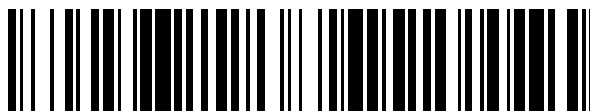


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 680**

51 Int. Cl.:

C08G 65/30 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2015 PCT/US2015/022592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15148736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015 E 15715932 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3122799**

54 Título: **Procedimientos de preparación de un poloxámero para su uso en medio de cultivo celular**

30 Prioridad:

25.03.2014 US 201461970281 P

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

11.08.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**VISSVESVARAN, GANESH PRASADH;
KISS, ROBERT DAVID;
MEIER, STEVEN J.;
KWON, INCHAN;
CALHOUN, KARA;
WINCHESTER, KATE;
ADAMS, AMELIA;
GLENN, MARION;
KOENIG, STEFAN y
DEESE, ALAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 778 680 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de preparación de un poloxámero para su uso en medio de cultivo celular

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar poloxámero (por ejemplo, para su uso en un medio de cultivo celular), medios de cultivo celular que contienen el poloxámero preparado como se describe en el presente documento, y procedimientos para usar los medios de cultivo celular descritos en el presente documento para cultivar células y producir polipéptidos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La tecnología de fabricación de cultivos celulares se usa ampliamente para la producción de tratamientos basados en proteínas, tales como anticuerpos, para su uso en formulaciones farmacéuticas. La producción comercial de productos a base de proteínas, tal como un producto de anticuerpo, requiere la optimización de los parámetros del cultivo celular para que la célula produzca una gran cantidad del producto proteico para satisfacer las demandas de fabricación. Cuando los productos a base de proteínas se fabrican a escala industrial, factores tales como la eficiencia de la producción de proteínas y el coste de las materias primas (por ejemplo, los componentes del medio de cultivo celular) son de importancia crítica.

El poloxámero es un componente del medio de cultivo celular que se usa ampliamente en la producción industrial de proteínas. Se agrega a un medio de cultivo celular para potenciar la viabilidad de las células cultivadas. Una de sus muchas funciones es actuar como tensioactivo, reduciendo la fuerza de unión entre las células y las burbujas de gas en el medio de cultivo celular y protegiendo a las células del daño cuando explotan las burbujas. También puede fortalecer las membranas celulares, mejorar el drenaje celular de la capa de espuma del cultivo y alterar la frecuencia y la velocidad de las burbujas.

Yong *et al.* (International Journal of Pharmaceutics, 2006, 321: 56-61) divulga un procedimiento para preparar un poloxámero que comprende calentar una mezcla que comprende poloxámero hasta 55 °C, y enfriar el poloxámero fundido en un molde de supositorio hasta 25 °C.

El documento WO2004/071452 describe otro procedimiento de preparación de la composición de polímero en el que este procedimiento comprende calentar una mezcla de homopolímeros de óxido de alquileo no aleatorios (AOH) o copolímeros de óxido de alquileo no aleatorios (AOC) y AOC aleatorios (por ejemplo, poloxámero 188) para alcanzar 80 °C (60-90 segundos), recalentar las sondas a 80 °C y verter las mezclas fundidas en moldes.

El documento EP1661558B1 divulga el calentamiento de un poloxámero a aproximadamente 150 °C y el uso de una torre de granulación para enfriar el poloxámero fundido.

Desafortunadamente, se ha observado una variabilidad significativa de lote a lote en el rendimiento del poloxámero. Cuando se usan en un medio de cultivo celular, los lotes de poloxámero de bajo rendimiento pueden reducir la viabilidad celular y la tasa de proliferación celular. La viabilidad celular reducida da lugar a una producción reducida de proteínas. Cuando el cultivo se realiza a escala industrial, esta producción reducida puede provocar serias pérdidas económicas.

Por lo tanto, existe la necesidad de una solución simple y económica para reducir la variabilidad del poloxámero y mejorar el rendimiento del poloxámero, en particular para lotes de bajo rendimiento.

50 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La invención proporcionada en el presente documento divulga, entre otros, procedimientos para preparar un poloxámero (por ejemplo, para su uso en un medio de cultivo celular). También se proporcionan poloxámeros preparados por los procedimientos descritos en el presente documento. Además se divulgan en el presente documento composiciones de medios de cultivo celular que contienen un poloxámero preparado por los procedimientos descritos en el presente documento. Además se divulgan en el presente documento procedimientos para producir un polipéptido en un cultivo celular mediante el cultivo de una célula que produce el polipéptido en un medio de cultivo celular que contiene un poloxámero preparado mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

La materia objeto de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En consecuencia, en un aspecto de la divulgación, se proporcionan en el presente documento procedimientos para preparar un poloxámero para su uso en un medio de cultivo celular, que comprende las etapas de: (a) calentar un poloxámero sólido a al menos aproximadamente 60 °C para formar un poloxámero líquido; y (b) enfriar el poloxámero líquido a una temperatura inferior a aproximadamente 50 °C para formar un poloxámero

sólido tratado térmicamente, en el que el enfriamiento no se realiza en un dispositivo de granulado o molienda, y en el que el poloxámero comprende un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno. En algunos aspectos de la divulgación, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero tratado térmicamente se incrementa en comparación con la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a). En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 185 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a entre aproximadamente 157 °C y aproximadamente 185 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 157 °C y aproximadamente 185 °C durante al menos 1 minuto. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 157 °C y aproximadamente 185 °C durante entre 1 minuto y aproximadamente 250 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C durante al menos 1 minuto. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C durante al menos 1 minuto. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C durante al menos 1 minuto. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 134 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 134 °C durante al menos aproximadamente 62 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 134 °C durante entre aproximadamente 62 minutos y aproximadamente 250 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 120 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 120 °C durante al menos aproximadamente 98 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 120 °C durante entre aproximadamente 98 minutos y aproximadamente 250 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C durante al menos aproximadamente 122 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C durante entre aproximadamente 122 minutos y aproximadamente 250 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C durante al menos aproximadamente 143 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C durante entre aproximadamente 143 minutos y aproximadamente 250 minutos. Como se define en las reivindicaciones, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero tratado térmicamente se incrementa en al menos un 10 % en comparación con la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a). En algunos aspectos de la divulgación, la viabilidad celular se incrementa al menos aproximadamente un 20 %. En algunos aspectos de la divulgación, la viabilidad celular se incrementa al menos aproximadamente un 30 %. En algunos aspectos de la divulgación, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a) está por debajo de aproximadamente 80 % después de aproximadamente 3 horas de cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero líquido en la etapa (b) se enfría a temperatura ambiente, aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, o por debajo de 0 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se calienta a vacío. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero líquido se enfría durante al menos aproximadamente 20 minutos. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero tratado térmicamente producido en la etapa (b) se agrega a un medio de cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación, las etapas (a) y (b) se repiten al menos una vez antes de agregar el poloxámero tratado térmicamente al medio de cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero se ha tratado mediante un proceso de granulación antes de la etapa (a). En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$, en la que n es de aproximadamente 60 a aproximadamente 150 y m es de aproximadamente 25 a aproximadamente 60. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 55 °C. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 6.000 a aproximadamente 18.000 Daltons. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero comprende un copolímero que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ con n que tiene un valor de aproximadamente 80, con m que tiene un valor de aproximadamente 27, y el poloxámero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 7680 a aproximadamente 9510 g/mol. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero es poloxámero 188. En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de mamífero. En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de insecto. En algunos aspectos de la divulgación, la célula produce un polipéptido.

La divulgación proporciona en el presente documento un poloxámero preparado por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y en el presente documento.

En el presente documento se divulga un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero preparado

mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 10 g/l.

También se divulgan en el presente documento procedimientos para producir un polipéptido en un cultivo celular, que comprenden la etapa de cultivar una célula que produce el polipéptido en un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido, en los que el medio de cultivo celular comprende el poloxámero producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de mamífero. En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de insecto. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En consecuencia, en un aspecto de la divulgación, se proporcionan en el presente documento procedimientos para preparar un poloxámero (por ejemplo, para su uso en un medio de cultivo celular), que comprenden las etapas de (a) calentar un poloxámero purificado a aproximadamente 80 °C o superior (por ejemplo, aproximadamente 80 °C a aproximadamente 100 °C) para formar un poloxámero líquido, y (b) enfriar el poloxámero líquido a una temperatura de aproximadamente 50 °C o inferior para formar un poloxámero sólido tratado térmicamente, en los que el enfriamiento no se realiza en un dispositivo de granulación o molienda. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero comprende un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero comprende un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$, en la que n es de aproximadamente 60 a aproximadamente 150 y m es de aproximadamente 25 a aproximadamente 60. En algunos aspectos de la divulgación, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero tratado térmicamente se incrementa en comparación con la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a). En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero es un poloxámero purificado. En algunos aspectos de la divulgación, un poloxámero purificado es una composición de poloxámero que no contiene otro compuesto terapéutico o farmacéutico. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) no contiene otro compuesto terapéutico o farmacéutico. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero en la etapa (a) se calienta a aproximadamente 85 °C a aproximadamente 91 °C. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero se calienta de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos. En algunos aspectos de la divulgación de este documento, el poloxámero líquido en la etapa (b) se enfría a temperatura ambiente, aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, o por debajo de 0 °C. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero líquido se enfría durante al menos aproximadamente 20 minutos. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero tratado térmicamente producido en la etapa (b) se agrega a un medio de cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, las etapas (a) y (b) se repiten al menos una vez antes de agregar el poloxámero tratado térmicamente al medio de cultivo celular. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, la viabilidad celular se incrementa al menos aproximadamente un 10 %. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, la viabilidad celular se incrementa al menos aproximadamente un 30 %. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a) está por debajo de aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero se ha tratado mediante un proceso de granulación previa antes de la etapa (a). En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero tiene una temperatura de fusión en el intervalo de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 6.000 a aproximadamente 18.000 Daltons. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero es poloxámero 188. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero comprende un copolímero que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ con n que tiene un valor de aproximadamente 80, con m que tiene un valor de aproximadamente 27, y el poloxámero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 7680 a aproximadamente 9510 g/mol. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero es el poloxámero 237. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero comprende un copolímero que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ con n que tiene un valor de aproximadamente 64 y con m que tiene un valor de aproximadamente 37. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero es el poloxámero 338. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero comprende un copolímero que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ con n que tiene un valor de aproximadamente 141 y con m que tiene un valor de aproximadamente 44. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, el poloxámero es el poloxámero 407. En algunos aspectos de la

divulgación, el poloxámero comprende un copolímero que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ con n que tiene un valor de aproximadamente 101 y con m que tiene un valor de aproximadamente 56. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, la célula puede ser una célula de mamífero. En algunos aspectos de la divulgación, la célula puede ser una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, la célula puede ser una célula de insecto. En algunos aspectos de la divulgación del presente documento, la célula produce un polipéptido. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otro aspecto de la divulgación, se proporciona en el presente documento un poloxámero producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y en el presente documento.

En el presente documento se divulgan medios de cultivo celular que comprenden el poloxámero producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 10 g/l.

También se divulgan en el presente documento procedimientos para producir un polipéptido en un cultivo celular, que comprenden la etapa de cultivar una célula que produce el polipéptido en un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido, en los que el medio de cultivo celular comprende el poloxámero producido por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de mamífero. En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunos aspectos de la divulgación, la célula es una célula de insecto. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio celular comprende el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el polipéptido producido por la célula es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** muestra que el tratamiento térmico del poloxámero mejora su efecto sobre la viabilidad celular en cultivo. El diagrama de diamantes indica la media (línea central) y los intervalos de confianza superiores/inferiores del 95 % (puntos de diamantes), así como los valores de viabilidad celular (puntos) para cada condición experimental. Cada experimento compara el poloxámero no tratado y tratado térmicamente (HT) de un lote bueno o malo ("sospechoso") de poloxámero, como se indica en el eje x. Las flechas indican una mejora en la viabilidad celular tras el tratamiento térmico de lotes defectuosos. Debe tenerse en cuenta que el tratamiento térmico también mejoró la viabilidad celular del lote bueno, de un promedio de aproximadamente el 85 % a un valor de aproximadamente el 95 %.

La **FIG. 2** muestra la viabilidad celular (%) en un modelo de prueba en matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento (HSSF) para muestras de poloxámero A, B y C no tratadas y tratadas térmicamente (_HT) (véase también la Tabla 2).

La **FIG. 3** muestra el diseño de la superficie de respuesta de las condiciones sometidas a prueba en hornos. Cada condición está marcada con el formato "tiempo, temperatura". Las condiciones marcadas con '♦' se sometieron a prueba en HSSF. Las condiciones marcadas con '∅' se prepararon en hornos pero no se sometieron a prueba en HSSF. La temperatura (en °C) representa la temperatura establecida del horno, mientras que el tiempo (en min) representa el tiempo que la muestra de poloxámero estuvo en el horno.

