemplo, disponer la pluralidad de células de mamífero  
recombinantes puede incluir las etapas de descongelar un banco de células congelado (por ejemplo, cualquiera de  
40 los bancos de células congelados ejemplares descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica) y disponer  
(por ejemplo, pipeteo estéril) un volumen del banco de células descongelado en el primer medio de cultivo. Un banco  
de células congelado puede tener un intervalo de densidad celular, por ejemplo, entre aproximadamente  
1,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente  
2,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y  
45 aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente  
100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre  
aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente  
25 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 30 x 10<sup>7</sup> células/ml y  
50 aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 40 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre  
aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente  
2,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y  
aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente  
90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre  
55 aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente  
25 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 30 x 10<sup>7</sup> células/ml y  
aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 35 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente  
90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 40 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre  
aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente  
60 2,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células/ml y  
aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> y aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml,  
entre aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente  
20 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 25 x 10<sup>7</sup> células/ml y  
aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 30 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente  
65 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre aproximadamente 35 x 10<sup>7</sup> células/ml y aproximadamente 80 x 10<sup>7</sup> células/ml, entre

aproximadamente  $40 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $80 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $5,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $15 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $20 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $25 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $30 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $35 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $40 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $70 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $5,0 \times 10^7$  y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $15 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $20 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $25 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $30 \times 10^7$  y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $35 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $40 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $60 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $5,0 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $10 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $15 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $20 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, entre aproximadamente  $25 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml, o entre aproximadamente  $30 \times 10^7$  células/ml y aproximadamente  $50 \times 10^7$  células/ml). Los métodos para generar dichos bancos de células congelados son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/793021, presentada el 15 de marzo de 2013; la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 14/212607, presentada el 14 de marzo de 2014; y la solicitud internacional n.º PCT/US2014/027757, presentada el 14 de marzo de 2014). Como es bien sabido en la técnica, descongelar un banco de células congelado puede realizarse, por ejemplo, exponiendo el banco de células congelado a un elemento de calentamiento (distinto de exposición a temperatura ambiente), por ejemplo, un baño de agua o bloque calentador (por ejemplo, establecido a  $30^\circ\text{C}$  o  $37^\circ\text{C}$ ). En algunos ejemplos, la descongelación puede realizarse durante un periodo entre 1 segundo y 1 minuto, entre 1 segundo y 55 segundos, entre 1 segundo y 50 segundos, entre 1 segundo y 45 segundos, entre 1 segundo y 40 segundos, entre 1 segundo y 35 segundos, entre 1 segundo y 30 segundos, entre 1 segundo y 25 segundos, o entre 1 segundo y 20 segundos). Un banco de células congelado también puede descongelarse exponiendo el banco de células congelado a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ ). El banco de células descongelado puede contener un porcentaje de células viables, por ejemplo, de al menos un 60 % (por ejemplo, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %). Por ejemplo, un banco de células descongelado puede contener un porcentaje de células viables entre un 60 % y aproximadamente un 98 % (por ejemplo, entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 95 %, entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 90 %, entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 85 %, entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 80 %, entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 75 %, entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 70 %, entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 98 %, entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 95 %, entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 90 %, entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 85 %, entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 80 %, entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 75 %, entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 98 %, entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 95 %, entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 90 %, entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 85 %, entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 80 %, entre aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 98 %, entre aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 95 %, entre aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 90 %, entre aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 85 %, entre aproximadamente un 80 % y aproximadamente un 80 %, entre aproximadamente un 85 % y aproximadamente un 98 %, entre aproximadamente un 85 % y aproximadamente un 95 %, entre aproximadamente un 90 % y aproximadamente un 98 %, o entre aproximadamente un 90 % y aproximadamente un 95 %).

En algunos ejemplos, disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes en el primer medio de cultivo para generar el primer cultivo celular puede incluir la etapa de disponer un volumen de un tercer cultivo celular que comprende la pluralidad de células de mamífero recombinantes en el primer medio de cultivo. Por ejemplo, el volumen del tercer cultivo que está dispuesto en el primer medio de cultivo puede ser, por ejemplo, entre 0,10 ml y aproximadamente 10 l (por ejemplo, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 8,0 l, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 6,0 l, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 4,0 l, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 2,0 l, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 25 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 10 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 8,0 l, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 6,0 l, entre aproximadamente 0,50 ml

5 y aproximadamente 4,0 l, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 2,0 l, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 0,50 ml y aproximadamente 25 ml, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 8,0 l, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 6,0 l, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 4,0 l, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 2,0 l, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 0,10 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 1,0 ml y aproximadamente 25 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 8,0 l, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 6,0 l, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 4,0 l, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 2,0 l, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 2,0 ml y aproximadamente 25 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 8,0 l, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 6,0 l, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 4,0 l, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 2,0 l, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 5,0 ml y aproximadamente 25,0 ml, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 8,0 l, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 6,0 l, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 4,0 l, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 2,0 l, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 1,0 l, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 800 ml, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 600 ml, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 200 ml, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 50 ml, o entre aproximadamente 10,0 ml y aproximadamente 25,0 ml). La densidad celular del tercer cultivo celular dispuesto en el primer medio de cultivo puede ser cualquiera de las densidades celulares ejemplares o intervalos de densidad celular descritos en la presente memoria. Como puede apreciarse en la técnica, el volumen del tercer cultivo celular suficiente para generar un primer cultivo celular con una densidad celular inicial entre aproximadamente  $0,10 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $0,80 \times 10^6$  células/ml (o cualquiera de los otros intervalos ejemplares de densidades celulares iniciales enumeradas para el primer cultivo celular anteriormente) puede terminarse a partir de la densidad celular del tercer cultivo celular y el volumen del primer medio de cultivo líquido presente en el recipiente (antes de disponer el tercer cultivo celular en el primer medio de cultivo).

Algunas realizaciones que usan un tercer cultivo celular pueden incluir las etapas de (1) disponer una pluralidad de las células de mamífero recombinantes en un cuarto medio de cultivo incluido dentro de un recipiente para proporcionar un tercer cultivo celular y (2) cultivar de forma discontinua el tercer cultivo celular de (1) hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15,0 \times 10^6$  células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $12,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $12,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $12,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $12,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $15 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $12,5 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente

10 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 10 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 10 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15 x 10<sup>6</sup> células/ml, o entre aproximadamente 10 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml), donde un volumen del tercer cultivo celular en (2) se dispone entonces en el primer medio de cultivo para generar el primer cultivo celular. La pluralidad de células dispuesta en el cuarto medio de cultivo puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células (por ejemplo, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 2,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 0,50 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 2,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,20 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 0,50 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,40 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,40 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,40 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,40 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,40 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 2,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,40 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,60 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,60 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,60 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,60 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 5 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,60 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 2 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,60 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 1 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 0,80 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 2,0 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 20 x 10<sup>7</sup> células, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 15 x 10<sup>7</sup> células, o entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>7</sup> células y aproximadamente 10 x 10<sup>7</sup> células) y puede variar dependiendo del volumen del cuarto medio de cultivo contenido dentro del recipiente. Por ejemplo, la pluralidad de células dispuesta en el tercer medio de cultivo líquido puede ser suficiente para provocar una densidad celular inicial entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 0,80 x 10<sup>6</sup> células/ml en el tercer cultivo celular (por ejemplo, cualquiera de las densidades celulares iniciales ejemplares o intervalos de densidades celulares iniciales enumeradas anteriormente para el primer cultivo celular).

En algunas realizaciones, la etapa de disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en el cuarto medio de cultivo para generar el tercer cultivo celular puede incluir las etapas de descongelar un banco de células congelado y disponer un volumen del banco de células descongelado en el cuarto medio de cultivo. En dichas realizaciones, el banco de células congelado puede tener cualquiera de las densidades celulares o intervalos de densidades celulares para bancos de células congelados descritos en la presente memoria. El banco de células congelado puede descongelarse usando cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. El banco de células descongelado resultante puede tener cualquiera de los porcentajes de células viables o cualquiera de los intervalos de porcentajes de células viables para un banco de células descongelado descrito en la presente memoria.

El volumen interno del recipiente que contiene el tercer cultivo celular puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 30 l (por ejemplo, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 2,5 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 2,5 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 2,5 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 30 l, o entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 20 l). El cuarto medio de cultivo puede tener un volumen, por ejemplo, entre aproximadamente 0,10 l y aproximadamente 20 l (por ejemplo, entre aproximadamente 0,10 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,10 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 0,10 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,10 l y aproximadamente 5,0 l,

entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,20 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 0,50 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,5 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 25 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,0 l y aproximadamente 5,0 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 15 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 20 l, o entre aproximadamente 10 l y aproximadamente 15 l).

Como puede apreciarse en la técnica, el recipiente que contiene el tercer cultivo celular puede ser cualquier aparato usado en la técnica con el propósito de cultivar células de mamífero (por ejemplo, un matraz (por ejemplo, un matraz de centrifugación), un tubo de balanceo o un biorreactor). El recipiente puede incluir un medio interno para agitación (por ejemplo, un impulsor) o el recipiente puede agitarse externamente (por ejemplo, mediante el uso de una plataforma de rotación y/o inclinación). El recipiente puede estar hecho de acero inoxidable o plástico (por ejemplo, una bolsa estéril de plástico). En algunas realizaciones, el recipiente puede ser un biorreactor de un solo uso desechable (por ejemplo, cualquiera de los biorreactores de un solo uso desechables descritos en la presente memoria). La superficie interior de un biorreactor de perfusión puede tener al menos un recubrimiento (por ejemplo, al menos un recubrimiento de gelatina, colágeno, poli-L-ornitina, poliestireno y laminina) y, como se sabe en la técnica, uno o más acceso para el rociado de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en el tercer medio de cultivo. El recipiente puede estar equipado con una o más sondas detectoras. Cuando el recipiente está compuesto de un material de plástico no rígido (por ejemplo, una bolsa estéril de plástico), el recipiente puede estar rodeado y sostenido por una estructura exterior.

Cada una de las etapas de disposición descritas en la presente memoria puede realizarse usando una pipeta estéril (por ejemplo, pipeteo estéril en una campana de cultivo hístico).

*Cultivo discontinuo del primer cultivo celular*

Después de proporcionar el primer cultivo celular en la etapa (a), los procesos encadenados de inóculo incluyen una etapa de (b) cultivar de forma discontinua el primer cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 17,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 2,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 17,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 2,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 17,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 5,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 17,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 17,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 10,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 17,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, o entre aproximadamente 12,5 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 15,0 x 10<sup>6</sup> células/ml). Se conoce en la técnica una diversidad de métodos diferentes para determinar la densidad celular (por ejemplo, uso de un microscopio óptico y un hemocitómetro o uso de un contador de células automatizado tal como, por ejemplo, contador de células automatizado Countess® (Life Technologies), Cellometer® (Nexcelom Bioscience), contador de células automatizado Luna™ (Logos Biosystems) o analizador de viabilidad celular Vi-Cell®).

El cultivo discontinuo del primer cultivo celular no incluye la adición de una cantidad sustancial o significativa de un medio de cultivo líquido al primer cultivo celular y no incluye la retirada de una cantidad sustancial o significativa del primer medio de cultivo celular durante el cultivo. El cultivo discontinuo puede realizarse usando cualquiera de las temperaturas ejemplares y/o exposiciones a gas CO<sub>2</sub> descritas en la presente memoria. El cultivo discontinuo puede realizarse usando cualquiera de las exposiciones a gas O<sub>2</sub> y/o N<sub>2</sub> conocidas en la técnica. El cultivo discontinuo también puede incluir cualquiera de los tipos de agitación descritos en la presente memoria. Como un experto en la materia apreciaría, la cantidad de tiempo de cultivo discontinuo del primer cultivo celular para conseguir la densidad celular diana entre aproximadamente 1,0 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 20,0 x 10<sup>6</sup> células/ml (o cualquiera de las otras densidades celulares o intervalos de densidades celulares descritos en la presente memoria) dependerá de la tasa de crecimiento de las células de mamífero recombinantes y la densidad celular inicial del primer cultivo celular. Por ejemplo, el primer cultivo celular puede cultivarse durante un periodo entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 9 días (por ejemplo, entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 8 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 2 días y aproximadamente 8 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 3 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 8 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 6 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 4 días, entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 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 5 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 8 días, entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 7 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 9 días, entre aproximadamente 6 días y aproximadamente 8 días, o entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 9 días). Otros parámetros ejemplares de cultivo discontinuo que pueden usarse en los presentes métodos se describen en la presente memoria.

*Proporcionar un segundo cultivo celular*

Los procesos encadenados de inóculo incluyen además una etapa de (c) disponer un volumen del primer cultivo celular de la etapa (b) en un segundo medio de cultivo incluido dentro de un biorreactor de perfusión para proporcionar un segundo cultivo celular con una densidad celular inicial en un intervalo entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 0,8 x 10<sup>6</sup> células/ml (por ejemplo, cualquiera de las densidades celulares iniciales o intervalos de densidades celulares iniciales descritas para el primer cultivo celular anteriormente). Como un experto en la materia puede apreciar, el volumen apropiado del primer cultivo celular a disponer en el segundo medio de cultivo para llegar a una densidad celular inicial en el intervalo entre aproximadamente 0,10 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 0,80 x 10<sup>6</sup> células/ml para el segundo cultivo celular puede determinarse a partir de la densidad celular del primer cultivo celular y el volumen del segundo medio de cultivo. El volumen del primer cultivo celular dispuesto en el segundo medio de cultivo puede ser, por ejemplo, entre 0,30 l y aproximadamente 100 l (por ejemplo, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 0,30 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 1,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 2,5 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 10 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 90 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 80 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 70 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 60 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 40 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 30 l, entre aproximadamente 15 l y aproximadamente 20 l, entre aproximadamente 20 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 20 l y aproximadamente 90 l, entre





aproximadamente 700 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 700 l y aproximadamente 750 l, o entre aproximadamente 750 l y aproximadamente 800 l).

5 El biorreactor de perfusión puede ser cualquiera de los biorreactores de perfusión ejemplares descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Por ejemplo, un biorreactor de perfusión puede estar hecho de acero inoxidable o plástico (por ejemplo, una bolsa estéril de plástico). La superficie interior de un biorreactor de perfusión puede tener al menos un recubrimiento (por ejemplo, al menos un recubrimiento de gelatina, colágeno, poli-L-ornitina, poliestireno y laminina) y, como se sabe en la técnica, uno o más accesos para el rociado de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en el medio de cultivo líquido, y un mecanismo de agitación para agitar el medio de cultivo líquido. El biorreactor de perfusión también puede estar equipado con un dispositivo mecánico que puede retirar un volumen del segundo medio de cultivo líquido del biorreactor y, opcionalmente, un filtro dentro del dispositivo mecánico que retira las células del segundo medio de cultivo líquido durante el proceso de transferencia del segundo medio de cultivo líquido del biorreactor (por ejemplo, un sistema de flujo tangencial alterno (ATF), un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) o un sistema de filtración descrito en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/878502). El biorreactor también puede estar equipado con una o más bombas, y uno o más depósitos para mantener el segundo medio de cultivo y el nuevo medio de cultivo a perfundir en el biorreactor de perfusión.

