

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 173**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/755** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2012 PCT/EP2012/058899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 12721821 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2707387**

54 Título: **Un procedimiento para aumentar la productividad de células eucarióticas en la producción de FVIII recombinante**

30 Prioridad:

**13.05.2011 EP 11166071**

**24.05.2011 US 201161489406 P**

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

**04.08.2020**

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)**

**Seidenstrasse 2**

**8853 Lachen, CH**

72 Inventor/es:

**AIZAWA, PETER y**

**AGERKVIST, IRÈNE**

74 Agente/Representante:

**ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 777 173 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**

Un procedimiento para aumentar la productividad de células eucarióticas en la producción de FVIII recombinante

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar el rendimiento de factor VIII humano recombinante (rFVIII) durante el cultivo celular.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****10 CAMPO DE LA INVENCION**

- La presente invención proporciona procedimientos para aumentar el rendimiento en la producción de proteínas mediante células cultivadas, especialmente células de mamíferos. Específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos para preparar uno o varios productos de proteína, por ejemplo, uno o más productos de glicoproteína, en el que las características del producto de proteína se controlan mediante la manipulación del ambiente del cultivo celular para aumentar la tensión aplicada a las células.
- 15

**TÉCNICA ANTERIOR RELACIONADA**

- 20 Una gran proporción de productos biotecnológicos, ya sea que estén comercialmente disponibles o en desarrollo, son terapias de proteína. Hay una gran demanda en aumento de la producción de proteínas en cultivos celulares de mamíferos y de procedimientos mejorados relacionados con dicha producción. Dichos procedimientos mejorados se necesitan especialmente cuando se producen grandes glicoproteínas con bajos niveles de expresión celular. Una proteína como tal, el FVIII, presenta un nivel de expresión al menos de dos a tres órdenes más bajo que otras proteínas recombinantes producidas en células de mamíferos. Un problema comúnmente encontrado en el desarrollo de fase
- 25 tardía de la producción de proteínas terapéuticas a gran escala es aumentar la demanda debido a exámenes clínicos y contaminaciones de mayor tamaño en la planta de producción de cultivos celulares, lo que reduce la capacidad. Para cumplir con el aumento de demanda, el nivel de producción total se puede aumentar de varias maneras. Sin embargo, la mayoría de ellas, como hallar un mejor clon celular o mejorar el medio de cultivo, son tareas muy tediosas y, por lo tanto, a menudo no son opciones suficientemente rápidas. Otras maneras de aumentar la productividad es incrementar la escala de producción o la densidad de las células en un cultivo de lote alimentado o uno de modo perfusión. También, estos cambios al procedimiento están acompañados por grandes costos de inversión y, para el caso de cultivos de alta densidad, la limitación del oxígeno en el tanque de cultivo generalmente establecerá un límite para la densidad celular máxima que es posible usar para la producción. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de
- 30 nuevos procedimientos para incrementar la productividad.
- 35

- Keane J.T. y *col.* Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells; *Biotechnology and Bioengineering*, 81:211- 220, 2003, sometieron células CHO unidas a una fuerza de cizalla por 32 h y monitorearon tanto la producción de la hormona de crecimiento humano recombinante como el metabolismo de la
- 40 glucosa. Observaron que, al aumentar la fuerza de cizalla de 0,005 N/m<sup>2</sup> (0,02 W/m<sup>3</sup>) a 0,80 N/m<sup>2</sup> (6,4 x 10<sup>2</sup> W/m<sup>3</sup>), la velocidad de producción de proteína recombinante se reducía en un 51 %, la velocidad de absorción de la glucosa aumentaba en un 42 % y la producción de lactado disminuía en un 50 %.

- Godoy-Silva R. y *col.* Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress; *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 103, Número 6, 15 de agosto de 2009, examinaron el efecto de la tensión hidrodinámica repetitiva en células CHO y llegaron a la conclusión de que la velocidad de disipación de energía hasta 6,4 x 10<sup>6</sup> W/m<sup>3</sup> no afectaba el crecimiento, la muerte y la productividad de las células.
- 45

- J.A. Frangos y *col.* Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism; *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 32, Páginas 1053-1060(1988) describe un aparato de flujo para el estudio de la respuesta metabólica de células dependientes del anclaje para un amplio intervalo de tensiones de cizalla pulsátiles y estables bajo condiciones controladas por pocillo. Los datos demuestran que los niveles fisiológicos de la tensión de cizalla estable y la aparición de la tensión de cizalla estimulan dramáticamente la producción de prostaciclina en células endoteliales humanas cultivadas.
- 50

- Giard y sus colaboradores observaron que los fibroblastos humanos secretan cantidades hasta 30 veces mayores de interferón cuando se mantienen en un microportador en frascos de centrifugadora, en comparación con las células en botellas rotatorias (D.J. Giard, D. H. Loeb, W. G. Thilly, D. 1. C. Wang y D.W. Levine, *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 433(1979)). Como las tensiones de cizalla a las que las células están expuestas en los frascos de la centrifugadora son mucho más altas que aquellas en las botellas rotatorias, el aumento en la producción puede atribuirse a la estimulación inducida por cizalla de la síntesis de interferón.
- 55
- 60