La **FIG. 4** muestra la mejora en la viabilidad celular (%) ($V_{f(\text{tratado})} - V_{f(\text{no tratado})}$) para muestras de poloxámero C tratado térmicamente en hornos en las condiciones indicadas, en comparación con los controles positivo ("lote bueno") y negativo ("lote malo no tratado") (D y C, respectivamente). Las barras de error representan una desviación estándar.

La **FIG. 5** muestra una gráfica de contorno de un diseño de experimentos (DOE) completo que explora los efectos de diferentes condiciones de tratamiento térmico sobre el rendimiento de poloxámero en cultivo celular. La mejora de la viabilidad ($V_{f(\text{tratado})} - V_{f(\text{no tratado})}$) en la prueba en HSSF se muestra en función del tiempo y la temperatura. Los puntos indican las condiciones de muestra sometidas a prueba.

La **FIG. 6** muestra una mejora en la viabilidad celular (%) ($V_{f(\text{tratado})} - V_{f(\text{no tratado})}$) en una prueba en HSSF para muestras de poloxámero de tres lotes malos (H, F y G) y un lote bueno (E) tratado térmicamente bajo el condiciones indicadas.

La **FIG. 7** muestra una comparación de la mejora en la viabilidad celular (%) ($Vf_{(tratado)} - Vf_{(no\ tratado)}$) para lotes malos de poloxámero (H y G) tratados a bajas temperaturas (60-80 °C) durante un período prolongado (120 min)
* El modelo en HSSF se realiza por duplicado.

5 La **FIG. 8** muestra la mejora en la viabilidad celular (%) ($Vf_{(tratado)} - Vf_{(no\ tratado)}$) en una prueba en HSSF para muestras de poloxámero (H y G) tratadas térmicamente en condiciones de vacío, en comparación con no tratadas.

10 La **FIG. 9** muestra perfiles de calentamiento y enfriamiento para material de poloxámero en hornos. Se sometieron a prueba tres temperaturas: 1400 °C, 155 °C y 170 °C. Una vez que la lectura de temperatura comenzó a estabilizarse, el material se retiró del horno y se enfrió a temperatura ambiente. Los perfiles se nivelaron a 40 °C, cerca del punto de fusión del poloxámero.

15 La **FIG. 10** muestra los resultados de la prueba t de Student para cada lote de poloxámero tratado térmicamente en comparación con el control positivo (D) y el material no tratado. Los diamantes medios ilustran los intervalos de confianza del 95 % (puntos superior e inferior) y la media (línea central) para cada conjunto de datos.

20 La **FIG. 11** muestra una gráfica de contorno para datos de la superficie de respuesta y experimentos de DOE completo que ilustran el amplio intervalo de trabajo para las condiciones de tratamiento térmico del poloxámero. Se ilustra el cambio en la viabilidad celular (%) para cada espacio experimental. La mejora de la viabilidad ($Vf_{(tratado)} - Vf_{(no\ tratado)}$) en la prueba en HSSF se muestra en función del tiempo y la temperatura. Los datos de la superficie de respuesta reflejan los tiempos de incubación y las temperaturas corregidas para el tiempo requerido para alcanzar la temperatura objetivo. Los puntos indican las condiciones de muestra sometidas a prueba.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los autores de la invención de esta solicitud demostraron que el tratamiento térmico del poloxámero mejora la capacidad del poloxámero para soportar la viabilidad en el cultivo celular. Los datos en la solicitud muestran que el uso de un medio de cultivo celular con el poloxámero tratado térmicamente mejora la viabilidad celular, en
30 comparación con el uso de un medio de cultivo celular sin el tratamiento térmico. Los autores de la invención demostraron que diferentes lotes de poloxámero, cuando se agregan al medio de cultivo celular, tienen efectos drásticamente diferentes en la viabilidad celular, y que el tratamiento térmico descrito en el presente documento mejora el efecto sobre la viabilidad celular para los lotes buenos y malos de poloxámero.

35 En el presente documento se divulgan composiciones para cultivo celular que incluyen un poloxámero tratado térmicamente. En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento composiciones para cultivo celular que contienen un poloxámero tratado térmicamente en un medio de cultivo celular.

40 En el presente documento se divulgan procedimientos para producir un polipéptido en un cultivo celular mediante el cultivo de una célula que produce el polipéptido en un medio de cultivo celular que contiene un poloxámero tratado térmicamente en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido.

I. Definiciones

45 Antes de describir la invención en detalle, se debe entender que la presente invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. Se debe entender también que la terminología usada en el presente documento se utiliza para el propósito de describir únicamente modos de realización particulares y no pretende ser limitante.

50 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

55 El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) modos de realización que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*.

60 Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en" aspectos y modos de realización.

65 El término "poloxámero" se refiere a un copolímero de bloques hecho de una cadena de polioxipropileno (el término "óxido de propileno" puede usarse de manera intercambiable en el presente documento) flanqueado por dos cadenas de polioxietileno (el término "óxido de etileno" puede usarse de manera intercambiable en el presente documento). Los poloxámeros se pueden vender con nombres comerciales como PLURONIC® (BASF),

KOLLIPHOR® (BASF), LUTROL® (BASF) y SYNPERONIC® (Croda International). A menos que se especifique una especie particular de poloxámero, las referencias a "poloxámero" pueden referirse genéricamente a múltiples especies de poloxámero.

5 En algunos modos de realización, el poloxámero es un poloxámero purificado. El término "poloxámero purificado" se refiere a una composición de poloxámero que está sustancialmente libre de otros compuestos. Un poloxámero purificado puede incluir, por ejemplo, un poloxámero disponible comercialmente que tiene una calidad técnica o superior. Los ejemplos de calidades técnica o superior pueden incluir calidad técnica, calidad purificada, calidad NF (Formulario nacional de EE. UU.), calidad USP (farmacopea de EE. UU.), calidad reactiva y calidad ACS. (American Chemical Society). Un poloxámero purificado se refiere a uno que no está mezclado con otro compuesto. Por ejemplo, un poloxámero purificado puede referirse a un poloxámero que no está mezclado con un compuesto terapéutico o farmacéutico, por ejemplo, como parte de una formulación de fármaco. En algunos modos de realización, un poloxámero purificado es uno que está sustancialmente libre o no está mezclado con reactivos sin reaccionar, catalizadores u otros productos generados a través de un proceso o reacción de síntesis de poloxámero.

El término "poloxámero tratado térmicamente" se refiere a un poloxámero tratado térmicamente al menos una vez mediante los procedimientos proporcionados en el presente documento.

20 Los términos "medio" y "medio de cultivo celular" se refieren a una fuente de nutrientes usada para cultivar o mantener las células. Como se entiende por un experto en la técnica, la fuente de nutrientes puede contener componentes requeridos por la célula para su crecimiento y/o supervivencia o puede contener componentes que contribuyan al crecimiento y/o supervivencia de la célula. Las vitaminas, los aminoácidos esenciales o no esenciales, los oligoelementos y los tensioactivos (p. ej. poloxámeros) son ejemplos de componentes de medios. 25 Cualquier medio proporcionado en el presente documento también puede complementarse con uno o más de insulina, hidrolizados vegetales e hidrolizados animales.

"Cultivar" una célula se refiere a poner en contacto una célula con un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la viabilidad y/o crecimiento y/o proliferación de la célula.

30 Un "cultivo por lotes" se refiere a un cultivo en el que todos los componentes para el cultivo de células (incluyendo las células y todos los nutrientes y componentes del cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del procedimiento de cultivo.

35 La frase "cultivo de células por lotes alimentados", como se usa en el presente documento, se refiere a un cultivo por lotes en el que las células y el medio de cultivo se suministran inicialmente al recipiente de cultivo, y se alimentan nutrientes de cultivo adicionales, de forma continua o en incrementos separados, al cultivo durante el procedimiento de cultivo, con o sin recuperación periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo.

40 Un "cultivo por perfusión" es un cultivo mediante el que las células se inmovilizan en el cultivo, por ejemplo, mediante filtración, encapsulación, anclaje a microtransportadores, etc., y el medio de cultivo se introduce y retira de forma continua o intermitente del recipiente de cultivo.

45 "Recipiente de cultivo" se refiere a un envase usado para cultivar una célula. El recipiente de cultivo puede ser de cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y se puede estar interrumpido por moléculas distintas de aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los ejemplos de polipéptidos englobados dentro de la definición en el presente documento incluyen proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de Von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o activador del plasminógeno de la orina humana o de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; 50 RANTES (quimiocina de regulación por activación, expresada y segregada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana;

5 sustancia inhibitoria de mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a
 gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a
 linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular
 (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor
 10 neurótrofo, tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5
 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas
 (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como FGF-alfa y FGF-beta; factor de crecimiento epidérmico
 (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF-
 15 β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I
 cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBP); proteínas de CD, tales como CD3, CD4,
 CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea
 (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por
 ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa;
 20 receptores de linfocitos T; proteínas de superficie de membrana; factor de aceleración de la degradación;
 antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA; proteínas de transporte; receptores
 de referencia; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM,
 VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario) o receptor HER2,
 HER3 o HER4; inmuno adhesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas enumeradas
 anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a una proteína,
 25 incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente.

El término "título" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de polipéptido expresado
 de forma recombinante producido por un cultivo de células dividida entre una cantidad dada de volumen del
 medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de anticuerpo por mililitro de medio. El título
 30 se puede expresar o evaluar en términos de una medición relativa, como un aumento porcentual en el título en
 comparación con la obtención del producto proteico en diferentes condiciones de cultivo.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente
 anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales,
 35 anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que
 presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o con afinidad
 madurada.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el
 presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente
 40 intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se definen a continuación. Los términos se refieren en particular a
 un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende
 45 preferentemente la región de unión al antígeno del mismo (el término "fragmento de unión al antígeno" se puede
 usar de manera intercambiable). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab',
 F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos
 multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

45 II. Procedimientos de preparación de un poloxámero

En el presente documento se proporcionan procedimientos para preparar un poloxámero, por ejemplo, para su
 uso en un medio de cultivo celular.

50 *Calentamiento*

En algunos aspectos, los procedimientos para preparar un poloxámero para su uso en un medio de cultivo
 celular proporcionado en el presente documento incluyen calentar un poloxámero (por ejemplo, un poloxámero
 55 purificado) para formar un poloxámero líquido. Por ejemplo, un poloxámero purificado en la fase sólida se puede
 calentar hasta la fusión, formando así un poloxámero líquido. La temperatura a la que se calienta el poloxámero
 se puede ajustar en función de la temperatura de fusión de la especie particular de poloxámero utilizada. En
 algunos modos de realización, el poloxámero purificado tiene una temperatura de fusión en el intervalo de
 aproximadamente 45 °C a aproximadamente 60 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado
 60 tiene una temperatura de fusión en el intervalo de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 55 °C.

En algunos modos de realización, los procedimientos para preparar un poloxámero para su uso en un medio de
 cultivo celular como se define en las reivindicaciones incluyen calentar un poloxámero sólido a al menos
 aproximadamente 60 °C para formar un poloxámero líquido y enfriar el poloxámero líquido a una temperatura
 inferior a aproximadamente 50 °C para formar un poloxámero sólido tratado térmicamente, donde el enfriamiento
 65 no se realiza en un dispositivo de granulación o molienda, y el poloxámero comprende un copolímero de óxido de
 etileno y óxido de propileno. En algunos modos de realización, el poloxámero es un poloxámero purificado. En

algunos modos de realización, un poloxámero purificado es una composición de poloxámero que no contiene otro compuesto terapéutico o farmacéutico.

5 Cabe señalar que cualquiera de los intervalos de temperatura descritos en el presente documento se pretende que sean inclusivos, a menos que se indique explícitamente de otro modo. Por ejemplo, un intervalo de temperaturas entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 185 °C incluye aproximadamente 60 °C y aproximadamente 185 °C dentro de dicho intervalo.