El biorreactor de perfusión puede tener un volumen interno, es decir, por ejemplo, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 2000 (por ejemplo, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1900 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1800 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1700 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1600 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1500 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1400 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1300 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1200 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1100 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 1000 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 900 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 700 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 600 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 500 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 400 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 300 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 100 l, entre aproximadamente 5,0 l y aproximadamente 50 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 2000 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1900 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1800 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1700 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1600 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1500 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1400 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1300 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1200 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1100 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 1000 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 900 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 700 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 600 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 500 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 400 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 300 l, entre aproximadamente 100 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 2000 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1900 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1800 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1700 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1600 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1500 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1400 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1300 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1200 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1100 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 1000 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 900 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 700 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 600 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 500 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 400 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 300 l, entre aproximadamente 150 l y aproximadamente 200 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 2000 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1900 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1800 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1700 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1600 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1500 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1400 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1300 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1200 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1100 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1000 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 900 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 700 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 600 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 500 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 400 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 300 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 2000 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1900 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1800 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1700 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1600 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1500 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1400 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1300 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1200 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1100 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 1000 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 900 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 700 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 600 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 500 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 400 l, entre aproximadamente 200 l y aproximadamente 300 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 2000 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1900 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1800 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1700 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1600 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1500 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1400 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1300 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1200 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1100 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 1000 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 900 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 800 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 700 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 600 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 500 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 400 l, entre aproximadamente 300 l y aproximadamente 2000 l, entre





70 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 140 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 130 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 120 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 110 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 80 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 90 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 90 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 140 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 90 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 130 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 90 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 120 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 90 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 110 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 90 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 100 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 100 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 140 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 100 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 130 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 100 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 120 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 100 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 110 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 110 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 140 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 110 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 130 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 110 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 120 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 120 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 140 x 10<sup>6</sup> células/ml, entre aproximadamente 120 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 130 x 10<sup>6</sup> células/ml, o entre aproximadamente 130 x 10<sup>6</sup> células/ml y aproximadamente 140 x 10<sup>6</sup> células/ml).

El cultivo por perfusión es bien conocido en la técnica y en esta etapa incluye retirar (por ejemplo, retirar de forma continua o periódica) de un biorreactor de perfusión un volumen del medio de cultivo líquido (por ejemplo, un volumen del segundo medio de cultivo líquido del biorreactor de perfusión que está sustancialmente libre de células), y añadir al biorreactor de perfusión aproximadamente al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo un volumen de medio de cultivo de remplazo. La retirada y adición pueden realizarse simultánea o secuencialmente, o una combinación de las dos. Además, la retirada y adición puede realizarse de forma continua (por ejemplo, a una tasa que retira y reemplaza un volumen entre un 0,1 % y un 800 % (por ejemplo, entre un 1 % y un 700 %, entre un 1 % y un 600 %, entre un 1 % y un 500 %, entre un 1 % y un 400 %, entre un 1 % y un 350 %, entre un 1 % y un 300 %, entre un 1 % y un 250 %, entre un 1 % y un 100 %, entre un 100 % y un 200 %, entre un 5 % y un 150 %, entre un 10 % y un 50 %, entre un 15 % y un 40 %, entre un 8 % y un 80 %, y entre un 4 % y un 30 %) del volumen del biorreactor de perfusión o el volumen inicial del medio de cultivo líquido al inicio del cultivo (por ejemplo, el volumen del segundo medio de cultivo líquido) sobre cualquier periodo de tiempo dado (por ejemplo, sobre un periodo de 24 horas, sobre un periodo de tiempo creciente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, o sobre un periodo de tiempo creciente de más de 24 horas) o de forma periódica (por ejemplo, una vez cada tres días, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día o cinco veces al día), o cualquier combinación de los mismos. Cuando se realiza periódicamente, el volumen que se retira o reemplaza (por ejemplo, en aproximadamente un periodo de 24 horas, en un periodo de tiempo creciente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas o en un periodo de tiempo creciente de más de 24 horas) puede ser, por ejemplo, entre un 0,1 % y un 800 % (por ejemplo, entre un 1 % y un 700 %, entre un 1 % y un 600 %, entre un 1 % y un 500 %, entre un 1 % y un 400 %, entre un 1 % y un 300 %, entre un 1 % y un 200 %, entre un 1 % y un 100 %, entre un 100 % y un 200 %, entre un 5 % y un 150 %, entre un 10 % y un 50 %, entre un 15 % y un 40 %, entre un 8 % y un 80 %, y entre un 4 % y un 30 %) del volumen del biorreactor de perfusión o el volumen de medio de cultivo en el biorreactor al inicio del cultivo (por ejemplo, el volumen del segundo medio de cultivo líquido). El volumen del medio de cultivo líquido retirado y el volumen del medio de cultivo líquido de remplazo (por ejemplo, medio de cultivo líquido nuevo) añadido puede mantenerse, en algunos casos, aproximadamente igual sobre cada periodo de 24 horas (o, como alternativa, un periodo de tiempo creciente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas o un periodo de tiempo creciente de más de 24 horas) sobre la totalidad o parte del periodo de cultivo. Como se sabe en la técnica, la tasa a la que el volumen del medio de cultivo líquido se retira (volumen/unidad de tiempo) y la tasa a la que el volumen del medio de cultivo líquido de remplazo (por ejemplo, segundo medio de cultivo líquido nuevo) se añade (volumen/unidad de tiempo) puede variarse. La tasa a la que el volumen del medio de cultivo líquido se retira (volumen/unidad de tiempo) y la tasa a la que el volumen del medio de cultivo líquido de remplazo (por ejemplo, medio de cultivo líquido nuevo) se añade (volumen/unidad de tiempo) pueden ser aproximadamente iguales o pueden ser diferentes.

Como alternativa, el volumen retirado y añadido puede cambiar (por ejemplo, aumentar gradualmente) sobre cada periodo de 24 horas (o, como alternativa, un periodo de tiempo creciente entre 1 hora y aproximadamente 24 horas o un periodo de tiempo creciente de más de 24 horas) durante el periodo de cultivo. Por ejemplo, el volumen del medio de cultivo líquido retirado y el volumen del medio de cultivo líquido de remplazo añadido (por ejemplo, medio de cultivo líquido nuevo añadido) en cada periodo de 24 horas (o, como alternativa, un periodo de tiempo creciente entre aproximadamente 1 hora y por encima de 24 horas o un periodo de tiempo creciente de más de 24 horas) sobre el periodo de cultivo puede aumentarse (por ejemplo, gradualmente o mediante incrementos estadiificados) sobre el periodo de cultivo desde un volumen que es entre un 0,5 % y aproximadamente un 20 % del volumen del biorreactor o el volumen de medio de cultivo líquido presente al inicio del cultivo (por ejemplo, el volumen del segundo medio de cultivo) a aproximadamente un 25 % hasta aproximadamente un 300 % del volumen del biorreactor o el volumen de medio de cultivo líquido presente al inicio del cultivo (por ejemplo, el volumen del segundo medio de cultivo líquido).

Los expertos en la materia apreciarán que el medio de cultivo líquido retirado y el medio de cultivo líquido de remplazo añadido (por ejemplo, medio de cultivo líquido nuevo añadido) puede ser el mismo tipo de medio (por ejemplo, medio sin suero o sin suero, sin proteínas químicamente definido). En otros casos, el medio de cultivo líquido retirado y el medio de cultivo líquido de remplazo añadido (por ejemplo, medio de cultivo líquido nuevo añadido) pueden ser diferentes.

5

El volumen del medio de cultivo líquido puede retirarse, por ejemplo, usando un sistema mecánico y/o por infiltración o flujo por gravedad del volumen a través de una membrana estéril con un límite de peso molecular que excluye las células de mamífero presentes en el volumen.

El volumen del medio de cultivo líquido de remplazo (por ejemplo, segundo medio de cultivo líquido nuevo) puede añadirse al biorreactor de una manera automatizada, por ejemplo, mediante bomba de perfusión. En algunos casos, retirar el volumen del medio de cultivo líquido (por ejemplo, un volumen del segundo medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células de mamífero) y añadir el volumen de medio de cultivo líquido de remplazo (por ejemplo, medio de cultivo líquido nuevo) no se produce en al menos 1 hora (por ejemplo, en 2 horas, en 3 horas, en 4 horas, en 5 horas, en 6 horas, en 7 horas, en 8 horas, en 9 horas, en 10 horas, en 12 horas, en 14 horas, en 16 horas, en 18 horas, en 24 horas, en 36 horas, en 48 horas, en 72 horas, en 96 horas o después de 96 horas) de la inoculación del biorreactor de perfusión con una célula de mamífero.

10

15

Como un experto en la materia apreciaría, la cantidad de tiempo de cultivo por perfusión del segundo cultivo celular para conseguir la densidad celular diana entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $140 \times 10^6$  células/ml (o cualquiera de las otras densidades celulares o intervalos de densidades celulares descritas en la presente memoria) dependerá de la tasa de crecimiento de las células de mamífero recombinantes y la densidad celular inicial del segundo cultivo celular. Por ejemplo, el segundo cultivo puede cultivarse por perfusión durante un periodo entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 9 días (por ejemplo, cualquiera de los intervalos ejemplares de periodos de tiempo enumerados para cultivo discontinuo anteriormente). Otros parámetros ejemplares de cultivo por perfusión que pueden usarse en los presentes métodos se describen en la presente memoria.

20

25

#### *Proporcionar un cultivo celular de producción*

Los procesos encadenados de inóculo incluyen además una etapa de (e) disponer un volumen del segundo cultivo celular de la etapa (d) en un tercer medio de cultivo incluido dentro de un biorreactor de producción para proporcionar un cultivo celular de producción con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml (por ejemplo, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $9,0 \times 10^6$  células/ml,  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $9,0 \times 10^6$  células/ml,  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,50 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $9,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $0,75 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $9,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $7,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, entre aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente

30

35

40

45

50

55

60







recombinante (transfección transitoria), mientras que en otras células de mamífero recombinantes el ácido nucleico se integra. Como alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico que codifica una proteína recombinante puede estar presente en un plásmido y/o en un cromosoma artificial de mamífero (por ejemplo, un cromosoma artificial humano). Como alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico puede introducirse en la célula de mamífero usando un vector vírico (por ejemplo, un vector lentivírico, retrovírico o adenovírico). El ácido nucleico puede unirse de forma funcional a una secuencia promotora (por ejemplo, un promotor fuerte, tal como un promotor de  $\beta$ -actina y promotor de CMV, o un promotor inducible). Un vector que incluye el ácido nucleico también puede incluir, si se desea, un marcador de selección (por ejemplo, un gen que confiere resistencia a higromicina, puromicina o neomicina a la célula de mamífero).

10 Medio de cultivo líquido

Los medios de cultivo líquidos (medios de cultivo) son conocidos en la técnica. Un medio de cultivo líquido puede complementarse con un suero de mamífero (por ejemplo, suero bovino fetal y suero bovino) y/o una hormona del crecimiento o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico). Cualquiera de los medios de cultivo líquidos descritos en la presente memoria puede seleccionarse del grupo de: medio de cultivo líquido sin componentes de origen animal, medio de cultivo líquido sin suero, medio de cultivo líquido que contiene suero, medio de cultivo líquido químicamente definido y medio de cultivo líquido sin proteínas. Ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos químicamente definidos, medios de cultivo líquidos sin componentes de origen animal, medios de cultivo líquidos sin suero y medios de cultivo líquidos que contienen suero están disponibles en el mercado.

20 Un medio de cultivo líquido típicamente incluye una fuente de energía (por ejemplo, un carbohidrato, tal como glucosa), aminoácidos esenciales (por ejemplo, el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína), vitaminas y/u otros compuestos orgánicos necesarios a bajas concentraciones, ácidos grasos libres y/u oligoelementos. El medio de cultivo líquido (por ejemplo, un primer y/o segundo medio de cultivo líquido) puede complementarse si se desea con, por ejemplo, una hormona o factor de crecimiento de mamífero (por ejemplo, insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales y tampones (por ejemplo, sales de calcio, magnesio y fosfato), nucleósidos y bases (por ejemplo, adenosina, timidina e hipoxantina), proteína e hidrolizados tisulares, y/o cualquier combinación de estos aditivos.

30 Una amplia diversidad de medios de cultivo líquidos diferentes que pueden usarse para cultivar células (por ejemplo, células de mamífero) en cualquier etapa de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica. Los componentes del medio que también pueden ser útiles en los presentes procesos incluyen, aunque sin limitación, hidrolizados químicamente definidos (CD), por ejemplo, peptona CD, polipéptidos CD (dos o más aminoácidos) y factores de crecimiento CD. Ejemplos adicionales de medio de cultivo líquido y componentes del medio son conocidos en la técnica.

35 El medio de cultivo líquido obtenido de un cultivo de células de mamífero recombinantes puede filtrarse o aclararse para obtener un medio de cultivo líquido que esté sustancialmente libre de células y/o virus. Los métodos para filtrar o aclarar un medio de cultivo líquido para eliminar células son conocidos en la técnica (por ejemplo, filtración a  $0,2 \mu\text{m}$ , filtración usando un sistema de flujo tangencial alterno (ATF™), un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) o cualquiera de los sistemas descritos en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/878502). Las células recombinantes también se pueden retirar del medio de cultivo líquido usando centrifugación y retirando el sobrenadante que es medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células o permitiendo que las células sedimenten en el fondo gravitatorio de un depósito (por ejemplo, recipiente) que contiene el medio de cultivo líquido, y retirando el medio de cultivo líquido (el medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células) que está distante de las células de mamífero recombinantes sedimentadas. En algunas realizaciones, el uno o más (por ejemplo, dos, tres o todos) del primer medio de cultivo, el segundo medio de cultivo, el tercer medio de cultivo y el cuarto medio de cultivo son idénticos.

50 El medio de cultivo líquido usado en cualquiera de las etapas en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria puede ser cualquiera de los tipos de medio de cultivo líquido descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. En cualquiera de los métodos ejemplares para aislar una proteína recombinante descrita en la presente memoria, un medio de cultivo líquido obtenido de un cultivo celular de producción puede diluirse por la adición de un segundo fluido (por ejemplo, un tampón) antes de suministrarlo al primer MCCS (por ejemplo, primer PCCS).

55 El medio de cultivo líquido que contiene una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) que está sustancialmente libre de células puede almacenarse (por ejemplo, a una temperatura por debajo de aproximadamente  $15^\circ\text{C}$  (por ejemplo, por debajo de aproximadamente  $10^\circ\text{C}$ , por debajo de aproximadamente  $4^\circ\text{C}$ , por debajo de aproximadamente  $0^\circ\text{C}$ , por debajo de aproximadamente  $-20^\circ\text{C}$ , por debajo de aproximadamente  $-50^\circ\text{C}$ , por debajo de aproximadamente  $-70^\circ\text{C}$  o por debajo de aproximadamente  $-80^\circ\text{C}$ ) durante al menos 1 día (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 20 días o al menos aproximadamente 30 días) antes de aislar la proteína recombinante (por ejemplo, antes de suministrar el medio de cultivo líquido al primer MCCS (por ejemplo, primer PCCS)). Como alternativa, en algunos ejemplos, el

medio de cultivo líquido que contiene una proteína recombinante que está sustancialmente libre de células se suministra a un sistema usado para aislar la proteína recombinante (por ejemplo, se suministra al primer MCCS (por ejemplo, primer PCCS) directamente desde el biorreactor de producción (por ejemplo, se suministra al primer MCCS (por ejemplo, primer PCCS) directamente desde el biorreactor de producción después de la etapa de filtración o aclarado).