Timm Tanzeglock y col., Induction of mammalian cell death by simple shear and extensional flows; *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 104, Número 2, 1 de octubre de 2009, describe si el tipo de flujo de cizalla, al que se exponen las células, influencia el inicio de la muerte celular. Se muestra que las células de mamíferos, en efecto, distinguen entre tipos discretos de flujo y responden de manera diferente. Se emplearon dos dispositivos de flujo a fin de imponer campos de flujo hidrodinámico exacto: un flujo de cizalla simple estable y uniforme y un flujo extensional oscilatorio. Para distinguir entre la muerte celular necrótica y apoptótica, se usaron tanto la clasificación de células activadas por fluorescencia como la liberación de ADN en el sobrenadante del cultivo. Los resultados muestran que los ovarios de hámsteres chinos y las células renales embrionarias humanas entrarán a la ruta apoptótica al estar sujetos a bajos niveles de tensión hidrodinámica (alrededor de 2 Pa) en un flujo extensional oscilatorio. A diferencia de esto, la muerte necrótica prevalece cuando las células están expuestas a tensiones hidrodinámicas alrededor de 1 Pa en un flujo de cizalla simple o alrededor de 500 Pa en el flujo extensional. Estos valores de umbral, en los cuales las células entran a la ruta respectiva de muerte, deben evitarse al hacer cultivos celulares en búsqueda de la producción de proteínas recombinantes, a fin de mejorar la longevidad y la productividad del cultivo.

15 El documento WO 2006/103258A1 describe un procedimiento para aumentar el rendimiento de una proteína producida mediante el cultivo de células eucarióticas y la adición de una sustancia iónica al medio de cultivo antes de cosechar la proteína. Las sustancias iónicas adecuadas son sales de la serie Hofmeister y aminoácidos.

20 El documento WO 2008/006494A1 describe un procedimiento para el cultivo de células, preferentemente células HER immortalizadas, más preferentemente células PER.C6 en un reactor en suspensión en un medio de cultivo celular, en el que las células producen una sustancia biológica, preferentemente un anticuerpo, en el que al menos un componente del medio de cultivo celular se alimenta al cultivo celular y en el que el cultivo celular que comprende las células, la sustancia biológica y el medio de cultivo celular se hace circular por un sistema de separación y en el que el sistema de separación separa la sustancia biológica de las sustancias que presentan un peso molecular menor que el de la sustancia biológica, y en el que la sustancia biológica se retiene o es alimentada de regreso dentro del reactor. Preferentemente, parte de las sustancias de peso molecular más bajo se elimina constantemente del cultivo celular.

30 Zhang, Hu y col. informan, en *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Volumen 11, Número 1, enero de 2010, páginas 103-112(10), que el cultivo de células de mamíferos desempeña un gran papel en la producción de terapias de proteínas en las últimas décadas. Muchos parámetros de ingeniería se consideran para la optimización durante el desarrollo del procedimiento en el cultivo de células de mamíferos, pero solo la cizalla y la mezcla se resaltan especialmente en este papel. Se cree que la tensión de cizalla debido a la agitación ha sido sobrestimada en cuanto al daño que causa a las células, pero la cizalla puede resultar en respuestas fisiológicas no letales. No hay daño celular en las regiones donde se forman, se rompen y se unen las burbujas, pero la tensión de cizalla se vuelve significativa de la despertar de la elevación de burbujas y provoca un gran daño a las células en las regiones donde estallan las burbujas. Para proporcionar una tensión de oxígeno disuelto, pH, CO<sub>2</sub> y nutrientes en los biorreactores a gran escala, no es suficiente con mezclar, lo que puede traer graves problemas para el crecimiento celular, la formación del producto y el control del procedimiento. Los reactores de reducción han sido desarrollados para abordar los problemas de mezcla y cizalla para operaciones paralelas. La caracterización de ingeniería en los biorreactores convencionales y de reducción recientemente desarrollados ha sido presentada de manera breve. Se exploran desafíos de procedimiento para el cultivo de líneas celulares industriales en altas densidades celulares, así como también el cultivo de células madre y otras células humanas para la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos y la terapia génica. Técnicas importantes, como la micromanipulación y la nanomanipulación (pinzas ópticas) para el análisis de células individuales, la dinámica de fluido computacional (CFD, por sus siglas en inglés) para la caracterización de cizalla y mezcla, y los biorreactores en miniatura, se están desarrollando a fin de abordar esos desafíos. Timothy A. Barret y col., en *Biotechnology and Bioengineering*, Volumen 105, Número 2, páginas 260-275, informan sobre la experimentación en formatos de microplaca agitada que ofrecen una tecnología de plataforma potencial para la evaluación rápida y la optimización de las condiciones de cultivo celular. Se describe una caracterización de ingeniería detallada de mezcla líquida y transferencia de masa de gas-líquido en sistemas de micropocillos y su impacto sobre los cultivos celulares de suspensión.

55 Quedando entendido que la cinética de la producción de anticuerpos y el crecimiento celular son comparables a aquellas que se encuentran en los sistemas de frascos de agitación actualmente usados, entonces el enfoque de micropocillos ofrece la posibilidad de obtener datos de diseño de procedimientos tempranos mucho más costo-efectivamente y con una reducción en los requerimientos materiales. Este trabajo describe una caracterización de ingeniería detallada de mezcla líquida y transferencia de masa de gas-líquido en sistemas de micropocillos y su impacto sobre los cultivos celulares de suspensión. Para el crecimiento de células de hibridomas murinos que producen IgG1, las placas de 24 pocillos han sido caracterizadas en términos de disipación de energía (P/V) (a través de la Dinámica de fluidos computacional o CFD, por sus siglas en inglés), flujo de fluido, velocidad de mezcla y transferencia de oxígeno como una función de la frecuencia de agitación y volumen de relleno de líquido. Los valores de  $k_L a$  variaron entre 1,3 y 29 h<sup>-1</sup>; el tiempo de mezcla de fase líquida, cuantificado usando experimentos de decoloración con yodo, varió de 1,7 a 3,5 h; mientras que el P/V predicho osciló de 5 a 35 W m<sup>-3</sup>. Las simulaciones de