10 En algunos modos de realización, el poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) se calienta como se define en las reivindicaciones a entre aproximadamente 157 °C y aproximadamente 185 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 185, 180, 175, 170, 165 o 160. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 157, 160, 165, 170, 175 o 180. Es decir, el poloxámero se puede calentar a una temperatura en el intervalo de 15 temperaturas que tiene un límite superior de 185, 180, 175, 170, 165 o 160 y un límite inferior seleccionado independientemente de 157, 160, 165, 170, 175, o 180, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta entre aproximadamente 157 °C y aproximadamente 185 °C durante al menos aproximadamente 1 minuto, al menos aproximadamente 2 minutos, al menos aproximadamente 3 minutos, al menos aproximadamente 4 minutos, al menos aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 6 minutos, al menos aproximadamente 7 minutos, al menos aproximadamente 8 minutos, al menos aproximadamente 9 minutos, al menos aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 15 minutos, al menos aproximadamente 20 minutos, al menos aproximadamente 25 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 35 minutos, al menos aproximadamente 40 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente 50 minutos, al menos aproximadamente 55 minutos, al menos aproximadamente 60 minutos, al menos aproximadamente 65 minutos, al menos aproximadamente 70 minutos, al menos aproximadamente 75 minutos, al menos aproximadamente 80 minutos, al menos aproximadamente 85 minutos, al menos aproximadamente 90 minutos, al menos aproximadamente 100 minutos, al menos aproximadamente 110 minutos, al menos aproximadamente 120 minutos, al menos aproximadamente 130 minutos, al menos aproximadamente 140 minutos, al menos aproximadamente 150 minutos, al menos aproximadamente 160 minutos, al menos aproximadamente 170 minutos, al menos aproximadamente 180 minutos, al menos aproximadamente 190 minutos, al menos aproximadamente 200 minutos, al menos aproximadamente 210 minutos, al menos aproximadamente 220 minutos, al menos aproximadamente 230 minutos o al menos aproximadamente 240 minutos. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 157 °C y aproximadamente 185 °C durante 35 menos de o igual a 250 minutos.

40 En algunos modos de realización, el poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) se calienta como se define en las reivindicaciones a entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 157, 155, 150, 145, 140 o 135. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 134, 135, 140, 145, 150 o 155. Es decir, el poloxámero se puede calentar a una temperatura en el intervalo de temperaturas que tiene un límite superior de 157, 155, 150, 145, 140 o 135 y un límite inferior seleccionado independientemente de 134, 135, 140, 145, 150, o 155, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. 45 En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C durante al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 35 minutos, al menos aproximadamente 40 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente 50 minutos, al menos aproximadamente 55 minutos, al menos aproximadamente 60 minutos, al menos aproximadamente 65 minutos, al menos aproximadamente 70 minutos, al menos aproximadamente 75 minutos, al menos aproximadamente 80 minutos, al menos aproximadamente 85 minutos, al menos aproximadamente 90 minutos, al menos aproximadamente 100 minutos, al menos aproximadamente 110 minutos, al menos aproximadamente 120 minutos, al menos aproximadamente 130 minutos, al menos aproximadamente 140 minutos, al menos aproximadamente 150 minutos, al menos aproximadamente 160 minutos, al menos aproximadamente 170 minutos, al menos aproximadamente 180 minutos, al menos aproximadamente 190 minutos, al menos aproximadamente 200 minutos, al menos aproximadamente 210 minutos, al menos aproximadamente 220 minutos, al menos aproximadamente 230 minutos o al menos aproximadamente 240 minutos. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 134 °C y aproximadamente 157 °C durante 50 menos de o igual a 250 minutos.

60 En algunos modos de realización, el poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) se calienta como se define en las reivindicaciones a entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 134 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura inferior a aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 134, 130 o 125 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 120, 125 o 130 °C. Es decir, el poloxámero puede calentarse a una temperatura en el intervalo de temperaturas que tiene un límite superior de 134, 130 o 125 y un límite inferior seleccionado independientemente de 120, 125 o 130, en el 65

que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 134 °C durante al menos aproximadamente 62 minutos, al menos aproximadamente 65 minutos, al menos aproximadamente 70 minutos, al menos aproximadamente 75 minutos, al menos aproximadamente 80 minutos, al menos aproximadamente 85 minutos, al menos aproximadamente 90 minutos, al menos aproximadamente 100 minutos, al menos aproximadamente 110 minutos, al menos aproximadamente 120 minutos, al menos aproximadamente 130 minutos, al menos aproximadamente 140 minutos, al menos aproximadamente 150 minutos, al menos aproximadamente 160 minutos, al menos aproximadamente 170 minutos, al menos aproximadamente 180 minutos, al menos aproximadamente 190 minutos, al menos aproximadamente 200 minutos, al menos aproximadamente 210 minutos, al menos aproximadamente 220 minutos, al menos aproximadamente 230 minutos o al menos aproximadamente 240 minutos. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 134 °C durante menos de o igual a 250 minutos.

En algunos modos de realización, el poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) se calienta como se define en las reivindicaciones a entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 120 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 120, 115, 110 o 105. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 100, 105, 110 o 115. Es decir, el poloxámero puede calentarse a una temperatura en el intervalo de temperaturas que tiene un límite superior de 120, 115, 110 o 105 y un límite inferior seleccionado independientemente de 100, 105, 110 o 115, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 120 °C durante al menos aproximadamente 98 minutos, al menos aproximadamente 100 minutos, al menos aproximadamente 110 minutos, al menos aproximadamente 120 minutos, al menos aproximadamente 130 minutos, al menos aproximadamente 140 minutos, al menos aproximadamente 150 minutos, al menos aproximadamente 160 minutos, al menos aproximadamente 170 minutos, al menos aproximadamente 180 minutos, al menos aproximadamente 190 minutos, al menos aproximadamente 200 minutos, al menos aproximadamente 210 minutos, al menos aproximadamente 220 minutos, al menos aproximadamente 230 minutos, o al menos aproximadamente 240 minutos. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 100 °C y aproximadamente 120 °C durante menos de o igual a 250 minutos.

En algunos modos de realización, el poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) se calienta como se define en las reivindicaciones a entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 100, 95, 90 o 85. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 80, 85, 90 o 95. Es decir, el poloxámero puede calentarse a una temperatura en el intervalo de temperaturas que tiene un límite superior de 100, 95, 90 o 85 y un límite inferior seleccionado independientemente de 80, 85, 90 o 95, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C durante al menos aproximadamente 122 minutos, al menos aproximadamente 130 minutos, al menos aproximadamente 140 minutos, al menos aproximadamente 150 minutos, al menos aproximadamente 160 minutos, al menos aproximadamente 170 minutos, al menos aproximadamente 180 minutos, al menos aproximadamente 190 minutos, al menos aproximadamente 200 minutos, al menos aproximadamente 210 minutos, al menos aproximadamente 220 minutos, al menos aproximadamente 230 minutos, o al menos aproximadamente 240 minutos. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 100 °C durante menos de o igual a 250 minutos.

En algunos modos de realización, el poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) se calienta como se define en las reivindicaciones a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 80, 75, 70 o 65. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 60, 65, 70 o 75. Es decir, el poloxámero puede calentarse a una temperatura en el intervalo de temperaturas que tiene un límite superior de 80, 75, 70 o 65 y un límite inferior seleccionado independientemente de 60, 65, 70 o 75, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C durante al menos aproximadamente 143 minutos, al menos aproximadamente 150 minutos, al menos aproximadamente 160 minutos, al menos aproximadamente 170 minutos, al menos aproximadamente 180 minutos, al menos aproximadamente 190 minutos, al menos aproximadamente 200 minutos, al menos aproximadamente 210 minutos, al menos aproximadamente 220 minutos, al menos aproximadamente 230 minutos, o al menos aproximadamente 240 minutos. En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C durante menos de o igual a 250 minutos.

En algunos modos de realización, el poloxámero se calienta a vacío. Por ejemplo, el poloxámero puede calentarse en un horno de vacío bajo un vacío aplicado. Como se describe a continuación, se encontró

inesperadamente que calentar el poloxámero a las temperaturas descritas en el presente documento bajo un vacío aplicado da como resultado un rendimiento mejorado del poloxámero (véase, por ejemplo, el ejemplo 7). Dicho de otra manera, la aplicación de vacío al poloxámero durante el calentamiento no anula los efectos beneficiosos del calentamiento sobre el rendimiento posterior del poloxámero, por ejemplo, en cultivo celular.

5 En otros modos de realización, calentar un poloxámero a una temperatura objetivo durante un período de tiempo puede referirse al tiempo durante el cual el poloxámero está a la temperatura particular. Es decir, el tiempo = 0 puede indicar el momento en que el poloxámero alcanzó la temperatura objetivo. Por ejemplo, calentar un poloxámero a 140 °C durante 5 minutos puede indicar que el poloxámero se calentó durante 5 minutos después de alcanzar una temperatura de 140 °C. Por ejemplo, calentar un poloxámero (por ejemplo, un poloxámero purificado) entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 185 °C durante al menos 1 minuto indica que el poloxámero ha alcanzado la temperatura objetivo (por ejemplo, entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 185 °C) durante al menos 1 minuto.

15 En algunos modos de realización, la temperatura del poloxámero purificado durante el proceso de calentamiento no excede aproximadamente 120 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado puede disolverse en una solución líquida o acuosa antes del proceso de calentamiento. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado disuelto en una solución líquida o acuosa puede calentarse a una temperatura más alta que la que se usaría para un poloxámero sólido. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado es un poloxámero sólido antes del proceso de calentamiento. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado es un poloxámero líquido a temperatura ambiente antes del proceso de calentamiento.

25 En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta a una temperatura de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 100 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta a una temperatura de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 91 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta a una temperatura inferior a aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82 u 81. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta a una temperatura mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes temperaturas (en °C): 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99. Es decir, el poloxámero purificado puede calentarse a una temperatura en el intervalo de temperaturas que tiene un límite superior de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82 u 81 y un límite inferior seleccionado independientemente de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta a una temperatura de menos de aproximadamente 120 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta a una temperatura inferior a aproximadamente 101 °C, 102 °C, 103 °C, 104 °C, 105 °C, 106 °C, 107 °C, 108 °C, 109 °C, 110 °C, 111 °C, 112 °C, 113 °C, 114 °C, 115 °C, 116 °C, 117 °C, 118 °C y 119 °C.

40 El tiempo de calentamiento puede referirse al tiempo total durante el cual se aplica calor al poloxámero, por lo que el tiempo de calentamiento no se limita al tiempo durante el cual el poloxámero ha alcanzado la temperatura deseada. En algunos modos de realización, el poloxámero purificado se calienta durante un periodo de tiempo total entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15 minutos, y el calentamiento se detiene cuando el poloxámero alcanza una temperatura máxima deseada.

45 Se puede usar cualquier aparato de calentamiento adecuado conocido en la técnica para calentar el poloxámero purificado. Como ejemplo no limitante, el poloxámero sólido se puede calentar en un recipiente de vidrio (por ejemplo, un vaso de precipitados PYREX®, un matraz u otro recipiente abierto) que se calienta en una placa calefactora de laboratorio estándar (por ejemplo, un agitador con placa calefactora vendida por Corning®, 50 Costar® o Thermo Scientific™). Alternativamente, el poloxámero puede calentarse en un horno de vacío.

Se puede usar cualquier herramienta de medición de temperatura adecuada conocida en la técnica para medir la temperatura del poloxámero durante/después del tratamiento térmico, siempre que la herramienta de medición de temperatura se use de tal manera que se pueda realizar una medición exacta de la temperatura del poloxámero (por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante). Ejemplos no limitantes de herramientas de medición de temperatura adecuadas incluyen, entre otros, termómetros (por ejemplo, 55 termómetros de vidrio de dilatación de líquido), termopares (por ejemplo, como se describe a continuación), detectores de temperatura por resistencia (RTD) y/o termistores. En algunos modos de realización, la herramienta de medición de temperatura puede ser intrínseca al equipo utilizado para calentar.

60 *Enfriamiento*

En algunos aspectos, los procedimientos para preparar un poloxámero para su uso en un medio de cultivo celular como se define en las reivindicaciones incluyen enfriar un poloxámero purificado calentado para formar un poloxámero sólido tratado térmicamente, en el que el poloxámero líquido se enfría a una temperatura inferior a aproximadamente 50 °C. La temperatura a la que se enfría el poloxámero líquido puede ser cualquier

temperatura por debajo de su temperatura de congelación, que puede variar dependiendo del poloxámero particular utilizado. Por ejemplo, el poloxámero 188 tiene una temperatura de congelación de aproximadamente 52 °C, por lo que este poloxámero se puede enfriar a cualquier temperatura por debajo de aproximadamente 52 °C para formar un poloxámero sólido tratado térmicamente.

5 El poloxámero líquido calentado puede enfriarse a cualquier temperatura suficiente para que el poloxámero se congele. En algunos modos de realización, el poloxámero líquido calentado se enfría a temperatura ambiente. En algunos modos de realización, el poloxámero líquido calentado se enfría a aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En algunos modos de realización, el poloxámero líquido calentado se enfría a menos de aproximadamente 0 °C, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C o a aproximadamente -70 °C.

15 El poloxámero líquido calentado puede enfriarse durante cualquier período de tiempo deseado suficiente para que el poloxámero líquido calentado se congele a esa temperatura de enfriamiento. En algunos modos de realización, el poloxámero líquido se enfría durante aproximadamente 20 minutos. El tiempo de enfriamiento puede depender de la temperatura a la que se calentó el poloxámero y/o la temperatura de enfriamiento. Las temperaturas y los tiempos de enfriamiento pueden determinarse empíricamente observando cuánto tiempo tarda un poloxámero líquido (calentado a una temperatura determinada durante un período de tiempo determinado) en congelarse a una temperatura de enfriamiento particular.