#### Proteínas recombinantes

Una proteína recombinante puede ser una proteína terapéutica recombinante. Ejemplos no limitantes de proteínas terapéuticas recombinantes que pueden producirse por los métodos incluyen inmunoglobulinas (incluyendo inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, cualquiera de los fragmentos de anticuerpo descritos en la presente memoria) enzimas (por ejemplo, una galactosidasa (por ejemplo, una alfa galactosidasa), Myozyme®, o Cerezyme®), proteínas (por ejemplo, eritropoyetina humana, factor de necrosis tumoral (TNF) o un interferón alfa o beta) o proteínas o fragmentos proteínicos inmunógenos o antigénicos (por ejemplo, proteínas para su uso en una vacuna). La proteína terapéutica recombinante puede ser un polipéptido de unión a antígeno genomanipulado que contiene al menos un armazón de proteína recombinante multifuncional (véanse, por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno recombinantes descritas en Gebauer *et al.*, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2012/0164066). Ejemplos no limitantes de proteínas terapéuticas recombinantes que son anticuerpos incluyen: panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, amatuximab, anatumomab, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, besilesomab, bezlotoxumab, biciromab, canakinumab, certolizumab, cetuximab, cixutumumab, daclizumab, denosumab, densumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, figitumumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, igovomab, imgatuzumab, infliximab, inolimomab, inotuzumab, labetuzumab, lebrikizumab, moxetumomab, natalizumab, obinutuzumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab, tralokinumab, tucotuzumab, trastuzumab, veltuzumab, zalutumumab y zatuximab. Ejemplos adicionales de anticuerpos terapéuticos recombinantes que pueden producirse por los métodos descritos en la presente memoria son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes adicionales de proteínas terapéuticas recombinantes que pueden producirse por los presentes métodos incluyen: alglucosidasa alfa, laronidasa, abatecept, galsulfasa, lutropina alfa, factor antihemofílico, agalsidasa beta, interferón beta 1a, darbepoetina alfa, tenecteplasa, etanercept, factor IX de coagulación, hormona foliculoestimulante, interferón beta-1a, imiglucerasa, dornasa alfa, epoetina alfa, insulina o análogos de insulina, mecasemina, factor VIII, factor VIIa, antitrombina III, proteína C, albúmina humana, eritropoyetina, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, interleucina-11, laronidasa, idursufasa, galsulfasa, inhibidor de  $\alpha$ -1-proteinasa, lactasa, adenosina desaminasa, activador de plasminógeno tisular, tirotropina alfa (por ejemplo, Thyrogen®) y alteplasa. Ejemplos adicionales de proteínas recombinantes que pueden producirse por los presente métodos incluyen  $\alpha$ -glucosidasa ácida, alglucosidasa alfa (por ejemplo, Myozyme® y Lumizyme®),  $\alpha$ -L-iduronidasa (por ejemplo, Aldurazyme®), iduronato sulfatasa, heparano N-sulfatasa, galactosa-6-sulfatasa,  $\beta$ -galactosidasa ácida,  $\beta$ -glucuronidasa, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa,  $\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa, lipasa ácida, ceramidasa ácida lisosómica, esfingomielinasa ácida,  $\beta$ -glucosidasa (por ejemplo, Cerezyme® Ceredase®), galactosilceramidasa,  $\alpha$ -galactosidasa-A (por ejemplo, Fabrazyme®),  $\beta$ -galactosidasa ácida,  $\beta$ -galactosidasa, neuraminidasa, hexosaminidasa A y hexosaminidasa B.

Una proteína recombinante soluble secretada puede recuperarse del medio de cultivo líquido retirando o separando físicamente de otro modo el medio de cultivo líquido de las células (por ejemplo, células de mamífero). Se conoce una diversidad de métodos diferentes para retirar el medio de cultivo líquido de las células (por ejemplo, células de mamífero) en la técnica, incluyendo, por ejemplo, centrifugación, filtración, pipeteo y/o aspiración. La proteína terapéutica recombinante secretada entonces puede recuperarse y aislarse del medio de cultivo líquido usando una diversidad de técnicas bioquímicas incluyendo diversos tipos de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía en tamiz molecular, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía de intercambio aniónico) y/o filtración (por ejemplo, filtración con límite de peso molecular).

#### Parámetros de cultivo

Cualquiera de las etapas de cultivo discontinuo o por perfusión descritas en la presente memoria puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 31 °C a aproximadamente 40 °C. Los expertos en la materia apreciarán que la temperatura puede cambiarse en uno o más puntos temporales específicos durante la etapa de cultivo, por ejemplo, en una base horaria o diaria. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse o desplazarse (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) a aproximadamente un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, once días, doce días, catorce días, quince días, dieciséis días, diecisiete días, dieciocho días, diecinueve días o aproximadamente veinte días o más después de la inoculación inicial del recipiente (por ejemplo, biorreactor) con las células (por ejemplo, células de mamífero recombinantes). Por ejemplo, la temperatura puede desplazarse de manera ascendente (por ejemplo, un cambio de hasta o aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o hasta o aproximadamente 20 °C). Por ejemplo, la temperatura puede desplazarse de manera descendente (por ejemplo, un cambio de hasta o aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o hasta o aproximadamente 20 °C).

5 Las etapas de cultivo por perfusión y discontinuo descritas en la presente memoria pueden incluir además la exposición del medio de cultivo líquido en el recipiente, biorreactor de perfusión o biorreactor de producción a una atmósfera que contenga como mucho o aproximadamente un 15 % de CO<sub>2</sub> (por ejemplo, como mucho o aproximadamente un 14 % CO<sub>2</sub>, un 12 % CO<sub>2</sub>, un 10 % CO<sub>2</sub>, un 8 % CO<sub>2</sub>, un 6 % CO<sub>2</sub>, un 5 % CO<sub>2</sub>, un 4 % CO<sub>2</sub>, un 3 % CO<sub>2</sub>, un 2 % CO<sub>2</sub> o como mucho o aproximadamente un 1 % CO<sub>2</sub>). El recipiente biorreactor de perfusión o  
10 biorreactor de producción puede incubar el cultivo celular en una atmósfera humidificada controlada (por ejemplo, a una humedad de más de un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % o una humedad de un 100 %). El biorreactor de perfusión y producción también puede estar equipado con un dispositivo mecánico que puede retirar un volumen de medio de cultivo líquido del biorreactor y, opcionalmente, un filtro dentro del dispositivo mecánico que retira las células del medio de cultivo líquido durante el proceso de transferencia del medio  
15 de cultivo líquido del biorreactor (por ejemplo, un sistema de ATF).

La superficie interior de cualquiera de los recipientes, biorreactores de perfusión o biorreactores de producción descritos en la presente memoria puede tener al menos un recubrimiento (por ejemplo, al menos un recubrimiento de gelatina, colágeno, poli-L-ornitina, poliestireno y laminina) y como se sabe en la técnica, uno o más accesos para rociar O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en el medio de cultivo líquido, un mecanismo de agitación para agitar el medio de cultivo líquido y uno o más detectores (por ejemplo, detectores de O<sub>2</sub> disuelto y CO<sub>2</sub> disuelto).  
20

Métodos para preparar una proteína recombinante

También se divulgan métodos de producción de una proteína recombinante, que incluye cualquiera de los procesos encadenados de inóculo ejemplares proporcionados anteriormente y las etapas adicionales de (f) cultivar por perfusión del cultivo celular de producción en condiciones que permitan que las células de mamífero recombinantes secreten una proteína recombinante y recoger la proteína recombinante del cultivo celular de producción.  
25

Otros métodos de producción de una proteína recombinante incluyen cualquiera de los procesos encadenados de inóculo ejemplares y las etapas adicionales de (f) cultivar de forma discontinua o semicontinua el cultivo celular de producción en condiciones que permitan que las células recombinantes secreten una proteína recombinante y recoger la proteína recombinante del cultivo celular de producción.

30 El cultivo por perfusión del cultivo celular de producción puede realizarse usando cualquiera de los métodos de cultivo por perfusión ejemplares descrito en la presente memoria o conocido en la técnica. Por ejemplo, el periodo de tiempo entre la generación del cultivo celular de producción (después de disponer el segundo cultivo celular en el tercer medio de cultivo) hasta el momento en que el cultivo celular de producción alcanza la densidad celular de producción en estado de equilibrio es entre aproximadamente 1,5 días y aproximadamente 5,0 días (por ejemplo, entre aproximadamente 1,5 días y aproximadamente 4,0 días, entre aproximadamente 1,5 días y aproximadamente 3,5 días, entre aproximadamente 1,5 días y aproximadamente 3,0 días, de aproximadamente 1,5 días y aproximadamente 2,5 días, de aproximadamente 1,5 días y 2,0 días, entre aproximadamente 2,0 días y aproximadamente 5,0 días, entre aproximadamente 2,0 días y aproximadamente 4,5 días, entre aproximadamente 2,0 días y aproximadamente 4,0 días, entre aproximadamente 2,0 días y aproximadamente 3,5 días, entre aproximadamente 2,0 días y aproximadamente 3,0 días, entre aproximadamente 2,0 días y aproximadamente 2,5 días, entre aproximadamente 2,5 días y aproximadamente 5 días, entre aproximadamente 2,5 días y aproximadamente 4,5 días, entre aproximadamente 2,5 días y aproximadamente 4,0 días, entre aproximadamente 2,5 días y aproximadamente 3,5 días, entre aproximadamente 2,5 días y aproximadamente 3,0 días, entre aproximadamente 3,0 días y aproximadamente 4,5 días, entre aproximadamente 3,0 días y aproximadamente 4,0 días, entre aproximadamente 3,0 días y aproximadamente 3,5 días, entre aproximadamente 3,5 días y aproximadamente 5,0 días, entre aproximadamente 3,5 días y aproximadamente 4,5 días, entre aproximadamente 3,5 días y aproximadamente 4,0 días, entre aproximadamente 4,0 días y aproximadamente 5,0 días, entre aproximadamente 4,0 días y aproximadamente 4,5 días o entre aproximadamente 4,5 días y aproximadamente 5,0 días). El cultivo por perfusión del cultivo celular de producción puede continuarse durante, por ejemplo, un periodo de, por ejemplo, entre 5,0 días y 200 días (por ejemplo, entre 5,0 días y 190 días, entre 5,0 días y 180 días, entre 5,0 días y 170 días, entre 5,0 días y 160 días, entre 5,0 días y 150 días, entre 5,0 días y 140 días, entre 5,0 días y 130 días, entre 5,0 días y 120 días, entre 5,0 días y 110 días, entre 5,0 días y 100 días, entre 5,0 días y 90 días, entre 5,0 días y 80 días, entre 5,0 días y 70 días, entre 5,0 días y 60 días, entre 5,0 días y 50 días, entre 5,0 días y 40 días, entre 5,0 días y 30 días, entre 5,0 días y 20 días, entre 5,0 días y 10 días, entre 10 días y 200 días, entre 10 días y 190 días, entre 10 días y 180 días, entre 10 días y 170 días, entre 10 días y 160 días, entre 10 días y 150 días, entre 10 días y 140 días, entre 10 días y 130 días, entre 10 días y 120 días, entre 10 días y 110 días, entre 10 días y 100 días, entre 10 días y 90 días, entre 10 días y 80 días, entre 10 días y 70 días, entre 10 días y 60 días, entre 10 días y 50 días, entre 10 días y 40 días, entre 10 días y 30 días, entre 10 días y 20 días, entre 10 días y 10 días, entre 20 días y 200 días, entre 20 días y 190 días, entre 20 días y 180 días, entre 20 días y 170 días, entre 20 días y 160 días, entre 20 días y 150 días, entre 20 días y 140 días, entre 20 días y 130 días, entre 20 días y 120 días, entre 20 días y 110 días, entre 20 días y 100 días, entre 20 días y 90 días, entre 20 días y 80 días, entre 20 días y 70 días, entre 20 días y 60 días, entre 20 días y 50 días, entre 20 días y 40 días, entre 20 días y 30 días, entre 20 días y 20 días, entre 20 días y 10 días, entre 20 días y 5 días, entre 20 días y 2 días, entre 20 días y 1 día).  
60

días, entre 20 días y 90 días, entre 20 días y 80 días, entre 20 días y 70 días, entre 20 días y 60 días, entre 20 días y 50 días, entre 20 días y 40 días, entre 30 días y 200 días, entre 30 días y 190 días, entre 30 días y 180 días, entre 30 días y 170 días, entre 30 días y 160 días, entre 30 días y 150 días, entre 30 días y 140 días, entre 30 días y 130 días, entre 30 días y 120 días, entre 30 días y 110 días, entre 30 días y 100 días, entre 30 días y 90 días, entre 30 días y 80 días, entre 30 días y 70 días, entre 30 días y 60 días, entre 30 días y 50 días, entre 30 días y 40 días, entre 40 días y 200 días, entre 40 días y 190 días, entre 40 días y 180 días, entre 40 días y 170 días, entre 40 días y 160 días, entre 40 días y 150 días, entre 40 días y 140 días, entre 40 días y 130 días, entre 40 días y 120 días, entre 40 días y 110 días, entre 40 días y 100 días, entre 40 días y 90 días, entre 40 días y 80 días, entre 40 días y 70 días, entre 40 días y 60 días, entre 40 días y 50 días, entre 50 días y 200 días, entre 50 días y 190 días, entre 50 días y 180 días, entre 50 días y 170 días, entre 50 días y 160 días, entre 50 días y 150 días, entre 50 días y 140 días, entre 50 días y 130 días, entre 50 días y 120 días, entre 50 días y 110 días, entre 50 días y 100 días, entre 50 días y 90 días, entre 50 días y 80 días, entre 50 días y 70 días, entre 50 días y 60 días, entre 75 días y 200 días, entre 75 días y 175 días, entre 75 días y 150 días, entre 50 días y 125 días, entre 50 días y 100 días, entre 50 días y 75 días, entre 75 días y 200 días, entre 75 días y 175 días, entre 75 días y 150 días, entre 75 días y 125 días, entre 75 días y 100 días, entre 100 días y 200 días, entre 100 días y 175 días, entre 100 días y 150 días, entre 100 días y 125 días, entre 125 días y 200 días, entre 125 días y 175 días, entre 125 días y 150 días, entre 150 días y 200 días, entre 150 días y 175 días o entre 175 días y 200 días).

El medio de cultivo puede retirarse del biorreactor de producción por retirada continua o periódica (por ejemplo, a la misma frecuencia o frecuencias variables durante el cultivo por perfusión). El medio de cultivo puede retirarse manualmente (por ejemplo, por pipeteo) o mediante un sistema de bomba (por ejemplo, un sistema de filtración de flujo tangencial alterno (ATF) o filtración de fluido tangencial).