CFD de la velocidad de cizalla predijeron que las fuerzas hidrodinámicas no serán perjudiciales para las células. Sin embargo, para los cultivos de hibridomas, se mostró que las altas velocidades de agitación (> 250 rpm) tenían un impacto negativo sobre el crecimiento celular, mientras que una combinación de la baja velocidad de agitación y el alto volumen de relleno de pocillos (120 rpm; 2 000 µL) resultaban en condiciones limitadas de oxígeno. En base a estos hallazgos, una primera comparación de ingeniería de la cinética del cultivo celular en formatos de micropocillo y frascos de agitación se realizó a velocidades de disipación de energía promedio y correspondientes. Se halló que la cinética del crecimiento celular y el título de anticuerpos eran similares en las placas de microtitulación de 24 pocillos y los frascos de agitación de 250 mL. En general, este trabajo ha demostrado que el cultivo celular efectuado en placas de micropocillos agitadas puede proporcionar datos que son tanto reproducibles como comparables para los sistemas de frascos de agitación actualmente usados, mientras que ofrece una disminución de al menos 30 veces en la escala de operación y los requerimientos materiales. Al enlazarlo con la automatización, esto proporciona una ruta hacia la evaluación de alta capacidad de líneas celulares fuertes bajo condiciones de cultivo de suspensión realistas.

William G. Whitford y John S. Cadwell, en *BioProcess International* 2009, Volumen 7, Número 9, páginas 54-64 informan sobre un interés creciente en los biorreactores de perfusión de fibra hueca.

El documento de los EE. UU. 2008/131934 A1 describe procedimientos para cultivar células mediante perfusión continua.

Perez y *col.*, en *Chemical Engineering Journal* 124 (2006) 1-5, describen un análisis teórico riguroso que resume los parámetros relevantes para el cálculo de la tensión de cizalla en sistemas de cultivo celular agitado y muestran que, para las ecuaciones de fluidos newtonianos, por razonamiento teórico, concuerdan de manera excelente con la técnica empírica establecida hace tiempo.

Kolind y *col.* en *Journal of Biotechnology* 151 (2011), 357-362 describe un procedimiento para aumentar el rendimiento de FVIII en un cultivo celular usando células HEK293 mediante la liberación de FVIII ligado a la membrana en el medio.

#### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención era proporcionar un procedimiento para aumentar la productividad, en particular, la productividad específica de las células, de factor VIII recombinante (rFVIII), en particular, rFVIII humano producido en una suspensión celular eucariótica durante el cultivo de dicha suspensión celular eucariótica en un medio de cultivo que contiene no más de 500 µM CaCl<sub>2</sub>, al menos un detergente no iónico y otros componentes nutritivos necesarios para que las células crezcan y produzcan rFVIII, caracterizado porque dicha suspensión celular es una suspensión de células humanas y se cultiva en condiciones que inducen una tensión de cizalla a través de medios mecánicos directamente a la suspensión de células humanas. La tensión de cizalla se logra adicionando una densidad de potencia de 50 W/m<sup>3</sup> a 1000 W/m<sup>3</sup> a la suspensión celular. Las condiciones que inducen una tensión de cizalla son eventos, los cuales inducen movimientos mecánicos de la suspensión celular o las células en la suspensión. Típicamente, la tensión de cizalla se aplica directamente a las células cultivadas. Los medios mecánicos son, en particular, aquellos que son capaces de agitar la suspensión del cultivo celular.

Si bien los efectos de la presente invención han sido investigados con HEK293, estas células son células humanas típicas y el experto en la materia espera que los resultados obtenidos con las células HEK293 también se logren con otras células de líneas celulares humanas.

La entrada de potencia (la densidad de potencia que es un término equivalente a la velocidad de disipación de energía,  $\epsilon$ ) introducida por los medios mecánicos se calcula según la siguiente fórmula:  $\epsilon = N_p \cdot n^3 \cdot d_i^5 / V$  donde  $N_p$  es el número de potencia turbulenta para el impulsor,  $n$  es la velocidad de agitación medida como las revoluciones del impulsor por segundo,  $d_i$  es el diámetro del impulsor medido en metros y  $V$  es el volumen del cultivo en metros cúbicos. La potencia adicionada directamente a la suspensión celular para introducir la tensión de cizalla no debería exceder un valor donde las células son destruidas.

En una realización de la invención, se introduce potencia mediante un movimiento mecánico de la suspensión celular. En una realización adicional de la invención, el movimiento mecánico de la suspensión celular se efectúa por medio del bombeo de la suspensión celular a través de una membrana de filtración tangencial, como una membrana de fibra hueca o el movimiento mecánico de la suspensión celular se efectúa por medio de un elemento rotatorio, como un agitador, un propulsor o un impulsor.

En particular, el rFVIII es un rFVIII con dominio B eliminado, en particular, un FVIII humano con dominio B eliminado.

En incluso otra realización de la invención, las células eucarióticas son células HEK293. La molécula rFVIII se produce particularmente en y se acumula sobre la superficie de las células HEK293. Para aislar el rFVIII, podría ser ventajoso

emplear condiciones para liberar el rFVIII desde las superficies celulares, por ejemplo, mediante el aumento de la fortaleza iónica del medio que rodea las células u otros medios para debilitar las fuerzas de atracción de las superficies celulares de HEK293 y el rFVIII.