20 Se puede usar cualquier aparato de enfriamiento adecuado conocido en la técnica, excepto un dispositivo de granulación o molienda, para enfriar el poloxámero líquido calentado. Por ejemplo, el poloxámero líquido calentado puede introducirse en un refrigerador, congelador o cámara frigorífica mantenidos a una temperatura de enfriamiento suficiente como se describe anteriormente. Alternativamente, puede no usarse ningún aparato de enfriamiento particular, sino que el poloxámero líquido calentado puede enfriarse en el aparato de calentamiento después de que el aparato se haya apagado o programado para detener el calentamiento. En este caso, el poloxámero líquido calentado se deja enfriar a temperatura ambiente. Por ejemplo, si el poloxámero se calienta en una placa calefactora, el poloxámero líquido calentado puede enfriarse simplemente dejándolo en la placa calefactora después de que se apaga la función de calentamiento de la placa calefactora. Alternativamente, el poloxámero puede enfriarse en un horno de vacío. En algunos modos de realización, enfriar el poloxámero líquido calentado no incluye el uso de nitrógeno líquido. En algunos modos de realización, enfriar el poloxámero líquido calentado no incluye pulverizar o atomizar el poloxámero líquido calentado mediante un gas mantenido a una temperatura específica. En algunos modos de realización, enfriar el poloxámero líquido calentado no incluye conformar el poloxámero en partículas o micropartículas de un tamaño y/o forma específicos o uniformes.

35 *Granulación/molienda*

El enfriamiento tal como se define en las reivindicaciones no se realiza en un dispositivo de granulación o molienda. Poloxámero se ha preparado en la técnica mediante granulación o molienda para lograr unas partículas de poloxámero de tamaño y/o forma uniformes y específicos (para un ejemplo que describe la granulación y molienda de poloxámeros, véase la patente europea EP1661558 B1 o la patente de EE. UU. n.º 7.887.844). La granulación del poloxámero implica pasar poloxámero líquido a través de un atomizador para crear partículas de poloxámero líquido y enfriar estas partículas en un medio refrigerante, por ejemplo, un gas mantenido a una temperatura específica o nitrógeno líquido. Se cree que la temperatura del medio de enfriamiento determina la velocidad de congelación del poloxámero, que influye en el tamaño y la forma finales de las partículas de poloxámero. Un ejemplo de un dispositivo de granulación puede incluir, sin limitación, una torre de granulación. En una torre de granulación, se libera un poloxámero atomizado desde la parte superior de la torre, y se congela en partículas mientras cae a través de un gas o medio de enfriamiento líquido (por ejemplo, aire ambiente, aire mantenido a una temperatura específica o nitrógeno líquido).

50 La molienda del poloxámero (o micromolienda) implica moler un poloxámero sólido, o forzar un poloxámero sólido a alta presión a través de una boquilla, hasta que se produzcan partículas de poloxámero de determinado tamaño. Debido a que la molienda puede generar calor y los poloxámeros tienen una temperatura de fusión relativamente baja, el poloxámero a menudo se enfría durante el proceso de molienda para mantener una fase sólida, por ejemplo, enfriando con aire frío o nitrógeno líquido. El poloxámero también puede enfriarse antes de la molienda y molerse durante un período de tiempo insuficiente para que el poloxámero se funda. Los ejemplos de dispositivos de molienda pueden incluir, sin limitación, molinos de aire comprimido, molinos de bolas y molinos congeladores (por ejemplo, SPEX SamplePrep® Freezer/Mill®).

60 La granulación y la molienda son útiles para procesos que requieren estándares rigurosos para el tamaño y la forma de las partículas de poloxámero, por ejemplo, como parte de las formulaciones de fármacos. El poloxámero se conoce en la técnica como un componente en las formulaciones de fármacos que ayuda a la solubilidad y afecta a la liberación del fármaco. En estas formulaciones, las partículas de poloxámero deben mantener características estándar para conferir las propiedades farmacocinéticas deseadas a la formulación del fármaco y cumplir rigurosos estándares de reproducibilidad y seguridad del fármaco. Cabe señalar que los procedimientos descritos en el presente documento no requieren estándares tan rigurosos o precisos para el poloxámero, por lo que no se utilizan estos procedimientos de granulación o molienda.

En algunos modos de realización, el poloxámero se ha tratado mediante un proceso de granulación antes de calentarse como se describe en el presente documento. Muchos poloxámeros disponibles comercialmente para su uso en cultivo celular (por ejemplo, Poloxámero 188 Pluronic® F68 NF Prill tal como lo vende BASF®) se han sometido a un proceso de granulación o microgranulación durante la fabricación. Las etapas de calentamiento y enfriamiento incluidas en los procedimientos descritos en el presente documento no implican la granulación. En cambio, se pueden aplicar al poloxámero que ya ha sido granulado o microgranulado. Es un descubrimiento de la presente divulgación que el rendimiento de los poloxámeros disponibles comercialmente (por ejemplo, poloxámero granulado o microgranulado) en cultivo celular puede mejorarse mediante calentamiento y enfriamiento como se describe en el presente documento.

En algunos aspectos, los procedimientos para preparar un poloxámero para su uso en un medio de cultivo celular descrito en el presente documento incluyen la adición de un poloxámero tratado térmicamente a un medio de cultivo celular. Después de calentar y enfriar, el poloxámero sólido tratado térmicamente puede disolverse en un medio de cultivo celular mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, si el poloxámero se calienta y se enfría en un recipiente de vidrio abierto, el poloxámero sólido tratado térmicamente resultante simplemente se puede raspar o descamar en una cantidad apropiada (en peso) para agregarlo al medio de cultivo celular. El poloxámero tratado térmicamente puede agregarse a un medio de cultivo celular de inmediato, o puede almacenarse y agregarse a un medio de cultivo celular en un momento posterior (por ejemplo, más de aproximadamente un día, más de aproximadamente un mes o más de aproximadamente un año después del tratamiento térmico).

En algunos modos de realización, las etapas de calentamiento y enfriamiento como se describen anteriormente se realizan cada una antes de agregar el poloxámero tratado térmicamente al medio de cultivo celular. En algunos modos de realización, las etapas de calentamiento y enfriamiento como se describen anteriormente se repiten al menos una vez antes de agregar el poloxámero tratado térmicamente al medio de cultivo celular.

III. Poloxámeros y propiedades de los poloxámeros

En el presente documento se proporcionan procedimientos para preparar un poloxámero para su uso en un medio de cultivo celular.

El término "poloxámero" puede englobar muchos compuestos distintos porque se pueden usar diferentes longitudes de cadenas de polioxipropileno y polioxietileno combinadas. La combinación particular de cadenas de polioxipropileno y polioxietileno presentes en un poloxámero puede dar lugar a propiedades químicas y/o biofísicas particulares. En algunos modos de realización, el poloxámero tiene la fórmula química de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$. En algunos modos de realización, n (es decir, la longitud de la cadena de polioxietileno) tiene un valor de aproximadamente 60 a aproximadamente 150. En algunos modos de realización, m (es decir, la longitud de la cadena de polioxipropileno) tiene un valor de aproximadamente 25 a aproximadamente 60.

Los poloxámeros a menudo se describen mediante un sistema de numeración que designa su peso molecular aproximado y el porcentaje de contenido de polioxietileno. Estos valores pueden referirse a un valor promedio de una composición de poloxámero, en lugar de un valor absoluto de cada molécula de poloxámero de la composición. Bajo este sistema, los primeros dos dígitos se multiplican por 100 para obtener el peso molecular aproximado del bloque de polioxipropileno, y el tercer dígito se multiplica por 10 para obtener el porcentaje en peso del bloque de polioxietileno. Por ejemplo, el poloxámero 188 (n.º CAS 9003-11-6) puede referirse a un poloxámero con n que tiene un valor de aproximadamente 80 y con m que tiene un valor de aproximadamente 27 como en la fórmula representada anteriormente. El poloxámero 237 puede referirse a un poloxámero con n que tiene un valor de aproximadamente 64 y con m que tiene un valor de aproximadamente 37. El poloxámero 338 puede referirse a un poloxámero con n que tiene un valor de aproximadamente 141 y con m que tiene un valor de aproximadamente 44. El poloxámero 407 puede referirse a un poloxámero con n que tiene un valor de aproximadamente 101 y con m que tiene un valor de aproximadamente 56. En algunos modos de realización, el poloxámero tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 6.000 a aproximadamente 18.000 daltons. En algunos modos de realización, poloxámero 188 puede referirse a un poloxámero con n que tiene un valor de aproximadamente 80, con m que tiene un valor de aproximadamente 27 como en la fórmula representada anteriormente, y con el poloxámero que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 7680 a aproximadamente 9510 g/mol. En algunos modos de realización, poloxámero 188 puede referirse a un poloxámero con n que tiene un valor de aproximadamente 80, con m que tiene un valor de aproximadamente 27 como en la fórmula representada anteriormente, y con el poloxámero que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 7000 a aproximadamente 10000 g/mol.

Los poloxámeros vendidos bajo nombres comerciales, por ejemplo, PLURONIC®, pueden nombrarse con un sistema diferente. Se puede usar una letra para indicar el estado físico (por ejemplo, F para sólido, P para pasta o L para líquido). Se puede usar un número de 2 o 3 dígitos para indicar las propiedades químicas. Los primeros uno o dos dígitos se multiplican por 300 para obtener el peso molecular aproximado del bloque de

polioxipropileno, y el tercer dígito se multiplica por 10 para obtener el porcentaje en peso del bloque de polioxietileno. Por ejemplo, PLURONIC® F68 puede referirse a un poloxámero sólido con n que tiene un valor de aproximadamente 80 y con m que tiene un valor de aproximadamente 27 como en la fórmula representada anteriormente. PLURONIC® F87 puede referirse a un poloxámero sólido con n que tiene un valor de aproximadamente 64 y con m que tiene un valor de aproximadamente 37. PLURONIC® F108 puede referirse a un poloxámero sólido con n que tiene un valor de aproximadamente 141 y con m que tiene un valor de aproximadamente 44. PLURONIC® F127 puede referirse a un poloxámero sólido con n que tiene un valor de aproximadamente 101 y con m que tiene un valor de aproximadamente 56.

Dado que los poloxámeros tienen restos hidrófobos (polioxipropileno) e hidrófilos (polioxietileno) de diversas longitudes, diferentes poloxámeros pueden poseer diferente equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB). El HLB de un compuesto se determina calculando la proporción relativa del compuesto que es hidrófila o lipófila, y el valor de HLB se usa para predecir las propiedades tensioactivas de un compuesto. Por ejemplo, se predice que un compuesto con un HLB inferior a 10 es insoluble en agua, y se predice que un compuesto con un HLB superior a 10 es soluble en agua. En modos de realización preferentes, el poloxámero para su uso en cultivo celular tiene un HLB de 24 o superior. El HLB de un poloxámero se puede calcular de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, incluidos los descritos en Griffin, W.C. (1954) *J. Soc. Cosmet. Chemists* 5(4):249-56 y Davies, J.T. (1957) *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces: Proc. of 2nd Intl. Congress Surface Activity*, Butterworths (Londres): 426-38.

En algunos modos de realización, se pueden medir las propiedades físicas y/o químicas de un poloxámero. Por ejemplo, las propiedades físicas y/o químicas de un poloxámero pueden medirse antes y después del tratamiento térmico como se describe en el presente documento para identificar propiedades asociadas con un poloxámero tratado térmicamente. Como otro ejemplo, las propiedades físicas y/o químicas de un lote bueno de poloxámero y un lote malo de poloxámero como se describen en el presente documento pueden medirse para identificar propiedades asociadas con un lote bueno de poloxámero.

Los ejemplos de ensayos para medir propiedades físicas y/o químicas pueden incluir, sin limitación, EM-MALDI, cromatografía de exclusión molecular, DRX de polvo, dispersión de luz cuasi-elástica y RMN en estado sólido. La EM-MALDI (espectrometría de masas por ionización/desorción láser asistida por matriz) es conocida en la técnica como una técnica para analizar, cuantificar o identificar un compuesto, por ejemplo, por su masa molecular y carga. Como ejemplo no limitante, la EM-MALDI puede usarse para identificar un compuesto (por ejemplo, una impureza) preferentemente asociado o presente en un lote de poloxámero antes del tratamiento térmico o un lote malo de poloxámero, en comparación con un poloxámero tratado térmicamente o un lote bueno de poloxámero. La cromatografía de exclusión molecular se conoce en la técnica como una técnica para separar compuestos por tamaño. Como ejemplo no limitante, la cromatografía de exclusión molecular puede usarse para aislar un compuesto (por ejemplo, una impureza) preferentemente asociado o presente en un lote de poloxámero antes del tratamiento térmico o un lote malo de poloxámero, en comparación con un poloxámero tratado térmicamente o un lote bueno de poloxámero. La DRX de polvo (difracción de rayos X de polvo) se conoce en la técnica como una técnica para caracterizar la estructura de un compuesto y puede implicar las etapas de generar una muestra de polvo de un compuesto (que contiene una pluralidad de cristalitas orientadas al azar) y usar difracción de rayos X para analizar las características estructurales de las cristalitas. Como ejemplo no limitante, la DRX de polvo puede usarse para caracterizar una propiedad estructural de un poloxámero tratado térmicamente o un lote bueno de poloxámero, por ejemplo, en comparación con un poloxámero antes del tratamiento térmico o un lote malo de poloxámero. La dispersión de luz cuasi-elástica (también conocida como dispersión de luz dinámica y espectroscopia de correlación de fotones) se conoce en la técnica como una técnica para determinar un perfil de distribución de tamaño de partículas en una solución o suspensión. Como ejemplo no limitante, la dispersión de luz cuasi-elástica puede usarse para identificar un compuesto (por ejemplo, una impureza) por su tamaño de partícula que está preferentemente asociado o presente en un lote de poloxámero antes del tratamiento térmico o un lote malo de poloxámero, en comparación con un poloxámero tratado térmicamente o un lote bueno de poloxámero.