#### Aislamiento de la proteína recombinante

Los métodos de producción de una proteína recombinante descritos en la presente memoria pueden incluir además una etapa de aislar la proteína recombinante del medio de cultivo retirado del biorreactor de producción (durante el cultivo por perfusión). La etapa de aislar la proteína recombinante del medio de cultivo retirado del biorreactor de producción puede incluir el funcionamiento de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) maniobras unitarias seleccionadas del grupo de: captura, purificación, pulido, inactivación de virus, ajuste de la concentración iónica y/o el pH de un fluido que incluye la proteína recombinante y filtración. Por ejemplo, una o más maniobras unitarias para aislar una proteína recombinante pueden realizarse pasando un fluido que contiene la proteína recombinante a través de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) sistemas de cromatografía de múltiples columnas (MCCS). La etapa de aislamiento de la proteína recombinante del medio de cultivo puede realizarse usando un proceso integrado y continuo (por ejemplo, procesos ejemplares se describen en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/775060, solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/856390, solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 14/195481, solicitud de patente internacional n.º PCT/US 2014/019909 y solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/928906. Procesos ejemplares pueden incluir proporcionar un medio de cultivo líquido que incluye una proteína recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante) que está sustancialmente libre de células (por ejemplo, medio de cultivo líquido retirado del biorreactor de producción y filtrado a través de un sistema de ATF). Algunos procesos incluyen alimentar de manera continua el medio de cultivo líquido (por ejemplo, el medio de cultivo líquido retirado del biorreactor de producción y filtrado a través de un sistema de ATF) en un sistema de cromatografía de múltiples columnas (MCCS) que incluye al menos una columna de cromatografía, donde estos procesos están integrados y se ejecutan de manera continua desde el medio de cultivo líquido hasta un eluido del MCCS, es decir, la proteína recombinante aislada. Algunos procesos incluyen alimentar de manera continua el medio de cultivo líquido (por ejemplo, el medio de cultivo líquido retirado del biorreactor de producción y filtrado a través de un sistema de ATF) en un primer MCCS (MCCS1), capturar la proteína recombinante del medio de cultivo líquido usando el MCCS1, producir un eluido del MCCS1 que incluye la proteína recombinante y alimentar de manera continua el eluido en un segundo MCCS (MCCS2) y posteriormente eluir la proteína recombinante (del MCCS2) para producir de ese modo la proteína recombinante aislada, donde los procesos están integrados y se ejecutan de manera continua desde el medio de cultivo líquido hasta la proteína recombinante aislada. Algunas realizaciones incluyen además una etapa de formular la proteína recombinante aislada en un agente farmacéutico.

Aspectos no limitantes de los MCCS que pueden usarse en cualquiera de estos procesos (MCCS, MCCS1 y/o MCCS2) se describen en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/775060, solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/856390, solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 14/195481, solicitud de patente internacional n.º PCT/US 2014/019909 y solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/928906. Diversos aspectos adicionales de estos procesos ejemplares se describen a continuación y pueden usarse en cualquier combinación en los procesos sin limitación. Aspectos ejemplares de los procesos proporcionados se describen a continuación; sin embargo, un experto en la materia apreciará que pueden añadirse etapas adicionales a los procesos descritos en la presente memoria y pueden usarse otros materiales para realizar cualquiera de las etapas de los procesos descritos en la presente memoria.

Los procesos ejemplares descritos en la presente memoria pueden incluir el uso de un MCCS o dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) sistemas de cromatografía de múltiples columnas (MCCS) (por ejemplo, un MCCS1 y MCCS2). Un MCCS puede incluir dos o más columnas de cromatografía, dos o más membranas

5 cromatográficas o una combinación de al menos una columna de cromatografía y al menos una membrana  
 10 cromatográfica. En ejemplos no limitantes, un MCCS (por ejemplo, MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 en cualquiera de los  
 15 procesos de la presente memoria) puede incluir cuatro columnas cromatográficas, tres columnas cromatográficas y  
 una membrana cromatográfica, tres columnas cromatográficas, dos columnas cromatográficas, dos membranas  
 cromatográficas y dos columnas cromatográficas y una membrana cromatografía. Ejemplos adicionales de  
 combinaciones de columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas pueden idearse para su uso en un  
 MCCS (por ejemplo, MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 en cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria)  
 por un experto en la materia sin limitación. Las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas  
 individuales presentes en un MCCS pueden ser idénticas (por ejemplo, tener la misma forma, volumen, resina,  
 mecanismo de captura y maniobra unitaria) o pueden ser diferentes (por ejemplo, tener uno o más de uno de forma,  
 volumen, resina, mecanismo de captura y/u maniobra unitaria diferente). La una o más columnas de cromatografía  
 y/o una o más membranas cromatográficas individuales presentes en un MCCS (por ejemplo, MCCS, MCCS1 y/o  
 MCCS2 en cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria) puede realizar la misma maniobra unitaria  
 (por ejemplo, la maniobra unitaria de captura, purificación o pulido) o diferentes maniobras unitarias (por ejemplo,  
 diferentes maniobras unitarias seleccionadas de, por ejemplo, el grupo de captura, purificación, pulido, inactivación  
 de virus, ajuste de la concentración iónica y/o el pH de un fluido que incluye la proteína recombinante y filtración).  
 Por ejemplo, en ejemplos de los procesos descritos en la presente memoria, al menos una columna de  
 cromatografía y/o membrana cromatográfica en el MCCS o MCCS1 realiza la maniobra unitaria de capturar la  
 proteína recombinante.

20 La una o más columnas de cromatografía en un MCCS (por ejemplo, el MCCS, MCCS1 y/o MCCS2) usado en  
 cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria puede tener sustancialmente el mismo volumen de  
 resina o puede tener diferentes volúmenes de resina. Uno o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho,  
 nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno,  
 veintidós, veintitrés o veinticuatro) tipos diferentes de tampón pueden emplearse durante el uso del MCCS, MCCS1  
 25 y/o MCCS2 en cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria. Como se sabe en la técnica, el uno o  
 más tipos de tampón usados en el MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 en el proceso descrito en la presente memoria  
 dependerá de la resina presente en la una o más columnas de cromatografía y/o la una o más membranas  
 cromatográficas del MCCS, MCCS1 y/o MCCS2, las propiedades biofísicas de la proteína recombinante y la  
 maniobra unitaria (por ejemplo, cualquiera de las maniobras unitarias ejemplares descritas en la presente memoria)  
 30 realizada por la una o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas específicas del MCCS,  
 MCCS1 y/o MCCS2. El volumen y tipo de tampón empleados durante el uso del MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 en  
 cualquiera de los procesos descritos en la presente memoria también puede determinarse por un experto en la  
 materia (por ejemplo, analizado en mayor detalle a continuación). Por ejemplo, el volumen y el tipo o tipos de  
 tampón empleados durante el uso del MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 en cualquiera de los procesos descritos en la  
 35 presente memoria pueden elegirse para optimizar uno o más de los siguientes en la proteína recombinante aislada:  
 la producción global de proteína recombinante, la actividad de la proteína recombinante, el nivel de pureza de la  
 proteína recombinante y la eliminación de contaminantes biológicos de un fluido que incluye la proteína  
 recombinante (por ejemplo, medio de cultivo líquido) (por ejemplo, ausencia de virus activos, micobacterias,  
 levaduras, bacterias o células de mamífero).

40 El MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 puede ser un sistema de cromatografía a contracorriente periódico (PCCS). Un PCCS  
 puede incluir, por ejemplo, dos o más columna de cromatografía (por ejemplo, tres columnas o cuatro columnas) que  
 se conmutan para permitir la elución continua de la proteína recombinante desde las dos o más columna de  
 cromatografía. Un PCCS puede incluir dos o más columna de cromatografía, dos o más membranas cromatográficas  
 45 o al menos una columna cromatográfica y al menos una membrana cromatográfica. Una maniobra de columna  
 (ciclo) consiste en general en las etapas de carga, lavado, eluido y regeneración. En los PCCS, se usan múltiples  
 columnas para ejecutar las mismas etapas de manera concreta y continua de un modo cíclico. Como las columnas  
 se hacen funcionar en serie, el flujo directo y el lavado de una columna se capturan por otra columna. Esta  
 característica única de los PCCS permite la carga de la resina cerca de su capacidad de unión estática en lugar de  
 la capacidad de unión dinámica, como es típico durante la cromatografía en modo discontinuo. Como resultado del  
 50 ciclado y elución continuos, el fluido que entra en un PCCS se procesa de manera continua y el eluido que incluye la  
 proteína recombinante se produce de manera continua.

La estrategia de conmutación de columna se emplea para avanzar de una etapa a otra en un ciclo de PCCS.  
 Ejemplos de conmutación de columna que pueden usarse en un PCCS se describen en la solicitud de patente  
 provisional de Estados Unidos n.º 61/775060, solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/856390,  
 55 solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 14/195481, solicitud de patente internacional n.º  
 PCT/US 2014/019909 y solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/928906. En los PCCS, el tiempo  
 de residencia (RT) de la proteína recombinante en cada columna de cromatografía y/o membrana cromatografía  
 presente en el PCCS puede disminuirse sin aumentar el tamaño de la columna/membrana porque el avance de la  
 primera columna/membrana puede capturarse en otra columna/membrana en el PCCS. Puede diseñarse un sistema  
 60 de proceso continuo para procesar medio de cultivo líquido a cualquier tasa de perfusión (D) variando el volumen (V)  
 de la columna/membrana y el RT usando la ecuación:  $V = D * RT$ .

La una o más maniobras unitarias que pueden realizarse por el MCCS o el MCCS1 y/o el MCCS2 usado en los  
 procesos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, capturar la proteína recombinante, inactivar los virus

presentes en un fluido que incluye la proteína recombinante, purificar la proteína recombinante, pulir la proteína recombinante, alojar un fluido que incluye la proteína recombinante (por ejemplo, usando cualquiera del uno o más tanques de descomposición ejemplares descritos en la presente memoria), filtrar o retirar el material en partículas y/o las células de un fluido que incluye la proteína recombinante y ajustar la concentración iónica y/o pH de un fluido que incluye la proteína recombinante. En algunas realizaciones, el MCCS o el MCCS1 incluye al menos una columna cromatografía y/o membrana cromatográfica que realiza la maniobra unitaria de capturar la proteína recombinante. La maniobra unitaria de captura puede realizarse usando al menos una columna de cromatografía y/o resina de cromatografía, por ejemplo, que utiliza un mecanismo de captura. Ejemplos no limitantes de mecanismos de captura incluyen un mecanismo de captura de unión a proteína A, un mecanismo de captura de unión a anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un mecanismo de captura de unión a sustrato, un mecanismo de captura de unión a aptámero, un mecanismo de captura de unión a marca (por ejemplo, mecanismo de captura basado en marca de poli-His) y un mecanismo de captura de unión a cofactor. La captura también puede realizarse usando una resina que puede usarse para realizar cromatografía de intercambio catiónico o intercambio aniónico, cromatografía de tamiz molecular o cromatografía de interacción hidrófoba. Resinas no limitantes que pueden usarse para capturar una proteína recombinante se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de resinas que pueden usarse para capturar una proteína recombinante son conocidos en la técnica.

La maniobra unitaria de inactivar virus presentes en un fluido que incluye la proteína recombinante puede realizarse usando un MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 (por ejemplo, que incluye(n), por ejemplo, una columna de cromatografía, una membrana de cromatografía o un tanque de mantenimiento que puede incubar un fluido que incluye la proteína recombinante a un pH entre aproximadamente 3,0 y 5,0 (por ejemplo, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,25, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,0, entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 3,8 o aproximadamente 3,75) durante un periodo de al menos 30 minutos (por ejemplo, un periodo entre aproximadamente 30 minutos y 1,5 horas, un periodo entre aproximadamente 30 minutos y 1,25 horas, un periodo entre 0,75 horas y 1,25 horas o un periodo de aproximadamente 1 hora)).

La maniobra unitaria de purificar una proteína recombinante puede realizarse usando uno o más MCCS (por ejemplo, un MCCS, MCCS1 y/o MCCS2) que incluyen, por ejemplo, una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que incluye una resina, por ejemplo, que utiliza un sistema de captura. Ejemplos no limitantes de mecanismos de captura incluyen un mecanismo de captura de unión a proteína A, un mecanismo de captura de unión a anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un mecanismo de captura de unión a sustrato, un mecanismo de captura de unión a aptámero, un mecanismo de captura de unión a marca (por ejemplo, mecanismo de captura basado en marca de poli-His) y un mecanismo de captura de unión a cofactor. La purificación también puede realizarse usando una resina que puede usarse para realizar cromatografía de intercambio catiónico o intercambio aniónico, cromatografía de tamiz molecular o cromatografía de interacción hidrófoba. Resinas no limitantes que pueden usarse para purificar una proteína recombinante se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de resinas que pueden usarse para purificar una proteína recombinante son conocidos en la técnica.

La maniobra unitaria de pulir una proteína recombinante puede realizarse usando uno o más MCCS (por ejemplo, un MCCS, MCCS1 y/o MCCS2) que incluye(n), por ejemplo, una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que incluye una resina, por ejemplo, que puede usarse para realizar cromatografía de intercambio catiónico, intercambio aniónico, tamiz molecular o cromatografía de interacción hidrófoba. Resinas no limitantes que pueden usarse para pulir una proteína recombinante se describen en la presente memoria. Ejemplos adicionales de resinas que pueden usarse para pulir una proteína recombinante son conocidos en la técnica.

La maniobra unitaria de filtrar un fluido que incluye la proteína recombinante puede realizarse usando un MCCS (por ejemplo, el MCCS, MCCS1 y/o MCCS2) que incluye, por ejemplo, un filtro, o una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que incluye una resina de tamiz molecular. Como se sabe en la técnica, una amplia diversidad de filtros submicrométricos (por ejemplo, un filtro con un tamaño de poro de menos de 1  $\mu\text{m}$ , menos de 0,5  $\mu\text{m}$ , menos de 0,3  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$ , menos de 0,2  $\mu\text{m}$ , menos de 100 nm, menos de 80 nm, menos de 60 nm, menos de 40 nm, menos de 20 nm o menos de 10 nm) está disponible en la técnica, que pueden retirar cualquier material precipitado y/o células (por ejemplo, proteína precipitada no plegada; proteínas de la célula hospedadora precipitadas no deseadas; lípidos precipitados; bacterias; células de levadura; células fúngica; micobacterias; y/o células de mamífero). Se sabe que filtros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$  o menos de 0,2  $\mu\text{m}$  retiran de manera eficaz las bacterias del fluido que incluye la proteína recombinante. Como se sabe en la técnica, una columna de cromatografía o una membrana cromatográfica incluyendo una resina de tamiz molecular también puede usarse en un MCCS (por ejemplo, el MCCS, MCCS1 y/ MCCS2) para realizar la maniobra unitaria de filtrar un fluido que incluye una proteína recombinante.