5 En incluso otra realización de la invención, los detergentes no iónicos se seleccionan de entre Pluronic-F68, Tween 20 y Tween 80. Típicamente, los detergentes no iónicos presentan una concentración de 0,00001 a 1 % en peso, en particular, de 0,0001 a 0,1 % en peso y, más adecuadamente, de 0,001 a 0,01 % en peso.

10 En otra realización del procedimiento de la invención, una concentración baja de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo se ajusta para controlar la agregación celular, por ejemplo, para minimizar la agregación celular.

Según la invención, la potencia se puede introducir dentro de la suspensión celular en virtud de un movimiento mecánico de la suspensión celular. El movimiento mecánico de la suspensión celular puede efectuarse, por ejemplo, por medio de un agitador o un análogo mecánico respectivo como un dispositivo de agitación.

15 En una realización particular de la invención, la entrada de densidad de potencia, por ejemplo, adicionada debido al movimiento mecánico de origen de la suspensión celular, se inicia mediante un contenedor de cultivo equipado con un impulsor o la tensión de cizalla en el contenedor de suspensión celular se induce mediante el bombeo de la suspensión celular a través de un mezclador estático o un dispositivo de filtro.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Perfiles de densidad celular viable.

25 Figura 2: Perfiles de FVIII:C acumulado.

Figura 3: Tasa de crecimiento específico de células.

Figura 4: Productividad específica de células en un cultivo continuo ejecutado a diferentes velocidades de agitación.

30 Figura 5: Productividad específica de células en un cultivo continuo comparando la centrifugadora continua con el dispositivo de fibra hueca de ATF.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 En el procedimiento de la invención, se aplica una mayor energía mecánica mediante la introducción de una mayor potencia al recipiente de cultivo que contiene la suspensión celular eucariótica que crece y produce rFVIII en comparación con los procedimientos convencionales. La cantidad de potencia se puede determinar en términos de disipación de energía, aunque es posible correlacionar otros parámetros con la entrada de potencia. La invención se basa en el resultado de una productividad de FVIII excepcionalmente alta cuando las células se agitan a altas velocidades de agitación en una botella de agitación o en un biorreactor de tanque agitado.

40 Según la invención, es posible usar cualquier célula o línea celular humana, en particular, las células humanas son células HEK293. Las células humanas genéticamente manipuladas producen rFVIII, en particular, rFVIII con un dominio B eliminado, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO- A-2001/070968 y WO-A-2007/003582.

La combinación de la fabricación de la molécula rFVIII en las células HEK293 es una realización particular del procedimiento de la invención y se explica adicionalmente en los ejemplos a continuación en esta invención.

50 En el procedimiento de la invención, se ha mostrado que las moléculas rFVIII producidas en células HEK293 se asocian a las células y se adhieren a la superficie de la célula después de ser producidas dentro de las células, como se describe adicionalmente en el documento WO-A- 2006/103258, Kolind 2010 (Kolind y col., The B-domain of Factor VIII reduces cell membrane attachment to host cells under serum free conditions. *Journal of Biotechnology*, 147 (2010), 198-204.) y Kolind 2011 (Kolind y col., Optimisation of the Factor VIII yield in mammalian cell cultures by reducing the membrane bound fraction. *Journal of Biotechnology*, 151 (2011), 357-362.).

55 En el procedimiento de la invención, el medio de cultivo para el crecimiento de las células y la producción del rFVIII contiene detergentes no iónicos. Típicamente, un derivado de polioxietileno de monolaurato de sorbitán, como Tween®, que es una familia de muchos productos distinguidos por la longitud de la cadena de polioxietileno y la fracción de éster de ácido graso. Otros detergentes no iónicos útiles son los Poloxámeros, que son copolímeros tribloque no iónicos compuestos de una cadena hidrofóbica central de polioxipropileno (óxido de (poli)propileno) flanqueadas por dos cadenas hidrofílicas de polioxietileno (óxido de (poli)etileno). Los poloxámeros también son

conocidos por el nombre comercial Pluronic®. Los detergentes no iónicos pueden seleccionarse de entre Pluron- ic-F68, Tween 20 y Tween 80, en particular, en una concentración de 0,00001 a 1 % en peso, o de 0,0001 a 0,1 % en peso, o de 0,001 a 0,01 % en peso.

5 A continuación, se describe el procedimiento de la invención con más detalles. Las células se cultivaron a diferentes frecuencias del agitador en botellas E tamponadas de 125 mL. Mientras que los perfiles de crecimiento celular eran similares en los cultivos de agitación baja y alta (Figura 1), la productividad acumulada fue sorprendentemente mayor en un 83 % en los cultivos de agitación alta, después de 3 días de cultivación en lotes (Figura 2).

10 Otra realización de la invención se efectuó en cultivos de lotes alimentados en biorreactores de tanque agitado paralelos y controlados. El cultivo, que ha estado expuesto a una mayor tensión mecánica, mostró una mayor productividad en comparación con los cultivos de baja agitación. Esto mostró que, si bien otros parámetros de cultivo, como el pH, la tensión de oxígeno disuelto (DOT, por sus siglas en inglés) y la temperatura se mantienen constantes, la agitación más alta es la que causa el aumento en la productividad.