La RMN de estado sólido (resonancia magnética nuclear o RMN de estado sólido) se conoce en la técnica como una técnica para determinar una variedad de características estructurales de un compuesto. Por ejemplo, la RMN en estado sólido puede usarse para caracterizar una conformación molecular, disposición, desplazamiento químico o naturaleza polimórfica de un compuesto. Como ejemplo no limitante, la RMN en estado sólido puede usarse para caracterizar una propiedad estructural de un poloxámero tratado térmicamente o un lote bueno de poloxámero, en comparación con un poloxámero antes del tratamiento térmico o un lote malo de poloxámero. En algunos modos de realización, una propiedad estructural determinada por RMN en estado sólido puede incluir la relación de poloxámero cristalino a amorfo en una muestra de poloxámero. Como otro ejemplo no limitante, la RMN en estado sólido puede usarse para proporcionar espectros que pueden resolver o perfilar uno o más polimorfos de poloxámero. En algunos modos de realización, la RMN en estado sólido se puede usar para resolver uno o más polimorfos de poloxámero en un lote bueno de poloxámero o un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con los polimorfos de poloxámero presentes en un lote malo de poloxámero o un poloxámero antes del tratamiento térmico. En algunos modos de realización, un espectro de poloxámero generado por RMN en estado sólido puede correlacionarse con el rendimiento de un poloxámero en un medio de

cultivo celular, por ejemplo, midiendo la viabilidad celular de un cultivo celular cultivado en un medio de cultivo celular que contiene un lote bueno de poloxámero o un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con la viabilidad celular de un cultivo celular cultivado en un medio de cultivo celular que contiene un lote malo de poloxámero o un poloxámero antes del tratamiento térmico.

5

IV. Uso de poloxámeros en cultivo celular y producción de polipéptidos

Los poloxámeros tratados térmicamente proporcionados en el presente documento pueden usarse en procedimientos (por ejemplo, de cultivo de células y producción de polipéptidos usando un medio de cultivo que contiene un poloxámero tratado térmicamente de la presente divulgación) y en composiciones (por ejemplo, un medio de cultivo celular que contiene un poloxámero tratado térmicamente de la presente divulgación).

10

Uso de poloxámero en cultivo celular

Los poloxámeros se pueden usar como aditivos para medios de cultivo celular conocidos en la técnica. Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se cree que los poloxámeros tienen muchas funciones en los medios de cultivo celular que pueden proteger a las células del daño y mejorar la viabilidad celular. Por ejemplo, el poloxámero puede actuar como un protector frente al cizallamiento de las células. El poloxámero puede reducir la unión de las células a las burbujas y/o reducir el impacto cuando explotan las burbujas, evitando así el daño celular. El poloxámero también puede alterar la velocidad y la frecuencia de las burbujas, mejorar el drenaje celular de la capa de espuma y/o fortalecer las membranas celulares. Véase, por ejemplo, Meier, SJ, *et al.* (1999) *Biotechnol. Bioeng* 62 (4): 468-78; Chisti, Y. (2000) *Trends Biotechnol.* 18 (10): 420-32; y Tharmalingam, T., *et al.* (2008) *Mol. Biotechnol.* 39 (2): 167-77.

20

El poloxámero tratado térmicamente como se describe en el presente documento puede añadirse a un medio de cultivo celular a cualquier concentración típicamente usada para el poloxámero. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo celular incluye el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo celular incluye el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 3 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo celular incluye el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 10 g/l. En algunos modos de realización, el medio de cultivo celular incluye el poloxámero tratado térmicamente a aproximadamente 0,1 g/l, a aproximadamente 0,2 g/l, a aproximadamente 0,3 g/l, a aproximadamente 0,4 g/l, a aproximadamente 0,5 g/l, a aproximadamente 0,6 g/l, aproximadamente 0,7 g/l, aproximadamente 0,8 g/l, aproximadamente 0,9 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 4 g/l, a aproximadamente 5 g/l, a aproximadamente 6 g/l, a aproximadamente 7 g/l, a aproximadamente 8 g/l, a aproximadamente 9 g/l, o a aproximadamente 10 g/l. En algunos aspectos de la divulgación, un poloxámero tratado térmicamente preparado como se describe en el presente documento puede usarse en un medio de cultivo celular para lograr un nivel deseado de viabilidad celular a una concentración más baja que un poloxámero antes del tratamiento térmico. En algunos aspectos de la divulgación, un poloxámero tratado térmicamente preparado como se describe en el presente documento puede usarse en un medio de cultivo celular para lograr un nivel deseado de viabilidad celular a una concentración más consistente o estandarizada que un poloxámero antes del tratamiento térmico.

25

30

35

40

Los tensioactivos como los poloxámeros tienen un límite en solución, denominado concentración micelar crítica (CMC), por encima de la cual las moléculas de tensioactivo adicionales agregadas comienzan a formar micelas, en lugar de disolverse en la solución. A concentraciones superiores a la CMC, la tensión superficial de la solución ya no disminuye a la misma velocidad proporcional a la concentración de tensioactivo. En algunos aspectos de la divulgación, el poloxámero tratado térmicamente se agrega a un medio de cultivo celular a una concentración inferior a su CMC. Por ejemplo, se ha determinado que la CMC del poloxámero 188 es de 100 mg/ml (Kabanov, AV, *et al.* (1995) *Macromolecules* 28 (7): 2303-14). La CMC de un poloxámero puede determinarse midiendo la tensión superficial de una solución mientras se va agregando el poloxámero. La concentración a la que incrementar la concentración de poloxámero ya no da como resultado una tensión superficial incrementada es la CMC para ese poloxámero. La tensión superficial puede medirse, por ejemplo y sin limitación, usando un tensiómetro (por ejemplo, el tensiómetro Sigma 700/701 de Attension).

45

50

55

Medio de cultivo celular

Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren al cultivo de una célula en un medio de cultivo celular. Puede usarse cualquier medio de cultivo celular conocido en la técnica, adecuado para el tipo deseado de célula y/o producto polipeptídico. En algunos aspectos de la divulgación, el medio de cultivo celular es un medio químicamente indefinido. En otros aspectos, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular químicamente indefinido. En algunos aspectos de la divulgación, se agrega un poloxámero tratado térmicamente como se describe en el presente documento a un medio de cultivo celular basal. En algunos aspectos de la divulgación, se agrega un poloxámero tratado térmicamente como se describe en el presente documento a un medio de cultivo celular alimentado o de lote alimentado.

60

65

Se pueden usar medios disponibles comercialmente, que incluyen, entre otros, Ham F10 (Sigma), Medio esencial mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Medio de Eagle modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma), caldo de Luria (LB) y caldo Terrific (TB), y cualquiera de estos medios puede complementarse con cualquiera de los componentes de los medios como se detalla en el presente documento (por ejemplo, un poloxámero tratado térmicamente). Además, se puede complementar cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes y Sato, Anal. Biochem., 102:255 (1980), las pat. de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; o 4.560.655; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; reedición de la pat. de EE. UU. n.º 30.985; o la patente de EE. UU. n.º 5.122.469 con cualquiera de los componentes de los medios como se detalla en el presente documento (por ejemplo, un poloxámero tratado térmicamente).

Cualquier medio proporcionado en el presente documento también se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), tensioactivos tales como poloxámero y glucosa o una fuente de energía equivalente. En algunos aspectos de la divulgación, un medio de cultivo celular proporcionado en el presente documento contiene proteínas derivadas de una planta o un animal. En algunos modos de realización, un cultivo celular proporcionado en el presente documento está libre de proteínas derivadas de una planta o un animal. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica.

Viabilidad celular

En algunos modos de realización, la viabilidad celular de un medio de cultivo celular que incluye el poloxámero tratado térmicamente se incrementa en comparación con la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que incluye poloxámero no tratado (o poloxámero antes del tratamiento térmico). Es un descubrimiento de la presente divulgación que la preparación de un poloxámero como se define en las reivindicaciones da como resultado una mayor viabilidad celular cuando el poloxámero tratado térmicamente se usa en un medio de cultivo celular, en comparación a cuando se usa poloxámero no tratado en el mismo medio de cultivo celular. En la técnica se conocen procedimientos para someter a prueba la viabilidad celular. Como se define en las reivindicaciones, la viabilidad celular se mide como se describe en detalle en los Ejemplos proporcionados en el presente documento. En algunos modos de realización, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular puede medirse después de aproximadamente 1 hora, después de aproximadamente 2 horas o después de aproximadamente 3 horas (por ejemplo, como se describe a continuación).

Como se usa en el presente documento, la viabilidad celular se cuantifica como el porcentaje de células vivas en una solución (es decir, el número de células vivas dividido por el número total de células). Se puede usar cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica para medir la viabilidad celular. Ya que las células están vivas o están muertas, la viabilidad celular puede determinarse cuantificando células muertas o células vivas. Un procedimiento adecuado es la tinción de exclusión con azul de tripano. En este procedimiento, se obtiene una muestra de células de un cultivo celular. Se agrega una solución de azul de tripano a la muestra. Solo las células no viables absorben azul de tripano, y posteriormente se tiñen de azul. Por lo tanto, se cuenta el número de células azules, se resta por el número total de células para proporcionar el número de células vivas, y este número se divide entre el número total de células para proporcionar la viabilidad celular. Las células se pueden contar manualmente, como con un hemocitómetro, o automáticamente, como, por ejemplo, con un analizador de viabilidad Vi-Cell® (Beckman Coulter). Otros ensayos para determinar la viabilidad celular pueden incluir, sin limitación, ensayos de tinción con yoduro de propidio, TUNEL, resazurina, violeta de metilo, lactato deshidrogenasa, hidrólisis con diacetato de fluoresceína, MTT, caspasa y con ATP.

El efecto de un poloxámero tratado térmicamente puede determinarse, por ejemplo, midiendo la viabilidad celular en un cultivo celular cultivado en un medio de cultivo celular que contiene el poloxámero tratado térmicamente y comparándolo con la viabilidad celular en un cultivo celular cultivado en un medio de cultivo celular que contiene la misma concentración de poloxámero no tratado. En algunos modos de realización se puede cultivar un cultivo celular en un matraz de agitación con deflectores. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 10 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 15 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 20 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 25 %. En algunos modos de realización, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 30 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 35 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un

poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 40 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 45 %. En algunos aspectos de la divulgación, el uso de un poloxámero tratado térmicamente, en comparación con un poloxámero no tratado, incrementa la viabilidad celular en al menos aproximadamente un 50 %.

La viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende un poloxámero tratado térmicamente como se define en las reivindicaciones se incrementa en al menos un 10 % en comparación con la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes del tratamiento térmico. En algunos modos de realización, la viabilidad celular se incrementa en al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 4 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 6 %, al menos aproximadamente un 7 %, al menos aproximadamente un 8 %, al menos aproximadamente un 9 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 11 %, al menos aproximadamente un 12 %, al menos aproximadamente un 13 %, al menos aproximadamente un 14 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 16 %, al menos aproximadamente un 17 %, al menos aproximadamente un 18 %, al menos aproximadamente un 19 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 21 %, al menos aproximadamente un 22 %, al menos aproximadamente un 23 %, al menos aproximadamente un 24 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 26 %, al menos aproximadamente un 27 %, al menos aproximadamente un 28 %, al menos aproximadamente un 29 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 31 %, al menos aproximadamente un 32 %, al menos aproximadamente un 33 %, al menos aproximadamente un 34 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 36 %, al menos aproximadamente un 37 %, al menos aproximadamente un 38 %, al menos aproximadamente un 39 % o al menos aproximadamente un 40 %.