Las maniobras unitarias de ajuste de la concentración iónica y/o pH de un fluido que incluye la proteína recombinante pueden realizarse usando un MCCS (por ejemplo, un MCCS, un MCCS1 y/o un MCCS2) que incluye y utiliza un depósito de ajuste de tampón (por ejemplo, un depósito de ajuste de tampón en línea) que añade una nueva disolución de tampón a un fluido que incluye la proteína recombinante (por ejemplo, entre columnas dentro del MCCS, MCCS1 y/o MCCS2, o después de la última columna en un penúltimo MCCS (por ejemplo, el MCCS1) y antes de que el fluido que incluye la proteína recombinante se alimente a la primera columna del siguiente MCCS (por ejemplo, el MCCS2)).

En los procesos ejemplares descritos en la presente memoria, el MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 puede realizar dos o más maniobras unitarias. Por ejemplo, el MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 puede cada uno realizar al menos las siguientes maniobras unitarias: capturar la proteína recombinante e inactivar los virus presentes en el fluido que incluye la proteína recombinante; capturar la proteína recombinante, inactivar los virus presentes en el fluido que incluye la proteína recombinante y ajustar la concentración iónica y/o pH de un líquido que incluye la proteína recombinante; purificar la proteína recombinante y pulir la proteína recombinante; purificar la proteína recombinante, pulir la proteína recombinante y filtrar un fluido que incluye la proteína recombinante o retirar precipitados y/o materia en partículas de un fluido que incluye la proteína recombinante; y purificar la proteína recombinante, pulir la proteína recombinante, filtrar un fluido que incluye la proteína recombinante o retirar precipitados y/o materia en partículas de un fluido que incluye la proteína recombinante, y ajustar la concentración iónica y/o pH de un líquido que incluye la proteína recombinante.

En los procesos ejemplares descritos en la presente memoria, la captura de la proteína recombinante del medio de cultivo líquido se realiza usando el MCCS o MCCS1. Como puede apreciarse en la técnica, para conseguir la captura de la proteína recombinante, al menos una columna cromatográfica o al menos una membrana cromatográfica en el MCCS o MCCS1 debe incluir una resina que utiliza un mecanismo de captura (por ejemplo, cualquiera de los mecanismos de captura ejemplares descritos en la presente memoria) o incluye una resina que puede realizar cromatografía de intercambio catiónico, intercambio aniónico de tamiz molecular o de interacción hidrófoba. Por ejemplo, si la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, el sistema de captura puede ser un mecanismo de captura de unión a proteína A o un mecanismo de captura de unión a antígeno (donde el antígeno de captura se reconoce específicamente por el anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo). Si la proteína recombinante es una enzima, el mecanismo de captura puede usar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la enzima para capturar la enzima recombinante, un sustrato de la enzima para capturar la enzima recombinante, un cofactor de la enzima para capturar la enzima recombinante o, si la enzima recombinante incluye una marca, una proteína, quelato metálico o anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) que se une específicamente a la marca presente en la enzima recombinante. Resinas no limitantes que pueden usarse para capturar una proteína recombinante se describen en la presente memoria y resinas adicionales que pueden usarse para capturar una proteína recombinante son conocidas en la técnica. Un ejemplo no limitante de resina que utiliza un mecanismo de captura de unión a proteína A es la resina MabSelect SuRe (GE Healthcare, Piscataway, NJ), JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 (Sunnyvale, CA), y Kaneka KanCap A (Osaka, Japón).

En algunos de los procesos ejemplares descritos en la presente memoria, el MCCS o MCCS1 puede incluir un depósito que aloja un fluido que incluye la proteína recombinante a bajo pH (por ejemplo, un pH por debajo de 4,6, por debajo de 4,4, por debajo de 4,2, por debajo de 4,0, por debajo de 3,8, por debajo de 3,6, por debajo de 3,4, por debajo de 3,2 o por debajo de 3,0) durante, por ejemplo, aproximadamente 1 minuto a 1,5 horas (por ejemplo, aproximadamente 1 hora) e inactiva los virus presente en un fluido que incluye la proteína recombinante. Como puede apreciarse por los expertos en la materia, puede usarse una diversidad de otros medios para realizar la maniobra unitaria de inactivar virus. Por ejemplo, también puede usarse irradiación UV de un fluido que incluye la proteína recombinante para realizar la maniobra unitaria de inactivar virus.

El MCCS o MCCS1 puede incluir un PCCS que incluye cuatro columnas de cromatografía, donde al menos tres de las cuatro columnas de cromatografía realizan la maniobra unitaria de capturar la proteína recombinante del medio de cultivo líquido (por ejemplo, usando un MCCS que incluye cualquiera de la al menos una columna de cromatografía que incluye una resina que puede realizar la maniobra unitaria de captura (por ejemplo, cualquiera de las descritas en la presente memoria)). En estos ejemplos, la cuarta columna del PCC puede realizar la maniobra unitaria de inactivar virus en un fluido que incluye la proteína recombinante (por ejemplo, cualquiera de las columnas ejemplares descritas en la presente memoria que pueden usarse para conseguir la inactivación vírica de un fluido que incluye la proteína recombinante).

El MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 en los procesos ejemplares descritos en la presente memoria puede usarse para realizar la maniobra unitaria de purificar y pulir la proteína recombinante. Por ejemplo, el MCCS2 puede usarse para realizar la maniobra de purificar y pulir la proteína recombinante y el eluido del MCCS2 es una proteína recombinante aislada. El MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 puede incluir al menos una (por ejemplo, dos, tres o cuatro) columna de cromatografía o membrana cromatográfica que puede usarse para realizar la maniobra unitaria que purifican una proteína recombinante, y al menos una (por ejemplo, dos, tres o cuatro) columna de cromatografía o membrana cromatográfica que puede usarse para realizar la maniobra unitaria de pulir la proteína recombinante.

La al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que puede usarse para realizar la maniobra unitaria de purificar la proteína recombinante puede incluir una resina que utiliza un mecanismo de captura (por ejemplo, cualquiera de los mecanismos de captura descritos en al presente memoria o conocidos en la técnica) o una resina que puede usarse para realizar cromatografía de intercambio aniónico, intercambio catiónico, de tamiz molecular o de interacción hidrófoba. La al menos una columna de cromatografía o membrana cromatográfica que puede usarse para realizar la maniobra unitaria de pulir la proteína recombinante puede incluir una resina que puede usarse para realizar cromatografía de intercambio aniónico, intercambio catiónico, de tamiz molecular o de interacción hidrófoba (por ejemplo, cualquiera de las resinas ejemplares para realizar cromatografía de intercambio aniónico, intercambio catiónico, de tamiz molecular o de interacción hidrófoba descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica). La una o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas usadas para

realizar la maniobra unitaria de pulido pueden incluir una resina que se une selectivamente o retiene las impurezas presentes en un fluido que incluye la proteína recombinante.

En algunos ejemplos de los procesos ejemplares descritos en la presente memoria, el MCCS2 incluye un PCCS que incluye tres columnas de cromatografía y una membrana cromatográfica, por ejemplo, donde las tres columnas de cromatografía en el PCCS realizan la maniobra unitaria de purificar la proteína recombinante (por ejemplo, usando al menos una columna de cromatografía que puede usarse para realizar la maniobra unitaria de purificar la proteína) y la membrana cromatográfica en el PCCS realiza la maniobra unitaria de pulir la proteína recombinante. En estos ejemplos, la membrana cromatográfica en el PCCS que puede usarse para realizar la maniobra unitaria de pulir la proteína recombinante puede ser cualquiera de las membranas cromatográficas ejemplares descritas en la presente memoria que pueden usarse para realizar la maniobra unitaria de pulir la proteína recombinante. Cualquiera de los métodos de conmutación de columna descritos en la presente memoria puede usarse para determinar el momento en que las tres primeras columnas de cromatografía y la membrana cromatográfica en el PCCS en este ejemplo pueden conmutarse.

Sistemas ejemplares de aislamiento de proteína recombinante

Ejemplos de sistemas de fabricación biológicos útiles para realizar los procesos descritos en la presente memoria y que incluyen un MCCS o un MCCS1 y MCCS2 se describen en las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/775060, solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/856390, solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 14/195481, solicitud de patente internacional n.º PCT/US 2014/019909 y solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/928906. El sistema completo puede incluir, por ejemplo, un total de cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte columnas de cromatografía. Por ejemplo, el MCCS, MCCS1 y/o MCCS2 puede incluir (o puede incluir cada uno) dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez columnas de cromatografía.

Por ejemplo, sistemas útiles pueden incluir un MCCS1 que incluye una entrada y un MCCS2 que incluye una salida, o un MCCS que incluye una entrada y una salida. En algunas realizaciones, el MCCS1 y MCCS2 están en comunicación fluida entre sí. Estos sistemas también pueden configurarse de modo que el fluido pueda pasar a la entrada, a través del MCCS1 y MCCS2 y salir del sistema de fabricación a través de la salida.

En estos sistemas ejemplares, el MCCS o MCCS1 puede incluir una entrada a través del que puede pasar fluido (por ejemplo, medio de cultivo líquido del biorreactor de producción que está sustancialmente libre de células) al MCCS o MCCS1, respectivamente. La entrada puede ser cualquier estructura conocida en la técnica para dichos propósitos. Puede incluir, por ejemplo, una rosca, acanaladura o un precinto que permite insertar un conducto de fluido, de modo que después de la inserción del conducto de fluido en la entrada, entre fluido al MCCS o MCCS1 a través de la entrada sin infiltración significativa del fluido desde la entrada. Entradas no limitantes que pueden usarse en los presentes sistemas son conocidas y se entenderían por un experto en la materia.

El MCCS o MCCS1 puede incluir al menos dos columnas de cromatografía, al menos dos membranas cromatográficas o al menos una columna de cromatografía y al menos una membrana cromatográfica, y una entrada. El MCCS o MCCS1 puede ser cualquiera de los MCCS ejemplares descritos en la presente memoria, o puede tener una o más de cualquiera de las características ejemplares de un MCCS (en cualquier combinación) descrito en la presente memoria. La una o más columnas de cromatografía y/o la una o más membranas cromatográficas presentes en el MCCS o MCCS1 pueden tener una o más de cualquiera de las formas, tamaños, volúmenes (volúmenes de lecho) y/o maniobra o maniobras unitarias ejemplares descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica.

La una o más columnas de cromatografía y/o la una o más membranas cromatográficas presentes en el MCCS o MCCS1 pueden incluir una o más de cualquiera de las resinas ejemplares descritas en la presente memoria conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resina incluida en una o más de la una o más columnas cromatográficas y/o la una o más membranas cromatográficas presentes en el MCCS o MCCS1 puede ser una resina que utiliza un mecanismo de captura (por ejemplo, mecanismo de captura de unión a proteína A, mecanismo de captura de unión a proteína G, mecanismo de captura de unión a anticuerpo o fragmento de anticuerpo, mecanismo de captura de unión de sustrato, mecanismo de captura de unión a cofactor, un mecanismo de captura de unión a aptámero y/o un mecanismo de captura de unión a marca). La resina incluida en una o más de las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas del MCCS o MCCS1 puede ser una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónico, una resina de tamiz molecular o una resina de interacción hidrófoba, o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos adicionales de resinas que pueden usarse para purificar una proteína recombinante son conocidos en la técnica y pueden incluirse en una o más de las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas presente en el MCCS o MCCS1. La una o más columnas de cromatografía y/o membranas de cromatografía presentes en el MCCS o MCCS1 pueden incluir la misma resina y/o diferentes resinas (por ejemplo, cualquiera de las resinas descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica para su uso en la purificación de proteína recombinante).

Las dos o más columna de cromatografía y/o resinas cromatográficas presentes en el MCCS o MCCS1 pueden realizar una o más maniobras unitarias (por ejemplo, capturar una proteína recombinante, purificar una proteína recombinante, pulir una proteína recombinante, inactivar virus, ajustar la concentración iónica y/o pH de un fluido que incluye la proteína recombinante o filtrar un fluido que incluye una proteína recombinante). En ejemplos no limitantes, el MCCS o MCCS1 puede realizar las maniobras unitarias de captura de una proteína recombinante de un fluido (por ejemplo, un medio de cultivo líquido) e inactivación de los virus presentes en el fluido que incluye la proteína recombinante. El MCCS o MCCS1 puede realizar cualquier combinación de dos o más maniobras unitarias descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica.

La una o más columnas de cromatografía y/o una o más membranas cromatográficas presente en el MCCS o MCCS1 pueden conectarse o moverse unas con respecto a las otras mediante un mecanismo de conmutación (por ejemplo, un mecanismo de conmutación de columna). El MCCS o MCCS1 también puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) bombas (por ejemplo, automatizadas, por ejemplo, bombas peristálticas automatizadas). Los eventos de conmutación de columna pueden activarse mediante la detección de un nivel de proteína recombinante detectado por absorbancia de UV correspondiente a un determinado nivel de proteína recombinante en un fluido que pasa a través del MCCS o MCCS1 (por ejemplo, la entrada en y/o eluido de una o más de más las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas en el MCCS o MCCS1), un volumen específico de líquido (por ejemplo, tampón), o tiempo específico transcurrido. La conmutación de columna en general significa un mecanismo por el que al menos dos columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas diferentes en un MCCS o MCCS1 (por ejemplo, dos o más columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas diferentes presentes en el MCCS1 o MCCS2) se permite que pasen a través de una etapa diferente (por ejemplo, equilibrado, carga, elución o lavado) sustancialmente al mismo tiempo durante al menos parte del proceso.

El MCCS o MCCS1 puede ser un sistema de cromatografía a contracorriente periódico (PCCS). Por ejemplo, el PCCS que es el MCCS o MCCS1 (es decir, PCCS o PCCS1, respectivamente) puede incluir cuatro columnas de cromatografía, donde las tres primeras columnas realizan la maniobra unitaria de capturar una proteína recombinante de un fluido (por ejemplo, un medio de cultivo líquido) y la cuarta columna del PCCS realiza la maniobra unitaria de inactivar virus en el fluido que incluye la proteína recombinante. Un PCCS que es el MCCS o MCCS1 puede utilizar un mecanismo de conmutación de columna. El sistema de PCC puede utilizar un sistema ÄKTA modificado (GE Healthcare, Piscataway, NJ) que puede procesar hasta, por ejemplo, cuatro, cinco, seis, siete u ocho columnas o más.

El segundo MCCS (MCCS2) en los sistemas ejemplares descritos en la presente memoria puede incluir al menos dos columnas de cromatografía, al menos dos membranas cromatográficas o al menos una columna de cromatografía y al menos una membrana cromatográfica, y una salida. El MCCS2 puede ser cualquiera de los MCCS ejemplares descritos en la presente memoria o puede tener una o más de cualquiera de las características ejemplares de un MCCS (en cualquier combinación) descrito en la presente memoria. La una o más columnas de cromatografía y/o la una o más membranas cromatográficas presentes en el MCCS2 pueden tener uno o más de: cualquiera de las formas, tamaños, volúmenes (volúmenes de lecho) y/u maniobras unitarias descritas en la presente memoria. La una o más columnas de cromatografía y/o la una o más membranas cromatográficas pueden incluir cualquiera de las resinas ejemplares descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica. Por ejemplo, la resina incluida en una o más de las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas presentes en el MCCS2 puede ser una resina que utiliza un mecanismo de captura (por ejemplo, un mecanismo de captura de unión a proteína A, mecanismo de captura de unión a proteína G, mecanismo de captura de unión a anticuerpo o fragmento de anticuerpo, mecanismo de captura de unión a sustrato, mecanismo de captura de unión a cofactor, mecanismo de captura de unión a marca y/o mecanismo de captura de unión a aptámero). Las resinas útiles incluyen, por ejemplo, una resina de intercambio catiónico, una resina de intercambio aniónico, una resina de tamiz molecular y una resina de interacción hidrófoba. Ejemplos adicionales de resinas son conocidos en la técnica. La una o más columnas de cromatografía y/o membranas de cromatografía presentes en el MCCS2 pueden incluir la misma resina y/o diferentes resinas (por ejemplo, cualquiera de las resinas descritas en la presente memoria o conocidas en la técnica para su uso en la purificación de proteína recombinante).