15 En incluso otra realización, la invención se examinó de manera experimental en un cultivo de modo perfusión en un biorreactor de tanque agitado de 2 l. El cultivo se ejecutó en modo perfusión de estado estable, con las células humanas con un crecimiento exponencial mantenidas en la densidad celular deseada mediante la purga de las células desde el reactor en una velocidad que mantenía la densidad celular en el reactor constante. Mientras que otros  
20 parámetros de cultivo se mantuvieron constantes, la velocidad de agitación más alta aumentó la productividad específica de las células.

En incluso otra realización, la invención se examinó experimentalmente en un biorreactor de escala de producción de 100 L que se ejecutó en modo perfusión, a fin de lograr densidades celulares más altas. El experimento confirma que  
25 el aumento de productividad puede lograrse también en cultivos a gran escala mediante el incremento de las fuerzas de cizalla y la entrada de energía mediante el aumento de la agitación.

En incluso otra realización, la invención se examinó experimentalmente en un biorreactor de tanque agitado de 2 L, que se ejecutó en modo perfusión con, ya sea, una centrifugadora continua o una unidad de fibra hueca con un flujo tangencial alternativo (ATF, por sus siglas en inglés). Sorprendentemente, se mostró que el aumento de cizalla, que  
30 se adiciona al cultivo mediante la unidad de ATF, también incrementa la productividad de FVIII.

## EJEMPLOS

### 35 Ejemplo 1

Las células HEK293F de crecimiento exponencial que producían FVIII recombinante con el dominio B eliminado (BDDrFVIII) se centrifugaron y, posteriormente, la pastilla de células se suspendió nuevamente en un medio de cultivo celular libre de suero para una densidad celular viable de  $0,5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente, las células se cultivaron  
40 en botellas de Erlenmeyer tamponadas de 125 mL, a 100 o 200 rpm en incubadores de agitador, en una superposición de CO<sub>2</sub>/aire del 5 %/95 % a 37°C. La densidad celular se midió en todos los cultivos cada día mediante el procedimiento de exclusión de azul de tripano con el contador celular automático Cedex (Innovatis). El FVIII acumulado se liberó desde las células mediante el incremento de la concentración iónica en la suspensión celular a 1 M NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>. Las células se eliminaron mediante centrifugación y el FVIII se determinó mediante el procedimiento de  
45 sustrato cromogénico (Coatest® SP FVIII). Los perfiles de crecimiento fueron similares (Figura 1) mientras que los cultivos de alta agitación mostraron una concentración de FVIII:C acumulado 83 % más alta después de 3 días de cultivo en lotes (Figura 2).

### Ejemplo 2

50 Las células HEK293F que producen BDDrFVIII se cultivaron en paralelo en modo lote a diferentes velocidades de agitación en un equipo con seis biorreactores 0,4 L (Multifors, Infors). El objetivo era examinar de qué manera la velocidad de agitación afecta la productividad en un ambiente controlado donde los otros parámetros de cultivo celular se mantienen constantes. A fin de poder examinar las altas velocidades de agitación (>300 rpm), los motores del  
55 agitador eléctrico del biorreactor, normalmente usados para las aplicaciones de cultivos celulares, se intercambiaron por motores de agitadores más potentes, normalmente usados para aplicaciones de cultivos bacterianos, los cuales podrían ejecutarse hasta a 1200 rpm. El valor de referencia de la tensión de oxígeno disuelto (DOT) se estableció al 90 % y se reguló con adición de aire a partir de una piedra burbujeadora en la suspensión celular. La densidad celular viable, la viabilidad y la velocidad agregada se midieron con el contador celular Cedex (Innovatis). El FVIII acumulado  
60 se liberó desde las células mediante el incremento de la concentración iónica en la suspensión celular a 1 M NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>. Las células se eliminaron mediante centrifugación y el FVIII se determinó mediante el procedimiento de sustrato cromogénico (Coatest® SP FVIII). Las velocidades de agitación examinadas, de disipación de energía, que

es un término equivalente a la densidad de potencia ( $\epsilon$ ), como se usa en esta invención, la velocidad y la productividad específica de células (qp) se muestran en la Tabla 1. El aumento en la velocidad de agitación entre 200 hasta 950 rpm mostró un incremento en la productividad específica de las células. El aumento de productividad se estabilizó arriba de 950 rpm, como se observa mediante un qp inferior a 1200 rpm, en comparación con las 950 rpm.

5

Tabla 1

Velocidad de agitación [rpm]	$\epsilon$ [W/m <sup>3</sup> ]	qp [UI/1E6 células/día]
200	3	0,83
450	33	1,27
700	125	1,9
950	267	2,45
1200	632	2,14

### Ejemplo 3

10

Las células HEK293F que producen BDDrFVIII se cultivaron en un cultivo de perfusión en estado estable y continuo, en un biorreactor de tanque agitado de 2 L. El biorreactor usa un impulsor de paleta de 90 mm inclinada para lograr la agitación. El intercambio de medio se logró mediante el uso de un filtro de fibra hueca, que también crea cizalla para la suspensión celular. Todos los parámetros del cultivo celular, excepto por la velocidad de agitación, se mantuvieron constantes durante el experimento. La densidad celular viable, la viabilidad y la velocidad agregada se midieron con el contador celular Cedex (Innovatis). El FVIII acumulado se liberó desde las células mediante el incremento de la concentración iónica en la suspensión celular a 1 M NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>. Las células se eliminaron mediante centrifugación y el FVIII se determinó mediante el procedimiento de sustrato cromogénico (Coatest® SP FVIII). Las velocidades de agitación examinadas fueron de 185; 255 y 325 rpm, lo que adiciona 113, 210 y 610 W/m<sup>3</sup> de potencia al cultivo, respectivamente. La velocidad de agitación no afectó la velocidad de crecimiento específica de las células (Figura 3). Sin embargo, el aumento en la velocidad de agitación incrementó la productividad específica de las células (Figura 4).