El poloxámero tratado térmicamente puede ser especialmente útil para mejorar el rendimiento de un poloxámero (por ejemplo, un lote particular de un poloxámero deseado) que no proporciona una viabilidad celular satisfactoria cuando se agrega a un medio de cultivo celular. Como se define en las reivindicaciones, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular con poloxámero no tratado es inferior a aproximadamente el 80 %. En algunos modos de realización, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular con poloxámero no tratado es inferior a aproximadamente el 70 %. En algunos modos de realización, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular con poloxámero no tratado es inferior a aproximadamente el 60 %. En algunos modos de realización, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular con poloxámero no tratado es inferior a aproximadamente el 50 %. En algunos modos de realización, la viabilidad celular en un medio de cultivo celular con poloxámero no tratado es inferior a aproximadamente el 40 %.

Crecimiento celular y producción de polipéptidos

En algunos modos de realización, una célula de la presente divulgación (por ejemplo, una célula cultivada en un medio de cultivo celular descrito en el presente documento) puede contener un polinucleótido de interés (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, o un polinucleótido de interés *per se*). En algunos modos de realización, una célula de la presente divulgación puede transfectarse, transformarse o modificarse genéticamente de otro modo para incluir un polinucleótido de interés. Se conocen ampliamente en la técnica procedimientos adecuados para transfectar o transformar una variedad de células. A continuación se proporcionan referencias ejemplares con respecto a la producción de polipéptidos; un experto en la materia apreciará que los procedimientos divulgados allí no están limitados a la producción de polipéptidos.

En general, las células se combinan (se ponen en contacto) con cualquiera de los medios de cultivo de células descritos en el presente documento en una o más condiciones que promuevan cualquiera del crecimiento celular, mantenimiento y/o producción de polinucleótidos y/o polipéptidos. Los procedimientos de cultivar una célula y producir un polipéptido emplean un recipiente de cultivo (biorreactor) para contener la célula y el medio de cultivo celular. El recipiente de cultivo puede estar compuesto por cualquier material que sea adecuado para cultivar células, incluyendo vidrio, plástico o metal. Típicamente, el recipiente de cultivo será de al menos 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 25.000 litros o más. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica. Las condiciones de cultivo que se pueden ajustar durante el procedimiento de cultivo incluyen, pero no se limitan a, pH y temperatura.

Un cultivo celular puede mantenerse en condiciones propicias para la supervivencia, el crecimiento, la viabilidad (mantenimiento) y las capacidades de producción de polipéptidos del cultivo celular. Las condiciones precisas variarán dependiendo del tipo de célula, el organismo del cual se derivó la célula y la naturaleza y el carácter del polipéptido expresado. Durante la fase de producción de polipéptidos, el cultivo celular se puede mantener opcionalmente en un segundo conjunto de condiciones de cultivo (en comparación con la fase inicial de crecimiento) propicias para la supervivencia y la viabilidad del cultivo celular y apropiadas para la expresión del polipéptido deseado.

En determinados casos, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular con nutrientes u otros

componentes en el medio que las células hayan reducido o metabolizado. Por ejemplo, podría ser ventajoso complementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes del medio que se observe que se hayan reducido durante el control del cultivo celular. De forma alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular antes de la fase de producción. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos o glucosa u otra fuente de energía.

Los medios de cultivo celular detallados en el presente documento pueden usarse en un procedimiento de cultivo celular para producir polipéptidos, incluyendo anticuerpos. El medio se puede usar en un procedimiento de cultivo celular, ya sea mediante cultivo por lotes, cultivo por lotes alimentados o cultivo por perfusión, y se puede usar en un procedimiento de producción de cualquier polipéptido incluyendo cualquier aspecto o modos de realización del polipéptido como se describe en el presente documento. Los polipéptidos producidos por los procedimientos detallados en el presente documento (por ejemplo, de cultivo de células y producción de polipéptidos usando un medio de cultivo que contiene un poloxámero tratado térmicamente de la presente divulgación) pueden ser homólogos a la célula huésped, o preferentemente, pueden ser exógenos, lo que significa que son heterólogos, es decir, extraños, para la célula huésped que se está utilizando, como una proteína humana producida por una célula CHO o un polipéptido de levadura producido por una célula de mamífero. En una variación, el polipéptido es un polipéptido de mamífero (tal como un anticuerpo) segregado directamente al medio por la célula huésped. En otra variación, el polipéptido se libera al medio mediante lisis de una célula que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido.

Se puede producir cualquier polipéptido que se pueda expresar en una célula huésped de acuerdo con la presente divulgación y puede estar presente en las composiciones proporcionadas. El polipéptido se puede expresar a partir de un gen que sea endógeno a la célula huésped o a partir de un gen que se introduzca en la célula huésped a través de genomanipulación. El polipéptido puede ser uno que exista en la naturaleza, o, de forma alternativa, puede tener una secuencia que se haya genomanipulado o seleccionado por intervención humana. Un polipéptido genomanipulado se puede ensamblar a partir de otros segmentos de polipéptido que existan individualmente en la naturaleza, o puede incluir uno o más segmentos que no sean naturales.

Los polipéptidos que se pueden expresar de forma deseable de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán sobre la base de una actividad biológica o química de interés. Por ejemplo, se puede emplear la presente invención para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. farmacéutica o comercialmente relevante.

Los procedimientos para producir polipéptidos, tales como anticuerpos, en cultivo celular son bien conocidos en la técnica. En el presente documento se proporcionan procedimientos ejemplares no limitantes para producir un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos) en cultivo celular. Un experto en la materia puede adaptar los procedimientos del presente documento para la producción de otras proteínas, tales como inhibidores basados en proteínas. Véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Current Protocols in Protein Science*, (Horswill *et al.*, 2006); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6ª ed., J. Wiley and Sons, 2010) para técnicas y procedimientos generalmente bien conocidos y comúnmente empleados para la producción de proteínas (por ejemplo, proteínas terapéuticas).

En la técnica se conocen condiciones adecuadas para la producción de polipéptidos para una variedad de tipos de células huésped y polipéptidos. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

El cultivo celular se puede agitar o remover violentamente durante el cultivo para incrementar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. El uso de poloxámero puede ser particularmente ventajoso en cultivos celulares agitados por las fuerzas de cizallamiento que potencialmente dañan las células. De acuerdo con la presente divulgación, un experto en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, incluyendo, pero sin limitarse al pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, se puede controlar el pH suministrando una cantidad apropiada de ácido o base y se puede controlar la oxigenación con dispositivos de inyección que se conocen bien en la técnica.

Células

Células adecuadas para cultivar en un medio de cultivo y producir un polipéptido pueden incluir células

procariotas, levaduras o eucariotas superiores (por ejemplo, de mamífero). En algunos modos de realización, se usa una célula de mamífero. En algunos modos de realización, se usa una célula de ovario de hámster chino (CHO).

5 Se pueden cultivar células de mamífero, y la propagación de células de mamíferos en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos pueden incluir, sin limitación, línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamíferos útiles incluyen líneas celulares de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), págs. 255-268.

20 En algunos modos de realización, se pueden cultivar células CHO. Las células CHO son bien conocidas y se usan de forma rutinaria en la técnica para producir polipéptidos en cultivo celular, por ejemplo anticuerpos. Las células CHO pueden incluir, pero sin limitación, células CHO DHFR-(Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)), por ejemplo, ATCC CRL-9096.

25 Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped *E. coli* preferente para clonación es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

35 Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes adecuados para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura panadera común, es la más usada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

50 Se pueden seleccionar determinadas cepas de hongos y levaduras en las que las vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano. Véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross *et al.*, *supra*.

55 Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y células de insecto de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están públicamente disponibles una variedad de cepas víricas para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar como el virus del presente documento de acuerdo con la invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Ejemplos de células de insecto pueden incluir, sin limitación, células de *Drosophila* (por ejemplo, células S2), células de *Trichoplusia ni* (por ejemplo, células High Five™) y células de *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf21 o Sf9).

65 Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate lenteja de agua (*Leninaceae*), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología

PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Producción de anticuerpos

5 En algunos modos de realización, la célula cultivada en un medio de cultivo celular que contiene un poloxámero tratado térmicamente se usa para producir un anticuerpo.

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o humanizados en animales que tienen parte o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255- 258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995). En algunos modos de realización, el anticuerpo producido por los procedimientos descritos en el presente documento es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo derivado de una biblioteca o un anticuerpo multiespecífico.

Los anticuerpos pueden producirse usando procedimientos recombinantes, por ejemplo en la producción de un anticuerpo usando células CHO. Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-antígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Un anticuerpo se puede producir de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que la célula huésped reconoce y procesa (por ejemplo, escinde con una peptidasa señal). Para las células huésped procariontas que no reconocen y procesan una secuencia señal natural del anticuerpo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, secuencia líder de factor a (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente al medio. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, bien células huésped o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar, en general, usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes

accidentales.

Los anticuerpos se pueden purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación típicamente preferentes. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, cromatografía HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con poli(ácido aspártico)), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

En algunos modos de realización, el anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmento de unión al antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera, y contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo. "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido única. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (editorial Springer, Nueva York, 1994), páginas 269-315. Muchos de los procedimientos para purificar un anticuerpo descritos anteriormente pueden adaptarse adecuadamente para purificar un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno.

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, pruebas y clínica están bien establecidas en la técnica, consecuentes con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere apropiado un experto en la técnica para un anticuerpo particular de interés.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: El tratamiento térmico mejora el rendimiento del poloxámero para el cultivo celular

El poloxámero se usa comúnmente en el cultivo celular como un tensioactivo que protege a las células de la inyección de aire y/o del daño relacionado con las burbujas. Desafortunadamente, la variabilidad de lote a lote perjudica su efectividad y da como resultado reducciones en el rendimiento del producto recombinante. Por ejemplo, un lote malo de poloxámero reduce la viabilidad celular y puede causar una disminución en el título del producto de hasta un 45 %. Después de una extensa serie de investigaciones, se descubrió que los lotes malos de poloxámero eran la fuente de reducciones significativas en el rendimiento del producto y las consiguientes pérdidas económicas en la producción industrial de proteínas. Por lo tanto, los procedimientos para mejorar el rendimiento de poloxámero serían altamente beneficiosos.

De forma sorprendente, se ha descubierto que un solo tratamiento térmico puede incrementar el rendimiento de poloxámero en el cultivo celular. Es importante destacar que este tratamiento térmico no solo mejora el rendimiento de los lotes malos de poloxámero, sino que también puede mejorar aún más el rendimiento de los lotes buenos. En el presente documento se describen procedimientos para tratar poloxámero para mejorar su rendimiento como complemento de cultivo celular.

Procedimientos

Tratamiento de poloxámero

Se calentaron 15 g de poloxámero 188 (PLURONIC® F 68 NF Prill Poloxamer 188, BASF) en una placa de agitación estándar durante 10-12 minutos. Se detuvo el calentamiento cuando el poloxámero alcanzó una temperatura de 86-91 °C. El poloxámero se enfrió luego a temperatura ambiente, 2-8 °C, o -72 °C durante aproximadamente 20 minutos. El poloxámero sólido se descamó y se añadió al medio de cultivo celular para someterlo a prueba.

Modelo de prueba de cultivo celular

El poloxámero 188, tratado térmicamente como se describió anteriormente, se añadió al medio celular de CHO estándar, libre de suero, a una concentración final de 1 g/l. Las células CHO se cultivaron a 37 °C en 25-75 ml de medio de cultivo celular en matraz de agitación con deflectores de 250 ml a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml en 5 % de CO₂. Durante el cultivo celular, los matraces se rotaron en un agitador orbital entre 250 y 350 rpm. El uso de matraces de agitación con deflectores creó una gran cantidad de burbujas atrapadas en los cultivos. La viabilidad celular se midió mediante tinción de exclusión con azul de tripano usando un analizador de viabilidad Vi-Cell® (Beckman Coulter). Se tomaron muestras de 300 µl de cultivo celular y se calculó el porcentaje de viabilidad celular dividiendo el número de células viables (es decir, aquellas que no absorbieron azul de tripano) entre el número total de células en la muestra.

Resultados

Se desarrolló un modelo de cribado simple para simular el efecto del poloxámero en la viabilidad del cultivo celular a escala de laboratorio, en lugar de industrial. En resumen, las células CHO se cultivaron en matraces de 250 ml como se describió anteriormente. Con el fin de maximizar la diferencia en la viabilidad celular producida por lotes buenos y malos de poloxámero, se sometió a prueba el volumen del medio de cultivo celular y la velocidad de agitación. Las células se cultivaron en 25, 50 o 75 ml de medio y se agitaron en una plataforma agitadora orbital a 250, 300 o 350 rpm. Se encontró que el volumen del medio no tenía efecto sobre la $\Delta_{\text{viabilidad}}$ (es decir, la diferencia en la viabilidad celular, en términos de porcentaje, entre un lote bueno conocido y un lote malo conocido de poloxámero), pero las velocidades de agitación mayores mostraron un aumento en $\Delta_{\text{viabilidad}}$.