La una o más columnas de cromatografía y/o una o más membranas cromatográficas presentes en el MCCS2 pueden realizar una o más maniobras unitarias (por ejemplo, cualquiera de las maniobras unitarias descritas en la presente memoria o cualquiera combinación de las maniobras unitarias descritas en la presente memoria). En ejemplos no limitantes, el MCCS2 puede realizar las maniobras unitarias de purificar una proteína recombinante de un fluido y pulir la proteína recombinante presente en el fluido que incluye la proteína recombinante. En otros ejemplos no limitantes, el MCCS2 puede realizar las maniobras unitarias de purificar una proteína recombinante presente de un fluido, pulir una proteína recombinante presente en un fluido y filtrar un fluido que incluye una proteína recombinante. En otro ejemplo, el MCCS2 puede realizar las maniobras unitarias de purificar una proteína recombinante presente en un fluido, pulir una proteína recombinante presente en un fluido, filtrar un fluido que incluye una proteína recombinar y ajustar la concentración iónica y/o pH de un fluido que incluye una proteína recombinante. El MCCS2 puede realizar cualquier combinación de dos o más maniobras unitarias descritas en el presente documento o conocidas en la técnica.

- La una o más columnas de cromatografía y/o una o más membranas cromatográficas presentes en el MCCS2 pueden conectarse o moverse unas con respecto a las otras mediante un mecanismo de conmutación (por ejemplo, un mecanismo de conmutación de columna). El MCCS2 también puede incluir una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco) bombas (por ejemplo, automatizadas, por ejemplo, bombas peristálticas automatizadas). Los eventos de conmutación de columna pueden activarse mediante la detección de un nivel de proteína recombinante detectado por absorbancia de UV correspondiente a un determinado nivel de proteína recombinante en el fluido que pasa a través del MCCS2 (por ejemplo, la entrada y/o el eluido de una o más de las columnas de cromatografía y/o membranas cromatográficas en el MCCS2), un volumen específico de líquido (por ejemplo, tampón) o tiempo específico transcurrido.
- El MCCS2 puede ser un sistema de cromatografía a contracorriente periódico (es decir, PCCS2). Por ejemplo, el PCCS2 puede incluir tres columnas que realizan la maniobra unitaria de purificar una proteína recombinante de un fluido, y una membrana cromatográfica que realiza la maniobra unitaria de pulir la proteína recombinante presente en un fluido. Por ejemplo, las tres columnas que realizan la maniobra unitaria de purificar una proteína recombinante de un fluido pueden incluir, por ejemplo, una resina de intercambio catiónico y la membrana cromatográfica que realiza la maniobra unitaria de pulido puede incluir una resina de intercambio catiónico. Un PCCS2 puede utilizar un mecanismo de conmutación de columna. El PCCS2 puede utilizar un sistema ÄKTA modificado (Healthcare, Piscataway, NJ) que puede procesar hasta, por ejemplo, cuatro, cinco, seis, siete u ocho columnas o más.
- El MCCS2 puede incluir una salida a través de la que puede salir la proteína recombinante aislada del sistema. La salida puede incluir, por ejemplo, una rosca, acanaladura o un precinto que permite que un conducto de fluido se inserte o un vial diseñado para mantener o almacenar la proteína recombinante aislada. Una salida puede incluir una superficie que puede usarse para precintar un vial de biocarga reducida u otro de dicho depósito de almacenamiento en la salida para permitir que la proteína recombinante aislada fluya directamente al vial de biocarga reducida o depósito de almacenamiento. Salidas no limitantes que pueden usarse en los presentes sistemas son conocidas y se entenderían por los expertos en la materia.
- Formulación de una proteína recombinante aislada
- La proteína recombinante aislada puede formularse además en un agente farmacéutico usando métodos conocidos en la técnica. Los agentes farmacéuticos se formulan para que sean compatibles con su vía pretendida de administración (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraperitoneal). Los agentes farmacéuticos pueden incluir un diluyente estéril (por ejemplo, agua o disolución salina estéril), un aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos o antifúngicos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos, clorobutanol, fenol, ácidos ascórbico, timerosal y similares, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminetetraacético, tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes isotónicos, tales como azúcares (por ejemplo, dextrosa), polialcoholes (por ejemplo, manitol o sorbitol) o sales (por ejemplo, cloruro de sodio) o cualquier combinación de los mismos. También pueden usarse suspensiones liposómicas como vehículos farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4522811). Las preparaciones de los agentes farmacéuticos pueden formularse y encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis. Cuando se requiere (como, por ejemplo, en formulaciones inyectables), puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina o un tensioactivo. La absorción de la proteína recombinante aislada puede prolongarse incluyendo un agente que retarda la absorción (por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina). Como alternativa, puede conseguirse liberación controlada mediante implantes y sistemas de suministro microencapsulados, que pueden incluir polímeros biodegradables, biocompatibles (por ejemplo, acetato de etilenvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico); Alza Corporation y Nova Pharmaceutical, Inc.).
- Los agentes farmacéuticos que incluyen una o más de cualquiera de las proteínas recombinantes aisladas pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraperitoneal) en forma monodosis (es decir, unidades físicamente concretas que contienen una cantidad predeterminada de proteína activa para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación).
- La toxicidad y la eficacia terapéutica de los agentes farmacéuticos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales (por ejemplo, monos). Por ejemplo, se puede determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población): siendo el índice terapéutico la relación de DL50:DE50. Se prefieren agentes farmacéuticos que muestran altos índices terapéuticos. Cuando un agente farmacéutico muestra un efecto secundario indeseable, debe tenerse cuidado de minimizar el daño potencial (es decir, reducir los efectos secundarios indeseados). La toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse por otros procedimientos farmacéuticos convencionales.
- Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de una dosificación apropiada de cualquier proteína recombinante aislada dada para su uso en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). La eficacia y dosificación de cualquiera de los agentes farmacéuticos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante un profesional sanitario o profesional veterinario usando métodos conocidos en la

técnica. Determinados factores pueden influir en la dosificación y cronología requeridas para tratar de manera eficaz a un sujeto (por ejemplo, la gravedad de la enfermedad o trastornos, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto y la presencia de otras enfermedades).

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

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Procesos encadenados de inóculo ejemplares de dos etapas

10 Se realizaron experimentos para desarrollar procesos encadenados de inóculo mejorados. Los procesos encadenados de inóculo ejemplares se muestran en las figuras 1 y 2. En comparación con los procesos encadenados de inóculo convencionales, los procesos encadenados de inóculo ejemplares eliminan dos etapas de cultivo en centrifugadora intermedias. Los procesos encadenados de inóculo ejemplares mostrados en las figuras 1 y 2 reemplazan los cultivos en centrifugadora (por ejemplo, cultivos en centrifugadora de 125 ml a 10 l en las figuras 1 y 2) con biorreactores de agitación (2 l y 20 l) en las figuras 1 y 2). El remplazo de los múltiples cultivos en centrifugadora con biorreactores de agitación en las figuras 1 y 2 reduce el número de manipulaciones requeridas en una campana de flujo laminar y, por tanto, mejora el éxito funcional permitiendo la maniobra en un sistema cerrado. El uso de cultivo por perfusión en la etapa de cultivo por perfusión N-1 (por ejemplo, un biorreactor de perfusión de 50 l con un dispositivo de filtración de ATF en las figuras 1 y 2) también permite alcanzar densidades celulares de cultivo de  $\geq 50 \times 10^6$  células viables/ml. Las altas densidades de células viables conseguidas en la etapa de cultivo por perfusión N-1 permiten una densidad de inoculación de  $5 \times 10^6$  células viables/ml en un biorreactor de producción de 500 l, que es significativamente mayor que la densidad celular inicial en el biorreactor de producción conseguida por procesos encadenados de inóculo convencionales (figura 1). La mayor densidad de inoculación del biorreactor de producción proporcionada por los presentes procesos encadenados de inóculo ayuda a reducir la fase de crecimiento del biorreactor de producción en aproximadamente 5 días, que ahorra tiempo en la planta de fabricación para un biorreactor de producción que funciona durante 50 días. Los materiales y métodos usados para ensayar la productividad de los procesos encadenados de inóculo ejemplares mostrados en las figuras 1 y 2 se describen a continuación.

#### Materiales y métodos

##### *Línea celular y medio*

30 Todos los experimentos se realizaron usando un medio de cultivo celular químicamente definido disponible en el mercado (Life Technologies, Grand Island, NY) complementado con glutamina 4 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y una línea celular CHO que produce una enzima humana recombinante.

##### *Cultivo encadenado de inóculo discontinuo en biorreactores de agitación de 2 l y 20 l*

35 Se descongeló un vial de banco de células de alta densidad (HD) ( $10 \times 10^7$  células viables/ml, 4,5 ml/vial) en una bolsa de células de agitación de 2 l (GE Healthcare, Piscataway, NJ) a un volumen de trabajo de 1 l. Cuando la densidad de células viables en la bolsa de células de agitación de 2 l alcanzó  $3,0 \times 10^6$  células viables/ml, el cultivo se expandió en una bolsa de células de agitación de 20 l a un volumen de trabajo de 7,5 l. Se usó un sistema de biorreactor de agitación (modelo 20/50 EHTD) (GE Healthcare) como plataforma de oscilación para ambas bolsas de células de agitación de 2 l y 20 l. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, velocidad de oscilación de 16 r.p.m. y 7° de ángulo de oscilación. Se añadió una mezcla gaseosa de un 20 % de O<sub>2</sub> y un 5 % de CO<sub>2</sub> en el espacio vacío a un caudal de 0,25 slpm.

##### *Cultivo por perfusión N-1 de la sucesión de inóculo*

45 Se usó un biorreactor de perfusión de vidrio de 15 l (Broadley-James Corporation, Irvine, CA) equipado con un dispositivo de perfusión ATF4 (Refine Technology, Pine Brook, NJ) para imitar la fase N-1 de la sucesión de inóculo (biorreactor de 50 l como se muestra en la figura 1). Se añadió oxígeno a través de un rociador sinterizado 20 Tm para controlar el oxígeno disuelto a un 40 % y se añadió nitrógeno a través de un rociador de orificio perforado de 1 mm para controlar el nivel de CO<sub>2</sub> disuelto por debajo de 120 mm de mercurio. El pH del cultivo del biorreactor se mantuvo por encima de 6,85 a través de la adición de carbonato de sodio 0,5 M. Se añadió una disolución antiespumante al 10 % (FoamAway, Life Technologies, Grand Island, NY) para controlar el nivel de espuma según lo necesario.

50 El biorreactor de 15 l a un volumen de trabajo de 10 l se inoculó a  $0,5 \times 10^6$  células viables/ml y el cultivo se hizo funcionar en modo discontinuo hasta el día 2, cuando se inició la perfusión. La tasa de perfusión se controló inicialmente a una tasa de perfusión específica de células (CSPR) de 0,2 nl/célula/día usando un detector de capacitancia en línea (Aber Instruments, Aberystwyth, RU) y un controlador lógico programable (DeltaV). La tasa de perfusión se limitó a 4 volúmenes de biorreactor por día (RV/día) después de que la densidad de células viables alcanzara  $20 \times 10^6$  células/ml.

*Modelo de realimentación discontinua de tubos de centrifugación de 50 ml para la evaluación de la densidad de inoculación*

Se retiró una alícuota del cultivo del biorreactor N-1 de la sucesión de inóculo cuando su densidad celular alcanzó  $25 \times 10^6$  células viables/ml,  $50 \times 10^6$  células viables/ml y  $100 \times 10^6$  células viables/ml y posteriormente se inoculó en tubos de centrifugación de 50 ml (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza) a tres densidades de inoculación diferentes por triplicado:  $0,5 \times 10^6$  células viables/ml,  $2,5 \times 10^6$  células viables/ml o  $5,0 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen de trabajo de 10 ml. Se hicieron realimentaciones una vez al día ya que la perfusión continua no podía realizarse a esta escala. Las realimentaciones se realizaron empezando en el día 1 retirando los tubos de centrifugación de la incubadora, centrifugando las células a 1100 r.p.m. durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y después añadiendo medio reciente para resuspender las células. La estrategia de realimentación se diseñó para proporcionar la misma CSPR entre diferentes condiciones de densidad de inoculación. Todos los tubos de centrifugación se mantuvieron en una incubadora de agitación Multitron II (HT Infors, Bottmingen, Suiza) a una temperatura de 37 °C, tasa de oscilación de 160 r.p.m., ángulo de oscilación de 45 grados con respecto a la mesa de trabajo, humedad relativa de un 80 % y concentración de CO<sub>2</sub> de un 5 %.

*Biorreactor de producción*

Para imitar el biorreactor de producción de 500 l mostrado en la figura 1, biorreactores de 15 l (Broadley-James Corporation, Irvine, CA) con un volumen de trabajo de 10 l se hicieron funcionar en modo de perfusión usando un dispositivo de perfusión ATF4 (Refine Technology, Pine Brook, NJ) con rociador sinterizado 20 Tm para controlar el oxígeno disuelto a un 40 % y se añadió nitrógeno a través de un rociador de orificio perforado de 1 mm para mantener el nivel de CO<sub>2</sub> disuelto por debajo de 120 mm de mercurio. El pH se mantuvo por encima de 6,85 a través de la adición de carbonato de sodio 0,5 M. Se añadió una disolución antiespumante al 10 % (FoamAway, Life Technologies, Grand Island, NY) a través de una bomba peristáltica para controlar el nivel de espuma.

Se inoculó un conjunto de biorreactores de producción a una baja densidad ( $0,5 \times 10^6$  células viables/ml) desde un recipiente de inóculo que se hizo funcionar en modo discontinuo. La perfusión se inició en el día 1 a 0,5 RV/día y se aumente diariamente en 0,5 RV/día hasta que se alcanzó una tasa de perfusión de 2 RV/día. Se inoculó otro conjunto de reactores de producción a una alta densidad ( $5,0 \times 10^6$  células viables/ml) desde un recipiente de inóculo de perfusión de 15 l N-1 cuando la densidad alcanzó  $50 \times 10^6$  células viables/ml. Debido a la alta densidad de inoculación, la perfusión se inició a 2 RV/día inmediatamente después de la inoculación. Para todos los biorreactores de producción, la densidad de células viables se controló a  $40 \times 10^6$  células viables/ml usando un detector de capacitancia en línea y bomba de purga. Todos los biorreactores de producción se hicieron funcionar durante 50 días.