15

20

### Ejemplo comparativo 4

25

Las células HEK293F que producen BDDrFVIII se cultivaron en 15 lotes diferentes de biorreactor de tanque agitado de escala de producción de 100 L, dos de ellos usando una baja velocidad de disipación de energía (6 W/m<sup>3</sup>) como control y 13 con una alta velocidad de disipación de energía (29 W/m<sup>3</sup>), a fin de estudiar el efecto del aumento de fuerzas de cizalla. El valor promedio de densidad celular fue de 29,2 10<sup>6</sup> células/mL en los dos lotes de baja energía y de 27,6 10<sup>6</sup> células/mL en los 13 lotes de alta energía. El biorreactor usa un impulsor de paleta de 225 mm inclinada para lograr la agitación. El intercambio de medio se logró mediante el uso de una centrifugadora continua. La densidad celular viable y la viabilidad se midieron con el contador celular Cedex (Innovatis). El FVIII acumulado se liberó desde las células mediante el incremento de la concentración iónica en la suspensión celular a 0,3 M NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>. Las células se eliminaron mediante centrifugación y el FVIII se determinó mediante el procedimiento de sustrato cromogénico (Coatest® SP FVIII). Las velocidades de agitación examinadas fueron de 45 y 75 rpm, lo que adiciona 6 y 29 W/m<sup>3</sup> de energía al cultivo, respectivamente. El experimento mostró que, al aumentar la entrada de energía (la velocidad de disipación de energía,  $\epsilon$ ) al cultivo mediante el incremento de la velocidad de agitación, aumentaba la productividad (Tabla 2). En conclusión, fue posible lograr un aumento de productividad mediante el incremento de las fuerzas de cizalla también en cultivos de producción a gran escala, de la misma manera que se observa en los cultivos de pequeña escala.

30

35

40

Tabla 2.

Velocidad de agitación [rpm]	$\epsilon$ [W/m <sup>3</sup> ]	FVIII:C acumulado. Valor promedio [UI/mL]
45	6	45 (n = 2)
75	29	59 (n = 13)

### 45 Ejemplo 5

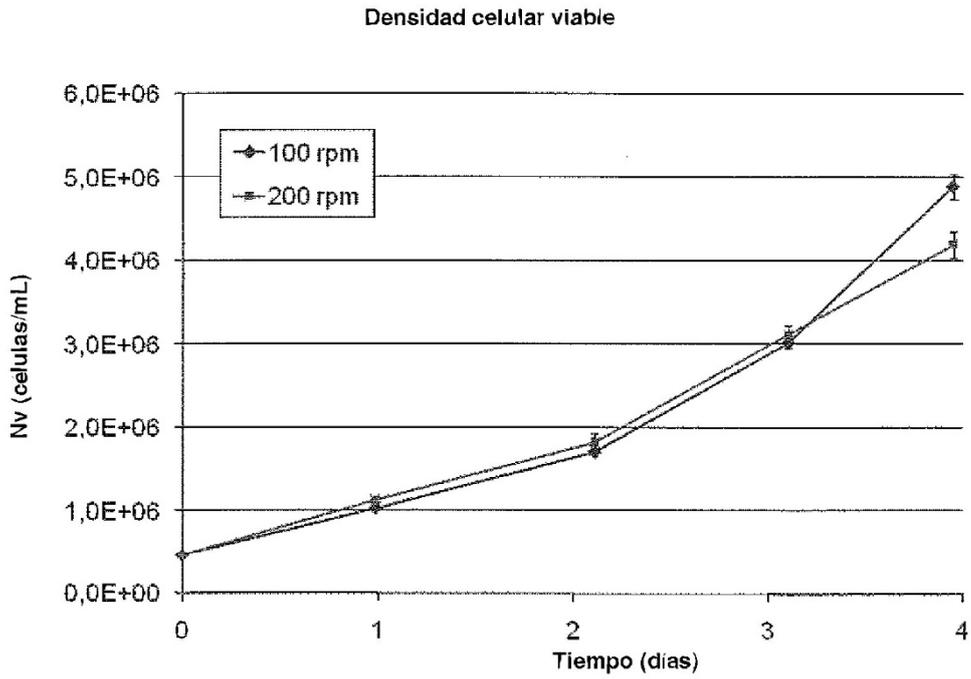
Las células HEK293F que producen BDDrFVIII se cultivaron en modo perfusión en biorreactores de tanque agitado de 2 L, agitados constantemente a 185 rpm con un impulsor de paleta de 90 mm inclinada a 45°. El modo normal de operación para el biorreactor fue usar una centrifugadora continua para lograr el intercambio de medio mediante la perfusión. En comparación, se usó una unidad de fibra hueca para lograr la perfusión mediante el intercambio de