Como se muestra en la **FIG. 1**, se descubrió que el poloxámero con tratamiento térmico (véase Procedimientos) mejora significativamente el rendimiento de poloxámero en el cultivo celular. Se sometió a prueba una variedad de lotes de poloxámero para determinar su efecto sobre la viabilidad celular usando el modelo de cribado anterior. Se sabía que algunos lotes tenían un buen rendimiento, y otros se sospechaba que tenían un bajo rendimiento. Para cada lote, se agregaron lotes no tratados y tratados térmicamente (HT) al medio de cultivo celular para someterlos a prueba. En comparación con el poloxámero no tratado, se encontró que el poloxámero tratado térmicamente mejora la viabilidad celular en todos los lotes sometidos a prueba (**FIG. 1**). En algunos casos, el poloxámero tratado térmicamente fue capaz de duplicar la viabilidad, del 45 % a casi el 90 %. Es importante destacar que el poloxámero tratado térmicamente fue capaz de mejorar la viabilidad de los lotes que ya demostraron un alto rendimiento (véase, por ejemplo, "4 bueno" en la **FIG. 1**).

Estos resultados demuestran que el tratamiento térmico del poloxámero puede mejorar su efecto sobre la viabilidad del cultivo celular. El tratamiento térmico puede mejorar drásticamente el rendimiento de los lotes malos de poloxámero e incluso mejorar aún más el rendimiento de los lotes buenos, lo que sugiere que la implementación del tratamiento térmico de poloxámero puede reducir significativamente el problema de la variabilidad entre los lotes de poloxámero.

Ejemplo 2: Tratamiento térmico del poloxámero medido con un termómetro RTD

Los experimentos descritos en el Ejemplo 1 se realizaron en una placa calefactora. Estos experimentos implicaron calentar el poloxámero a aproximadamente 80-100 °C (medido por RTD) en el transcurso de 10 minutos. Estos experimentos se repitieron con la adición de una muestra calentada a más de 100 °C (es decir, 124 °C).

Procedimientos

Fabricantes y lotes de poloxámero 188

Se usó material poloxámero 188. Los identificadores y el rendimiento del cultivo celular asociado (determinado por el rendimiento en la prueba en matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento, HSSF) se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Identificadores (utilizados para referirse al lote en los ejemplos subsiguientes) y el rendimiento del cultivo celular asociado a partir de los datos de HSSF.

Identificador	Rendimiento de cultivos celulares
G	Malo
D	Bueno
H	Malo
B	Malo
C	Malo
F	Malo
E	Límite
A	Bueno

5 *Procedimientos de tratamiento térmico*

Para evaluar el proceso de tratamiento térmico del poloxámero, se evaluaron varios procedimientos de tratamiento térmico: calentamiento en una placa calefactora, en un horno o en un autoclave.

10 *Placa calefactora*

Se colocaron de cinco a quince gramos de poloxámero en un vaso de precipitados de vidrio (100-400 ml) y se calentó en una placa calefactora con agitación continua. La temperatura del poloxámero se midió usando un termopar (termopar Kaye 731) o un detector de temperatura por resistencia (RTD) (sonda de precisión RTD Fluke 5627A-12). El poloxámero se calentó hasta que alcanzó la temperatura objetivo (aproximadamente de cinco a diez minutos) y a continuación se retiró de inmediato del calor. El poloxámero fundido se dejó enfriar a temperatura ambiente.

20 *Horno*

Se pesaron cinco gramos de poloxámero en un vial de vidrio de centelleo de 20 ml. Se fijó un termopar en el vial de modo que la punta se sumergiera en el poloxámero seco. El poloxámero y el termopar se colocaron en un horno (Yamato ADP 21 Vacuum Drying Oven) ya a la temperatura objetivo. A menos que se especifique de otro modo, los hornos se utilizaron sin la función de vacío (a presión atmosférica). Se permitió que el poloxámero alcanzara la temperatura objetivo (+/- 3 °C, medida por el termopar), y el tiempo en el que el poloxámero alcanzó esta temperatura objetivo se marcó como tiempo = 0. Después del tiempo de incubación deseado, se aplicó un ligero vacío durante 10-30 segundos para extraer cualquier compuesto volátil liberado en el horno. Después de ventilar, el vial de vidrio se retiró del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente (sin tapar).

30 *Cultivo celular de CHO y medios*

Se usó medio celular de CHO estándar, sin suero, para todos los experimentos, con una notable excepción: Pluronic F68 se omitió del medio. Para respaldar este estudio se mantuvieron dos líneas celulares de CHO descongeladas en un biorreactor de siembra (STB).

35 *Procedimiento en matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento*

Añición de muestras de poloxámero a medios de cultivo celular

Los medios se prepararon mediante tomando alícuotas de 250 ml de medio celular de CHO estándar, sin suero (sin poloxámero) por muestra en recipientes PETG y añadiendo 0,25 gramos de muestra de poloxámero a cada alícuota. El medio se agitó durante al menos 5 minutos a 150 rpm para disolver completamente el poloxámero en el medio. Los medios se filtraron al vacío en una cabina de bioseguridad (BSC) utilizando unidades de filtro PES de 0,22 µm. Los medios se almacenaron a 37 °C para su uso dentro de las 24 horas.

45 *Intercambio de medios y ensayo de cultivo celular*

Las muestras de cultivo celular se transfirieron a tubos Falcon de 50 ml de manera que cada alícuota contenía aproximadamente $7,5 \times 10^7$ células. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a $830 \times g$ para formar un gránulo. Se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender las células en medios que contenían muestras de poloxámero para someter a prueba, y luego se transfirieron a matraces de agitación con deflectores de 250 ml con venteo. La densidad celular total (TCD) inicial y la viabilidad se midieron usando un NOVA Flex después de agitar los matraces a 150 rpm durante unos minutos para distribuir las células de manera uniforme. Matraces de

agitación se colocaron a continuación en una incubadora a 5 % de CO₂, 80 % de humedad, y 37 °C y se agitaron a 300 rpm durante 3 horas. Las mediciones de TCD y viabilidad se tomaron después de 1 hora, 2 horas y 3 horas de incubación y se compararon con la TCD y la viabilidad originales.

5 Resultados

Las muestras de un lote bueno de poloxámero (A) y dos lotes malos (B y C) se trataron térmicamente a aproximadamente 100 °C. Una muestra adicional de C se trató térmicamente a 124 °C. Después del tratamiento térmico las muestras se sometieron a prueba en la prueba en HSSF.

10 Todas las muestras de poloxámero tratadas a 100 °C (según lo medido por RTD) no mostraron mejoría respecto al material no tratado del mismo lote (**FIG. 2**). Sin embargo, el C tratado térmicamente a 124 °C demostró un aumento del 19 % en la viabilidad final en comparación con el C no tratado. Adicionalmente, el cambio general en la viabilidad (es decir, % de viabilidad final, V_f menos % de viabilidad inicial, V_0) para C tratado térmicamente fue -27,4 %, un aumento del 21 % en comparación con el C no tratado (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras de poloxámero tratadas térmicamente, condiciones, mejora de la viabilidad respecto al lote no tratado y viabilidad final en la prueba en HSSF.

<i>Descripción de la muestra</i>	<i>Código de la muestra</i>	<i>Mejora de la viabilidad respecto al lote no tratado a las 3 horas</i>	<i>Viabilidad a las 3 h (%)</i>
Lote bueno, no tratado	A	0,0	85,6
Lote bueno, tratado térmicamente	A_HT	1,8	87,4
Lote malo (B), no tratado	B	0,0	69,0
Lote malo (B), tratado térmicamente a 100 °C	B_HT	-5,4	63,6
Lote malo (C), no tratado	C	0,0	49,0
Lote malo (C), tratado térmicamente a 100 °C	C_HT	-2,8	46,2
Lote malo (C), tratado térmicamente a 124 °C	C_HT_124 °C	21,8	68,0

20 *Experimento de modelo en matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento con N = 1*

Estos resultados confirmaron que el tratamiento térmico mejoró el rendimiento del poloxámero en el cultivo celular y ofrecieron una indicación preliminar de la temperatura eficaz y la duración del tratamiento. Sin embargo, estos resultados sugieren que temperaturas superiores a 100 °C pueden ser más eficaces en el tratamiento térmico del poloxámero para el cultivo celular. Se cree que las diferencias en la medición de la temperatura (por ejemplo, el tipo de termómetro utilizado para medir la temperatura del poloxámero) puede dar como resultado diferentes intervalos eficaces para el tratamiento térmico del poloxámero (véase el Ejemplo 8 para más información y discusión).

30 **Ejemplo 3: Transferencia de tratamiento térmico a hornos**

Se usó un horno de secado de sobremesa como mecanismo de calentamiento alternativo, que proporcionó control de temperatura y reproducibilidad. Adicionalmente, la función de vacío permitió que los vapores liberados por el poloxámero en fusión se expulsaran del horno antes de abrirlo y retirar el poloxámero tratado térmicamente. Los experimentos en horno se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

40 Los experimentos iniciales en el horno utilizaron un diseño de superficie de respuesta con el fin de someter a prueba un amplio intervalo de condiciones con un número mínimo de muestras requeridas (**FIG. 3**). La temperatura varió de 92-148 °C, con tiempos de incubación de 10-120 minutos. Las muestras de un lote malo (C) se trataron térmicamente en condiciones especificadas en un horno. Las muestras resultantes se sometieron a prueba a continuación en el modelo de HSSF para determinar la mejora del rendimiento del cultivo celular.

45 El poloxámero de bajo rendimiento calentado en un horno a 140 °C durante 60 minutos y 150 °C durante 35 minutos mostró aumentos sustanciales en la viabilidad final, equivalente a la del control positivo en la prueba en HSSF (**FIG. 4** y Tabla 3).

Tabla 3. Viabilidad para el poloxámero calentado en un horno.

Código de la muestra	Viabilidad promedio a las 3 h	Desviación estándar (DE)*	Mejora de viabilidad promedio respecto al lote no tratado a las 3 h	Desviación estándar (DE) de la mejora de la viabilidad*
Lote malo no tratado (C)	30,4	11,1	0,0	0,0
Control positivo (D)	88,4	2,5	58,1	13,6
C 100 °C, 10 min.	40,5	3,9	10,1	15,0
C 100 °C, 60 min.	42,6	8,1	12,2	3,0
C 120 °C, 35 min.	42,1	1,0	11,8	10,1
C 140 °C, 10 min.	46,7	0,1	16,4	11,2
C 140 °C, 60 min.	89,7	0,4	59,4	10,7
C_150 °C, 35 min.	91,6	0,5	61,2	11,6

* Modelo de HSSF con experimentos duplicado

5 Sin embargo, en estos experimentos, el tratamiento térmico del poloxámero en condiciones inferiores a 140 °C y/o durante menos de 60 minutos no mostró una mejora en el rendimiento. Estos datos indicaron que la temperatura mínima del tratamiento térmico para mejorar el rendimiento del poloxámero fue de aproximadamente 140 °C en los periodos de tiempo sometidos a prueba. Se describen a continuación pruebas más extensas de temperatura y duración del calentamiento, por ejemplo, en el Ejemplo 5.

Ejemplo 4: DOE de tratamiento térmico en horno

15 El mapa de superficie de respuesta primaria para las condiciones de tratamiento térmico en hornos indicó que la temperatura mínima para el tratamiento térmico eficaz en las condiciones sometidas a prueba fue de aproximadamente 140 °C. El diseño de los experimentos (DOE) completo se realizó en hornos de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 2 para determinar el intervalo de trabajo yendo a temperaturas muy altas y prolongados tiempos de incubación. La temperatura máxima sometida a prueba fue de 185 °C y el tiempo máximo de incubación sometido a prueba para cada temperatura fue de 120 minutos. Se trató y sometió a prueba un lote malo de poloxámero (G) en bloques de seis muestras que se segmentaron utilizando un diseño cuadrado latino. En total, se trataron tres bloques de muestras y seis muestras adicionales de condiciones de interés (Tabla 4). Estas muestras se sometieron a prueba a continuación en la prueba en HSSF para determinar el rendimiento del cultivo celular.

25 **Tabla 4.** Condiciones de tratamiento térmico evaluadas en el DOE completo en hornos. Las temperaturas oscilaron entre 110-185 °C; la duración varió de 1-120 min. Los cuadros marcados con una letra (correspondientes a los bloques de la Tabla 5) indican las condiciones de tratamiento que se sometieron a prueba, como se enumera en la Tabla 5.

		Tiempo (min)					
		1	5	10	30	60	120
Temperatura (°C)	110	A			D	X	F
	125			D		F	A
	140	F	A	X	X	D	X
	155	X	D		F	A	
	170		F	A			D
	185	D		F	A		X

30 Los datos sin procesar del DOE se muestran en la Tabla 5. Los resultados del DOE completo, cuando se mapearon en una gráfica de contorno, ilustraron el amplio intervalo de trabajo de las condiciones de tratamiento térmico que mejoran el rendimiento del poloxámero (FIG. 5).

35

Tabla 5: Datos sin procesar del experimento del DOE completo.