*Métodos analíticos*

La densidad de células viables se determinó usando un analizador de viabilidad celular ViCell XR (Beckman Coulter, Brea, CA). Se midió el pH y el pCO<sub>2</sub> por separado usando un analizador de gases de sangre RAPIDLab (Siemens, Tarrytown, NY). La productividad de proteína se midió mediante un ensayo fotométrico de actividad enzimática patentado.

*Resultados y análisis*

La figura 3 muestra el perfil de crecimiento de la densidad de células viables del proceso encadenado de inóculo ejemplar descrito en estos ejemplos, incluyendo los cultivos de agitación discontinuos y un cultivo de perfusión N-1. Las duraciones de los cultivos de agitación de 2 l y 20 l discontinuos fueron 8 días y 5 días, respectivamente. El biorreactor de perfusión N-1 se hizo funcionar durante 12 días y alcanzó una densidad de células viables final de  $110 \times 10^6$  células viables/ml y > 98 % de viabilidad celular. La densidad de células viables alcanzó  $50 \times 10^6$  células/ml en el día 9, que es la densidad celular requerida para inocular un biorreactor de 500 l a  $5 \times 10^6$  células viables/ml (desde un biorreactor N-1 de 50 l).

Para el biorreactor N-1, la perfusión se inició en el día 2 y se controló para mantener una CSPR de 0,2 nl/célula/día usando una sonda de capacitancia en línea para aumentar automáticamente la tasa de alimentación según aumentaba la densidad celular. El éxito de esta estrategia de control de la tasa de perfusión depende de la capacidad de la sonda de capacitancia de estimar de manera precisa la densidad de células viables. Esta estrategia se usó únicamente hasta el día 7, porque la tasa de perfusión se limitó a 4 RV/día, pero la sonda pudo estimar de manera precisa la densidad durante todo el procesamiento hasta el día 12 cuando se alcanzaron  $110 \times 10^6$  células viables/ml (figura 4).

Se usó un modelo de tubo de centrifugación a pequeña escala para evaluar el impacto de la densidad celular N-1 sobre el crecimiento celular en el biorreactor de producción. Las muestras del cultivo se retiraron de un biorreactor N-1 cuando las densidades celulares estaban a  $25 \times 10^6$  células viables/ml,  $50 \times 10^6$  células viables/ml o  $100 \times 10^6$  células viables/ml, respectivamente. Estas se dividieron en tres alícuotas, se diluyeron hasta  $0,5 \times 10^6$  células viables/ml,  $2,5 \times 10^6$  células viables/ml o  $5 \times 10^6$  células viables/ml con medio reciente y después se inocularon por triplicado en tubos de centrifugación (modelado del biorreactor de producción por perfusión). No se realizaron realimentaciones diarias hasta el día 1 debido a las diluciones conseguidas cuando los cultivos se dividían hasta sus

respectivas densidades de inoculación. La tasa de realimentación se ajustó basándose en la densidad de inoculación de los tubos de centrifugación que permiten que cada condición de densidad de inoculación experimente la misma CSPR a densidades celulares correspondientes.

5 El recuento de células y los perfiles de viabilidad se muestran en las figuras 5-7 y se dibujan de modo que puedan hacerse comparaciones entre las condiciones de densidad N-1 a cada densidad de inoculación. Como la tasa de perfusión máxima en el modelo de tubo de centrifugación es 1 RV/día, hubo cultivos que crecieron solamente hasta  $20 \times 10^6$  células viables/ml para acoplar la CSPR al modelo de biorreactor de perfusión. No hubo diferencias de crecimiento observables entre las diferentes condiciones de densidad de N-1 para las tres densidades de inoculación ensayadas.

10 Para estudiar los efectos sobre la densidad de N-1 y la densidad de inoculación sobre el crecimiento celular en el biorreactor de producción y la productividad, los biorreactores se inocularon a  $5,0 \times 10^6$  células viables/ml desde un biorreactor N-1 a  $50 \times 10^6$  células viables/ml y se compararon con biorreactores inoculados a  $0,5 \times 10^6$  células viables/ml desde un biorreactor N-1 a  $2,5 \times 10^6$  células viables/ml. El crecimiento celular para ambas condiciones fue comparable como se muestra en la figura 8. La viabilidad celular permaneció por encima de un 90 % para ambas  
15 condiciones de inoculación en todo el procesamiento de 50 días. La figura 9 muestra la productividad acumulada frente a la densidad de células viables integrada e indica una tasa de producción específica similar entre las condiciones. De manera más notable, la densidad celular en estado de equilibrio de  $40 \times 10^6$  células viables/ml (figura 8) y el valor requerido para la purificación se alcanzaron 4-5 días antes para la condición de alta densidad de inoculación.

20 Los procesos encadenados de inóculo ejemplares descritos en la presente memoria tienen ventajas tanto económicas como funcionales. Por ejemplo, inocular un biorreactor de producción por perfusión de 500 l a  $5,0 \times 10^6$  células/ml reduce la duración de la fase de crecimiento en 4-5 días, aumentando la productividad en un 10 % durante un procesamiento de 50 días. Adicionalmente, los biorreactores de perfusión N-1 pudieron alcanzar  $100 \times 10^6$  células viables/ml y pudieron inocular teóricamente un biorreactor de 500 l a  $10 \times 10^6$  células viables/ml,  
25 reduciendo adicionalmente la duración de la fase de crecimiento (por ejemplo, en un total de 5-6 días).

Los procesos encadenados de inóculo ejemplares descritos en la presente memoria también pueden usarse para inocular un biorreactor de producción que se hace funcionar en modo discontinuo o semicontinuo. Para un proceso de cultivo celular semicontinuo de 21 días usando un biorreactor de 500 l, una densidad de inoculación de  $5,0 \times 10^6$  células viables/ml puede reducir la duración en el biorreactor de producción en un 25 %. Globalmente, esto pudo  
30 permitir 5-6 lotes adicionales al año, aumentando la productividad de fabricación en un 25 %-30 %.

En la mayoría de casos, los procesos discontinuos y semicontinuos típicamente usan biorreactores de producción que son mucho más grandes que los usados para procesos de perfusión, requiriendo, por tanto, varias fases encadenadas de inóculo en biorreactores de acero inoxidable de gran escala. La figura 2 muestra un ejemplo de un proceso encadenado de inóculo convencional usado para inocular un biorreactor de 10 000 l en comparación con un  
35 proceso encadenado de inóculo usando un biorreactor N-1 de 50 l con un dispositivo de perfusión de ATF. Usando los procesos encadenados de inóculo ejemplares descritos en la presente memoria, el biorreactor N-1 de 50 l a  $50\text{-}100 \times 10^6$  células viables/ml puede inocular un biorreactor de 10 000 l a  $0,25 \times 10^6$  células viables/ml hasta  $0,50 \times 10^6$  células viables/ml, eliminando, por tanto, dos fases intermedias de cultivo celular de la sucesión de inóculo.

40 Los datos descritos en este ejemplo demuestran un proceso encadenado de inóculo ejemplar que implica la formación de bancos de células HD, tecnología de biorreactor de un solo uso desechable y cultivo por perfusión en la fase de biorreactor N-1. Los procesos encadenados de inóculo reducen la complejidad de los procesos encadenados de inóculo convencionales disminuyendo el número de fases de cultivo a pequeña escala. Los datos descritos en este ejemplo muestran que el uso de cultivo por perfusión en la fase N-1 puede conseguir densidades  
45 de células viables de hasta  $100 \times 10^6$  células viables/ml en 12 días sin comprometer las características de crecimiento del cultivo después de etapas de expansión adicionales. Basándose en estos datos, los procesos encadenados de inóculo ejemplares descritos en la presente memoria pueden usarse para inocular un biorreactor de producción de 500 l a una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células viables/ml para reducir el tiempo hasta la densidad celular en estado de equilibrio en 4-5 días y proporcionar un aumento de un 10 % en la productividad global de un procesamiento de 50 días. Para procesos discontinuos o por lotes que requieren biorreactores de producción más grandes, tales como 10 000 l, los procesos encadenados de inóculo pueden eliminar 1-2 fases del proceso de expansión usando un solo biorreactor de perfusión de 50 l en la fase N-1.  
50

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de una proteína recombinante, que comprende:
- (a) disponer una pluralidad de células de mamífero recombinantes en un primer medio de cultivo comprendido dentro de un recipiente para proporcionar un primer cultivo celular;
- 5 (b) cultivar de forma discontinua el primer cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml;
- (c) disponer un volumen del primer cultivo celular de la etapa (b) en un segundo medio de cultivo comprendido dentro de un biorreactor de perfusión para proporcionar un segundo cultivo celular con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml;
- 10 (d) cultivar por perfusión el segundo cultivo celular hasta un intervalo de densidad celular entre aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $120 \times 10^6$  células/ml;
- (e) disponer un volumen del segundo cultivo celular de la etapa (d) en un tercer medio de cultivo comprendido dentro de un biorreactor de producción para proporcionar un cultivo celular de producción con una densidad celular inicial en un intervalo de aproximadamente  $0,25 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml;
- 15 (f) cultivar por perfusión el cultivo celular de producción en condiciones que permitan que las células de mamífero recombinantes secreten una proteína recombinante; y
- (g) recoger la proteína recombinante del cultivo celular de producción.
2. El método de la reivindicación 1, en el que disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en (a) para proporcionar el primer cultivo celular comprende:
- 20 descongelar un banco de células congelado; y  
disponer un volumen del banco de células descongelado en el primer medio de cultivo.
3. El método de la reivindicación 1, en el que disponer la pluralidad de células de mamífero recombinantes en (a) para proporcionar el primer medio de cultivo comprende disponer un volumen de un tercer cultivo celular que comprende la pluralidad de células de mamífero recombinantes en el primer medio de cultivo.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, que comprende, además:
- (1) disponer una pluralidad de las células de mamífero recombinantes en un cuarto medio de cultivo comprendido dentro de un recipiente para proporcionar el tercer cultivo celular;
  - (2) cultivar de forma discontinua el tercer cultivo celular en (1) hasta un intervalo de densidad celular de aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células/ml,
- 30 en el que un volumen del tercer cultivo celular en (2) se dispone en el primer medio de cultivo (a).
5. El método de la reivindicación 4, en el que disponer la pluralidad de las células de mamífero recombinantes (1) comprende:
- descongelar un banco de células congelado; y  
disponer un volumen del banco de células descongelado en el cuarto medio de cultivo.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que:
- el primer cultivo celular en (a) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 1,0 l a aproximadamente 50 l;  
el segundo cultivo celular en (c) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 5 l a aproximadamente 600 l; y/o  
el cultivo celular de producción en (e) tiene un intervalo de volumen de aproximadamente 50 l a aproximadamente 20 000 l.
- 40 7. El método de la reivindicación 1, en el que:
- el recipiente en (a) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 1,5 l a aproximadamente 100 l;  
el biorreactor de perfusión en (c) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 7,5 l a aproximadamente 1000 l; y/o  
el biorreactor de producción en (e) tiene un intervalo de volumen interno de aproximadamente 150 l a aproximadamente 25 000 l.
- 45 8. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo por perfusión en (c) se realiza usando un biorreactor de perfusión equipado con un dispositivo de filtración de flujo tangencial alterno.

9. El método de la reivindicación 1, en el que:

la densidad inicial en (e) está en un intervalo de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml; y/o  
la densidad celular inicial en (e) es al menos un 10 % de la densidad celular de producción en estado de equilibrio.

5 10. El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo por perfusión en (f) provoca que el cultivo celular de producción alcance la densidad celular de producción en estado de equilibrio en un periodo entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 10 días.

11. El método de la reivindicación 1, en el que la recogida en (g) comprende retirar el medio de cultivo del biorreactor de producción.

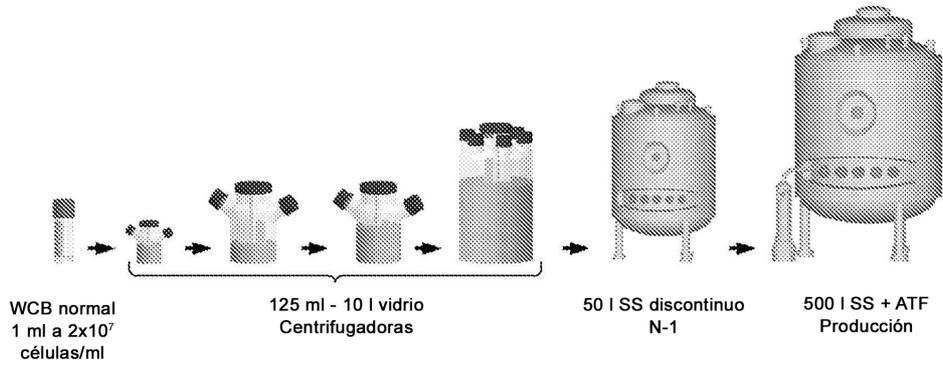
10 12. El método de la reivindicación 11, que comprende además aislar la proteína recombinante del medio de cultivo retirado.

13. El método de la reivindicación 12, en el que el aislamiento se realiza usando un proceso integrado y continuo.

14. El método de la reivindicación 13, que comprende además formular la proteína recombinante aislada en un agente farmacéutico.

15 15. El método de la reivindicación 10, en el que el cultivo por perfusión en la etapa (f) provoca que el cultivo celular de producción alcance una densidad celular de producción en estado de equilibrio en aproximadamente 2 días a aproximadamente 5 días.