50

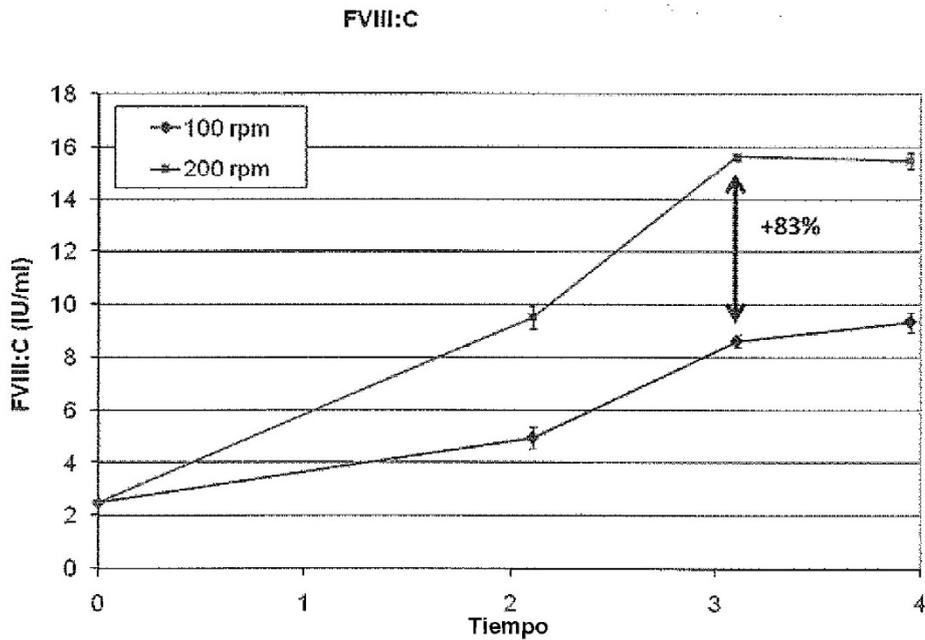
medio. La unidad de fibra hueca se ejecutó mediante el flujo tangencial alternativo, lo que significa que las células se bombean dentro y fuera a la membrana del filtro, lo cual adiciona continuamente fuerzas de cizalla al cultivo celular. Los otros parámetros de cultivo celular, como la velocidad de agitación, el pH, la tensión de oxígeno disuelto y la temperatura se mantienen constantes, en los mismos valores en ambos cultivos. Sorprendentemente, se descubrió que, si las fuerzas de cizalla se incrementan mediante un aumento en la entrada de energía al cultivo por medio del uso de una membrana de fibra hueca para lograr fuerzas de cizalla, la velocidad de producción de FVIII específico de las células puede aumentarse de manera significativa (Figura 5). El FVIII acumulado se liberó desde las células mediante el incremento de la concentración iónica en la suspensión celular a 1 M NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>. Las células se eliminaron mediante centrifugación y el FVIII se determinó mediante el procedimiento de sustrato cromogénico (Coatest® SP FVIII).

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para aumentar la productividad, en particular, la productividad específica de las células, de factor VIII recombinante (rFVIII) producido en una suspensión celular eucariótica durante el cultivo de dicha  
5 suspensión celular eucariótica en un medio de cultivo que contiene no más de 500  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , al menos un detergente no iónico y otros componentes nutritivos necesarios para que las células crezcan y produzcan rFVIII, caracterizado porque dicha suspensión celular es una suspensión de células humanas y se cultiva en condiciones que inducen una tensión de cizalla a través de medios mecánicos directamente a la suspensión de células humanas mediante la adición de una densidad de potencia de 50  $\text{W}/\text{m}^3$  a 1000  $\text{W}/\text{m}^3$ .
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la densidad de potencia se introduce al medio de cultivo celular mediante un movimiento mecánico de la suspensión celular.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el movimiento mecánico de la suspensión celular se  
15 efectúa por medio del bombeo de la suspensión celular a través de una membrana de filtro tangencial, en particular, una membrana de fibra hueca.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el movimiento mecánico de la suspensión celular se  
20 efectúa por medio de un elemento rotatorio, como un agitador, un propulsor o un impulsor.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el rFVIII es un rFVIII con el dominio B eliminado.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células eucarióticas son  
25 células HEK293.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula rFVIII se produce en y se asocia a las células HEK293.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los detergentes no iónicos se seleccionan de entre Pluronic-F68, Tween 20 y Tween 80.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los detergentes no iónicos  
35 presentan una concentración de 0,00001 a 1 % en peso, en particular 0,0001 a 0,1 % en peso y, más adecuadamente, de 0,001 a 0,01 % en peso.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la agregación celular se  
40 minimiza al mantener una baja concentración de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo y al aumentar el transporte de  $\text{CaCl}_2$  desde el entorno del cultivo a las células por medio del aumento de la cizalla.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el movimiento mecánico de la suspensión celular, se inicia mediante un contenedor de cultivo equipado con un impulsor o la tensión de cizalla en el contenedor de suspensión celular se induce mediante el bombeo de la suspensión celular a través de un mezclador estático o un dispositivo de filtro.



**Figura 1**



**Figura 2**

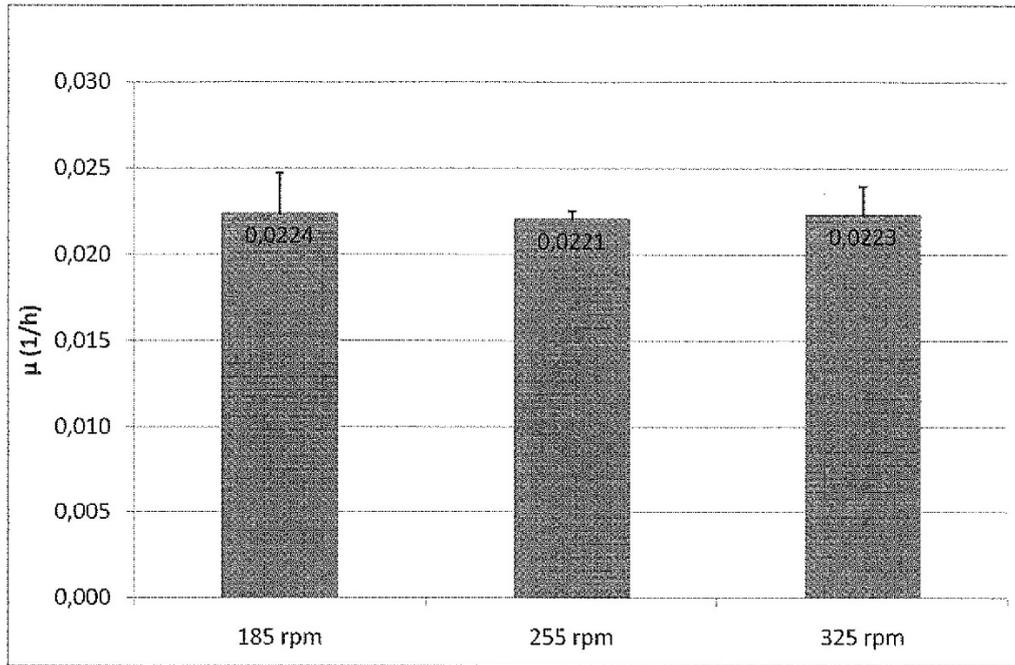


Figura 3

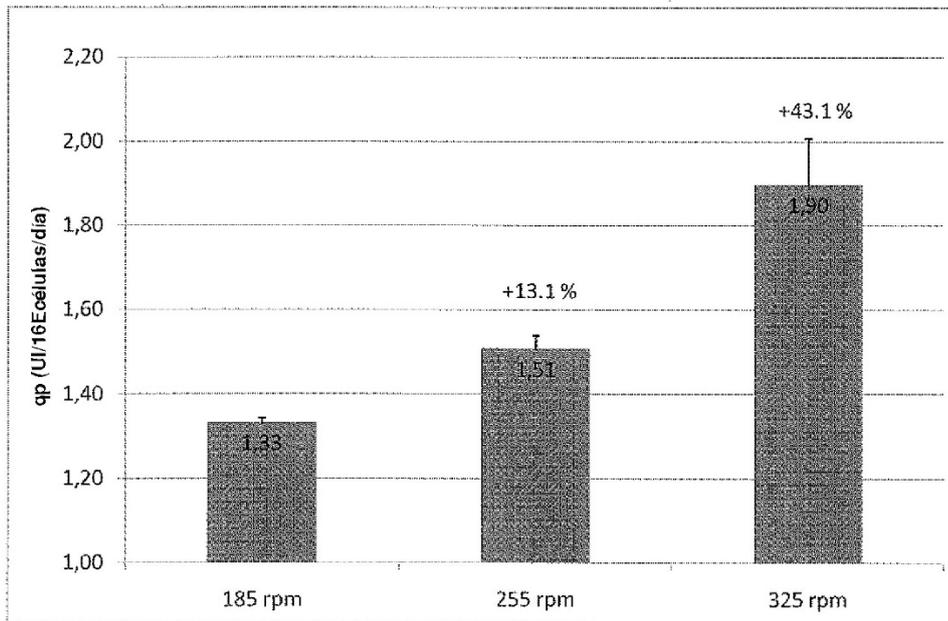


Figura 4

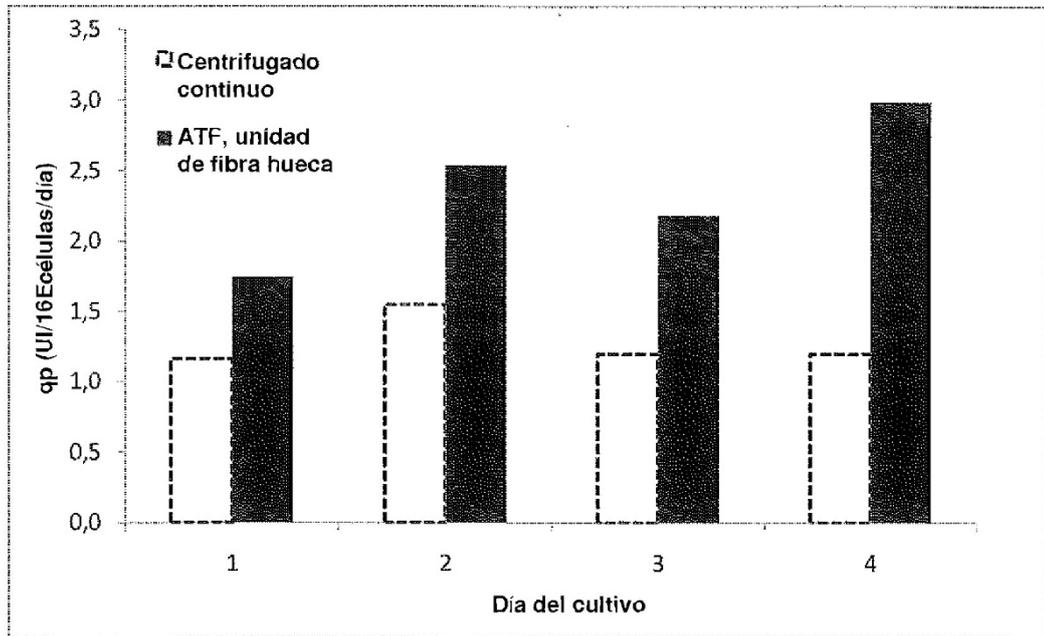


Figura 5