Proceso encadenado de inóculo convencional:



Proceso encadenado de inóculo ejemplar proporcionado en la presente memoria:

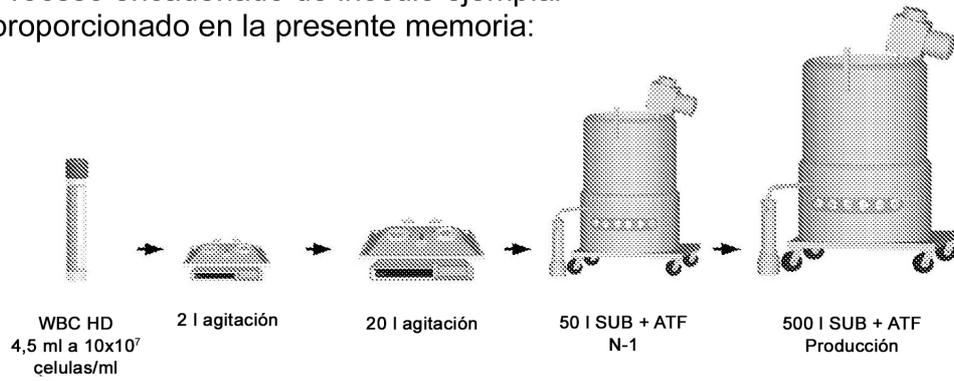
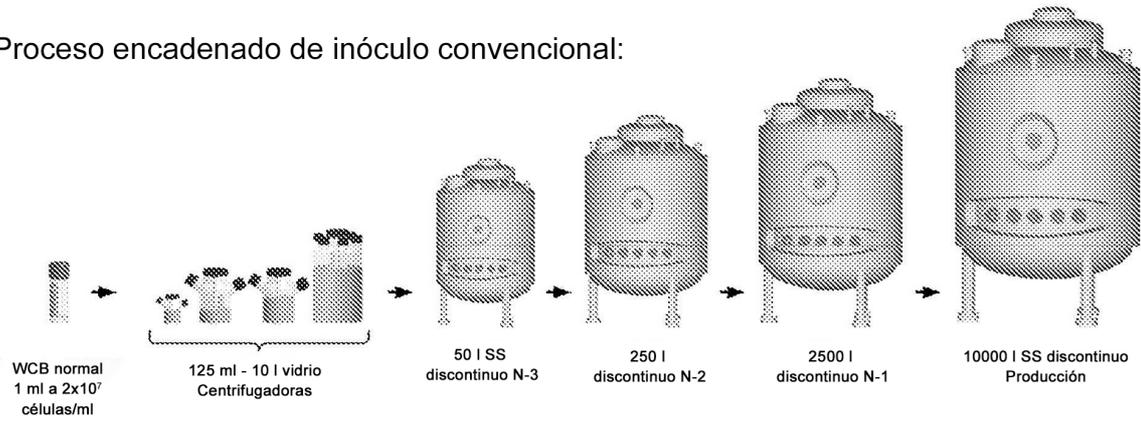


Figura 1

Proceso encadenado de inóculo convencional:



Proceso encadenado de inóculo ejemplar proporcionado en la presente memoria:



Figura 2

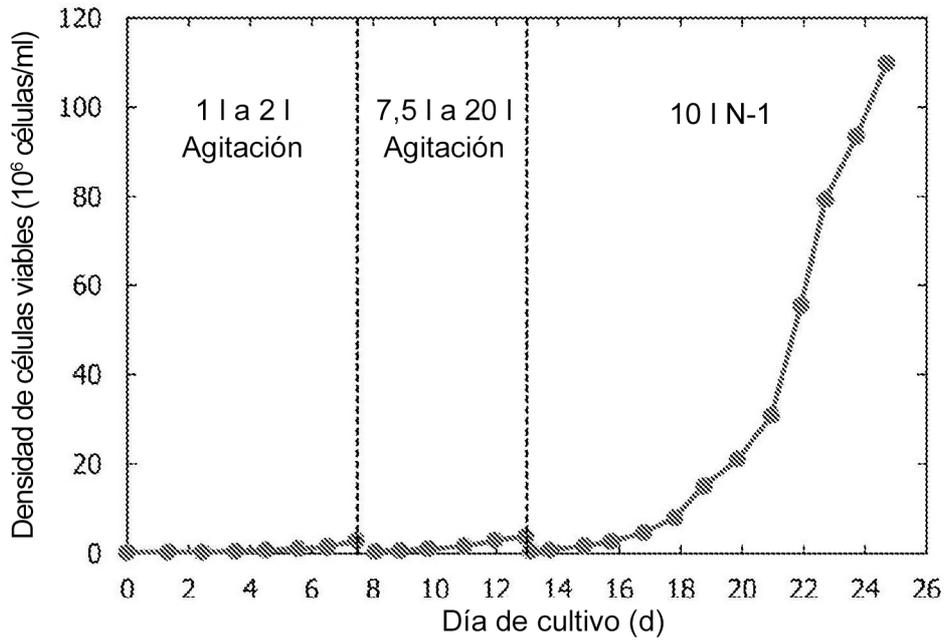


Figura 3

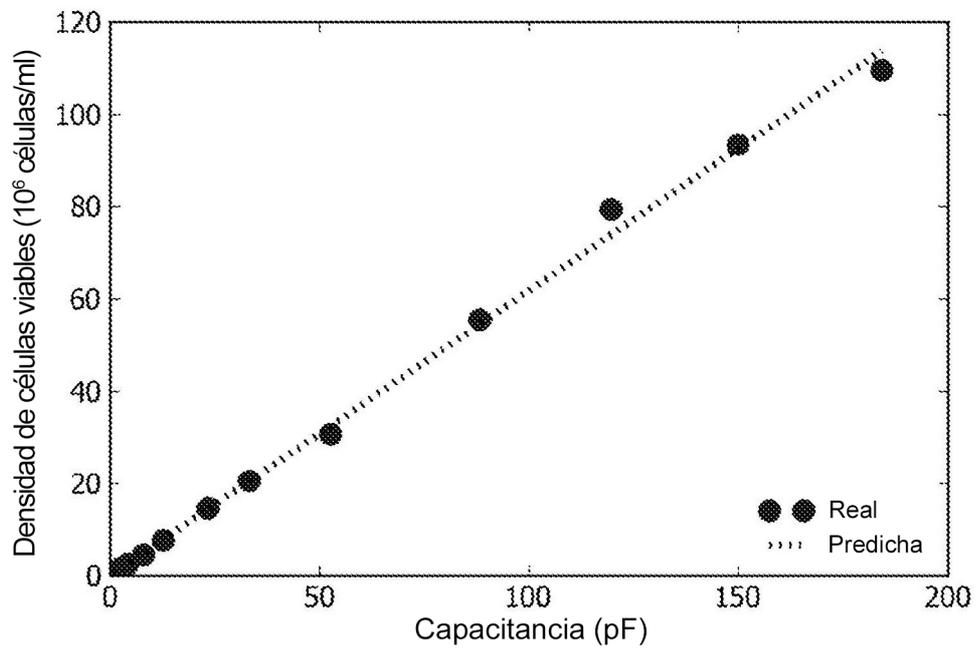


Figura 4

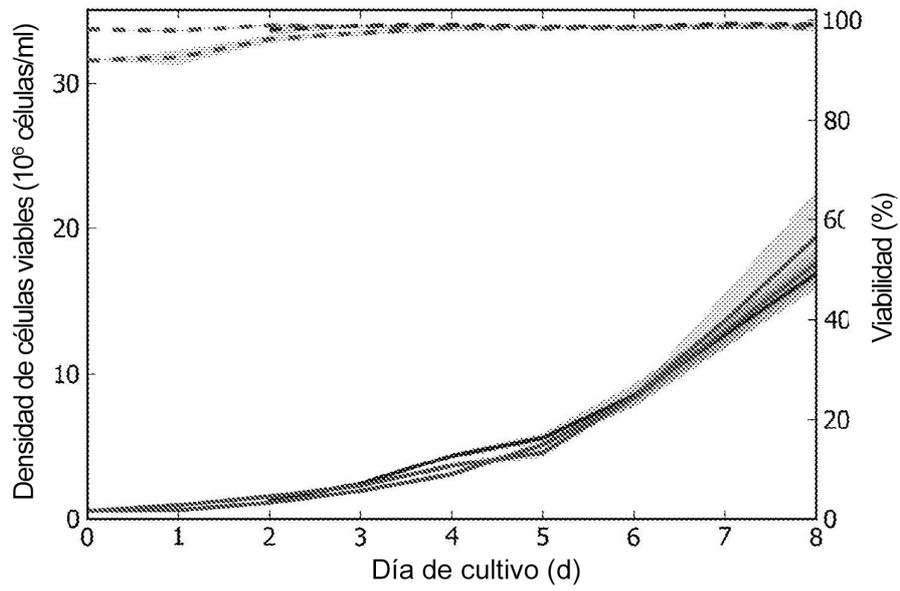


Figura 5

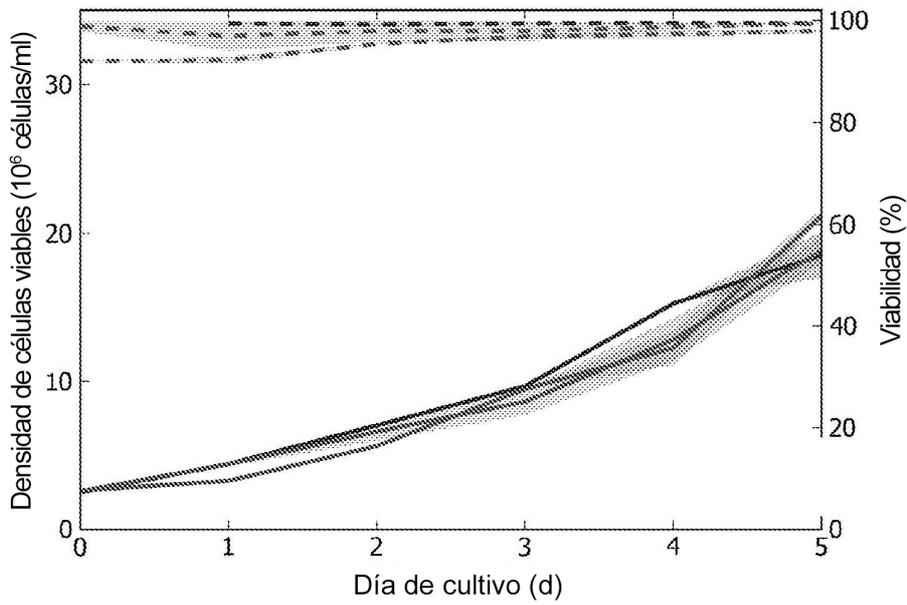


Figura 6

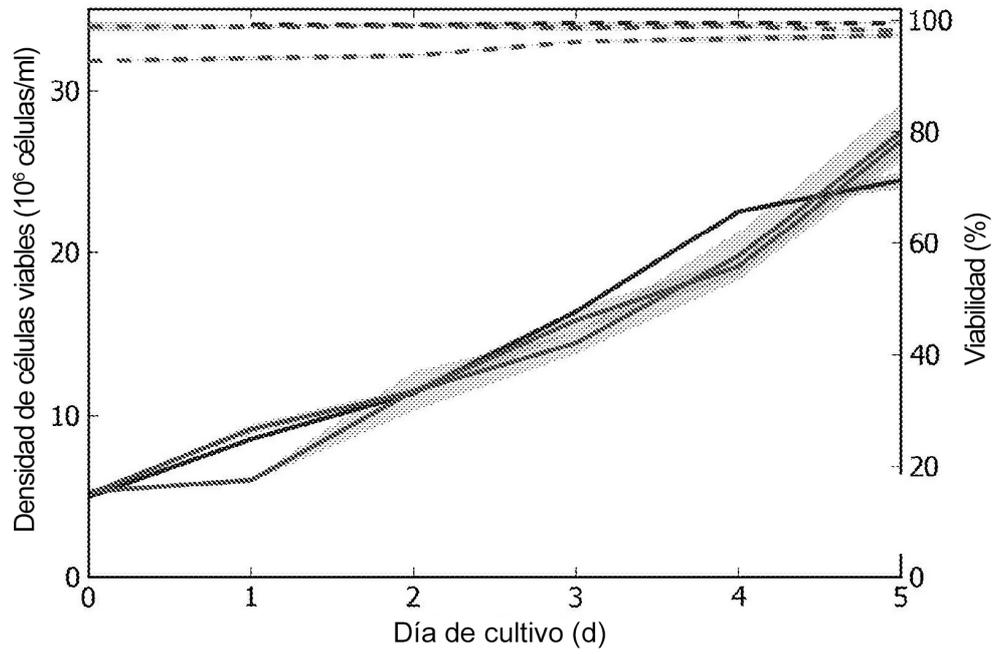


Figura 7

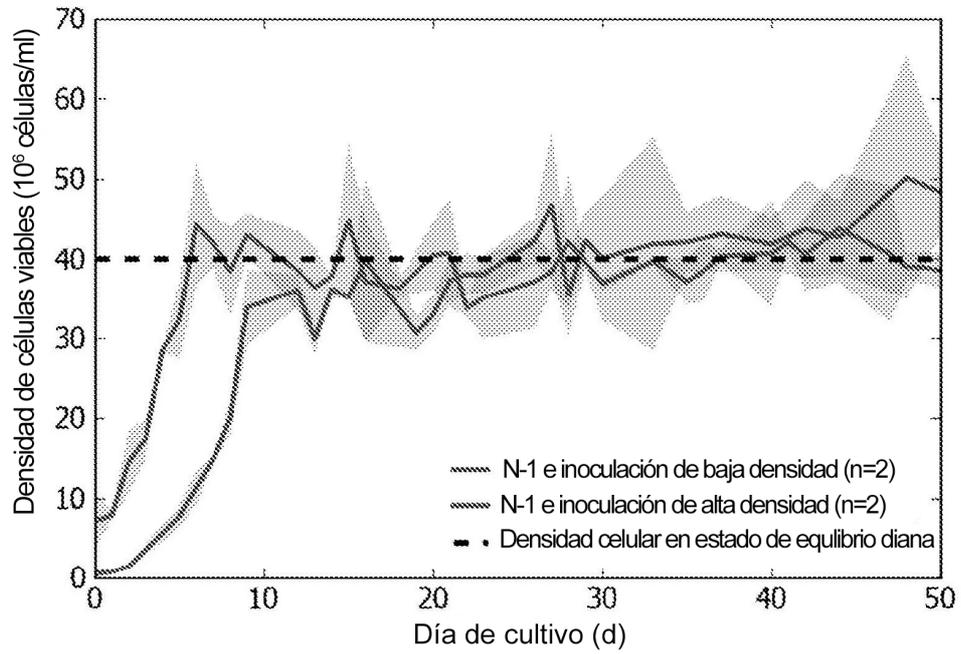


Figura 8

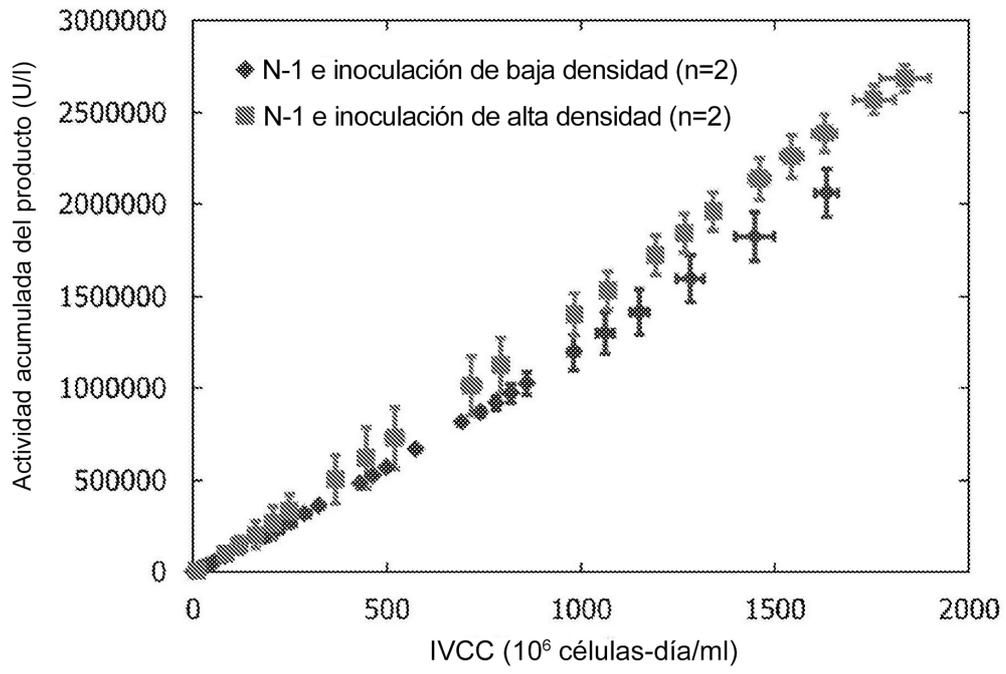


Figura 9