Número de lote	Tiempo, min	Temperatura, °C	Bloque	Viabilidad a las 3 h	Mejora de viabilidad (respecto al promedio de control no tratado) %
G	1	110	A	74,9	-4,8
G	5	140	A	77,1	-2,6
G	10	170	A	88,9	9,2
G	30	185	A	89,5	9,8
G	60	155	A	88,7	9,0
G	120	125	A	82,3	2,6
G	10	140	B	91,3	11,6
G	1	155	C	93,6	13,9
G	30	140	C	95,5	15,8
G	120	185	C	95,9	16,2
G	1	185	D	93,9	14,2
G	5	155	D	92,6	12,9
G	10	125	D	73,4	-6,3
G	30	110	D	51,9	-27,8
G	60	140	D	93,7	14,0
G	120	170	D	82,6	2,9
G	60	110	E	82,1	2,4
G	120	140	E	95,9	16,2
G	1	140	F	68,5	-11,2
G	5	170	F	94,5	14,8
G	10	185	F	95,6	15,9
G	30	155	F	95,2	15,5
G	60	125	F	68,2	-11,5
G	120	110	F	94,8	15,1

5 Las muestras tratadas térmicamente a 155 °C o más para todos los tiempos de incubación dieron como resultado mejoras drásticas en el rendimiento del cultivo celular. En la prueba en HSSF, estas muestras tuvieron cambios en la viabilidad de menos del 10 % después de 3 h. A 140 °C, el tratamiento térmico no fue eficaz hasta que el tiempo de incubación fue igual o superior a 30 minutos. Además, las temperaturas más bajas sometidas a prueba, 125 °C y 110 °C, no fueron eficaces hasta que las muestras se incubaron durante 2 horas.

10 **Ejemplo 5: Robustez y reproducibilidad del tratamiento térmico**

15 Para demostrar la reproducibilidad y robustez del espacio de diseño del tratamiento térmico ilustrado en la **FIG. 5**, las condiciones de tratamiento clave del DOE completo se replicaron usando lotes adicionales de poloxámero de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2. Dos de estas condiciones se duplicaron para abordar la reproducibilidad. Las condiciones seleccionadas cayeron dentro o al borde del intervalo de trabajo. En total, se trataron tres lotes malos (incluyendo G, que se utilizó anteriormente para el DOE) (Tabla 6). Para garantizar que el tratamiento térmico no sea perjudicial si se realiza en un lote bueno, también se trató un lote bueno (E).

20

Tabla 6. Número de réplicas para condiciones clave de tratamiento térmico sometidas a prueba en cuatro lotes de poloxámero.

Temperatura	Tiempo	Lote malo n.º 1 (G)	Lote malo n.º 2 (H)	Lote malo n.º 3 (F)	Lote bueno (E)
170 °C	1 min	1	1	1	1
	30 min	1	1	1	1
155 °C	1 min	3	2	2	2
	30 min	2	1	1	1
140 °C	1 min	2	1	1	1
	30 min	3	2	2	2

5 Los resultados la prueba en HSSF para las condiciones de tratamiento repetidas fueron muy similares a los resultados del DOE original (Tablas 7 y 8); sin embargo, hubo una variabilidad observable en las condiciones óptimas de tratamiento térmico en lotes malos (**FIG. 6**).

10 **Tabla 7.** Viabilidad celular final para condiciones de tratamiento térmico sometidas a prueba en la prueba en HSSF en cuatro lotes de poloxámero: E (lote bueno), F (lote malo), H (lote malo) y G (lote malo usado en experimentos del DOE completo).

Muestra	E	F	G	H
No tratado	92,2	72,7	78,8	77,5
140 °C, 30 min n.º 1	93,8	89,8	91,5	77,3
140 °C, 30 min n.º 2	96,1	89,8	89,5	90,6
140 °C, 1 min.	95,3	90,8	90,0	90,7
155 °C, 1 min n.º 1	95,2	90,2	90,8	84,1
155 °C, 1 min n.º 2	94,8	89,9	90,7	81,5
155 °C, 30 min.	96,0	91,0	89,5	92,4
170 °C, 1 min.	95,5	87,4	90,6	93,4
170 °C, 30 min.	94,0	89,2	89,4	92,0

15 **Tabla 8.** Cambio en la viabilidad celular ($V_{f(\text{tratado})} - V_{f(\text{no tratado})}$) en la prueba en HSSF para condiciones de tratamiento térmico sometidas a prueba en cuatro lotes diferentes de poloxámero: E (lote bueno), F (lote malo), H (lote malo) y G (lote malo usado en experimentos del DOE completo).

<i>Mejora de la viabilidad respecto al lote no tratado a las 3 h (%)</i>				
	Lotes			
Muestra	E	F	G	H
140 °C, 1 min.	3,1	18,1	11,2	-0,2
140 °C, 30 min n.º 1	1,6	17,1	12,7	13,1
140 °C, 30 min n.º 2	3,9	17,1	10,7	13,2
155 °C, 1 min n.º 1	3,1	17,5	12,0	6,6
155 °C, 1 min n.º 2	2,6	17,2	11,9	4,1
155 °C, 30 min.	3,8	18,3	10,7	15,0
170 °C, 1 min.	3,3	14,7	11,8	15,9
170 °C, 30 min.	1,8	16,5	10,6	14,5

Experimento de modelo en matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento con N = 1

20 Los lotes G y F, cuando se trataron a 155 °C durante 1 minuto o 140 °C durante 1 minuto, demostraron un aumento significativo en el rendimiento del cultivo celular. Sin embargo, el lote H no mostró mejoría con el tratamiento a 140 °C durante 1 minuto, y solo mejoría mínima (<10 %) con el tratamiento a 155 °C durante 1 min.
 25 Todas las demás condiciones de tratamiento para este lote mostraron una mejora significativa en el cultivo celular. Estos resultados demuestran que los lotes tienen ligeras diferencias en la temperatura mínima y el tiempo de incubación del tratamiento térmico.

Ejemplo 6: Evaluación de temperaturas más bajas y larga duración

Las condiciones de tratamiento térmico descritas en los Ejemplos 2-5 estaban muy por encima del punto de fusión del poloxámero. Para determinar si las temperaturas solo ligeramente superiores al punto de fusión del poloxámero (~50 °C) podrían tener un efecto sobre la viabilidad del cultivo celular, se trataron muestras de dos lotes malos de poloxámero (H y G) en hornos a 60 °C y 80 °C durante 120 minutos y luego se sometieron a prueba en el procedimiento de HSSF de acuerdo con el Ejemplo 2.

Los resultados para las muestras tratadas térmicamente no demostraron una mejora significativa en el rendimiento en comparación con el poloxámero no tratado, independientemente de la temperatura (FIG. 7). Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se plantea la hipótesis de que pueden requerirse tiempos de incubación más prolongados para que estas temperaturas más bajas produzcan poloxámero mejorado.

Ejemplo 7: Tratamiento térmico en vacío

Para determinar el impacto del oxígeno en el tratamiento térmico del poloxámero, se trataron térmicamente muestras de dos lotes malos de poloxámero (H y G) a 140 °C mientras se realizaba un ligero vacío en el horno de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 2. En lugar de retirar muestras del vacío después de un determinado tiempo de incubación, el poloxámero se enfrió en el horno a vacío a temperatura ambiente para asegurar que no hubiese exposición al oxígeno externo mientras el poloxámero estaba a la temperatura objetivo.

Tabla 9. Condiciones de tratamiento térmico del poloxámero y resultados de HSSF para muestras sometidas a prueba al vacío.

<i>Código de la muestra</i>	<i>Viabilidad promedio a las 3 h</i>	<i>Desviación estándar (DE)*</i>	<i>Mejora de viabilidad promedio respecto al lote no tratado a las 3 h</i>	<i>Desviación estándar (DE) de la mejora de la viabilidad*</i>
H (no tratado)	58,8	-37,5	0,0	0,0
H_60 °C 120 min	68,3	0,0	9,5	18,8
H_80 °C 120 min	63,4	9,4	4,6	9,4
G (no tratado)	80,0	-16,5	0,0	0,0
G_60 °C 120 min	77,2	2,5	-2,8	4,6
G_80 °C 120 min	74,8	0,1	-5,2	7,3

*Experimento de modelo en matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento con N = 2

El poloxámero tratado al vacío demostró una mejora significativa (> 20 % de aumento en la viabilidad final) respecto al poloxámero no tratado en cultivo celular (FIG. 8, Tabla 9). Estos resultados demuestran que la exposición al oxígeno externo durante el tratamiento térmico del poloxámero puede no ser necesaria para producir poloxámero mejorado.

Ejemplo 8: Medición de temperatura usando un RTD frente a un termopar de alambre

Los datos anteriores respaldaban un intervalo de temperatura de 80-100 °C para el proceso de tratamiento térmico. Sin embargo, el DOE completo (por ejemplo, como se muestra en la FIG. 5) respalda un intervalo operativo de 140 °C o superior.

Se realizó un experimento examinando los dos termómetros diferentes utilizados para medir la temperatura del poloxámero durante el tratamiento térmico. Los experimentos descritos en el Ejemplo 1 usaron un RTD, mientras que se usó un termopar de alambre en todos los experimentos en horno. El RTD utilizado requiere una profundidad de inmersión de 4" para una medición exacta de la temperatura. Por el contrario, el termopar de alambre está diseñado para medir la temperatura con precisión en su punta, lo que le permite medir la temperatura con precisión mientras está sumergido en solo unos pocos milímetros del poloxámero.

Se realizó una comparación directa mientras se trataba térmicamente el poloxámero en una placa calefactora de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 2. El termopar de alambre dio una lectura de temperatura de 152,6 °C, mientras que el termómetro RTD dio una lectura de 81,65 °C. Por lo tanto, el RTD mostró una infravaloración significativa de la temperatura (> 70 °C) en comparación con el termopar. Estos resultados demuestran que las diferentes lecturas de temperatura del poloxámero subyacen a las diferencias en los intervalos de temperatura eficaces suficientes para producir poloxámero mejorado.

Ejemplo 9: Caracterización de la rampa de calentamiento y la velocidad de enfriamiento en el horno

Las muestras de poloxámero, una vez colocadas en un horno, no alcanzan de inmediato la temperatura objetivo. Los perfiles de calentamiento y enfriamiento para tres temperaturas utilizados en el DOE se evaluaron en el horno de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 2.

5 Las muestras tardaron un promedio de 18 minutos en alcanzar la temperatura objetivo (+/- 3 °C) en el horno con una desviación estándar de 5,8 minutos (**FIG. 9**). A pesar de la variabilidad en los tiempos de calentamiento, las velocidades de enfriamiento fueron relativamente similares. El tiempo promedio para que una muestra alcance la temperatura de fusión del poloxámero (~ 40 °C) fue de 7 minutos, con una desviación estándar de 0,8 minutos. Suponiendo que los perfiles de enfriamiento son en gran medida lineales, las velocidades de enfriamiento para las muestras calentadas a 170 °C, 155 °C y 140 °C fueron aproximadamente -19 °C/min, -19,5 °C/min y -18 °C/min, respectivamente.

Ejemplo 10: Importancia estadística de la viabilidad y el tratamiento térmico del poloxámero

15 Se usó una prueba t de Student para determinar la diferencia entre el rendimiento de los lotes de control de poloxámero en las pruebas en HSSF y la importancia de las mejoras observadas en el rendimiento del cultivo celular. Todos los resultados del control de la HSSF del DOE en horno se incluyeron en el conjunto de datos. Para las muestras tratadas térmicamente, solo se usaron muestras dentro del intervalo de trabajo para calcular el cambio medio en la viabilidad celular después del tratamiento térmico. El intervalo de trabajo se definió como las condiciones donde el cambio en la viabilidad en la prueba en HSSF fue inferior al 15 %.

Los poloxámeros tratados y no tratados se compararon utilizando una prueba t de Student ($\alpha = 0,05$) para determinar diferencias estadísticamente significativas en las medias. Además, los resultados del material tratado se compararon con los resultados del control positivo (D).

25 **Tabla 10:** Viabilidad delta media ($Vf_{(tratada)} - Vf_{(no\ tratada)}$) en la prueba en HSSF para material de poloxámero tratado y no tratado de los lotes sometidos a prueba.

Número de lote	Viabilidad media a las 3 h (%), no tratado	Viabilidad media a las 3 h (%), tratado	Valor de p
			No tratado x tratado
G	78,7	91,4	< 0,0001 *
E	92,2	95,1	0,2490
F	79,3	89,8	< 0,0006*
H	67,9	91,8	<0,0001*
D	87,8	-	-

30 Con un nivel de alfa de 0,05, las comparaciones medias entre lotes malos de poloxámero no tratados y el lote de control positivo (D) demostraron diferencias significativas (Tabla 10). Después del tratamiento térmico, todos los lotes tuvieron un rendimiento significativamente mejor que el lote de control positivo, con la excepción de H, que era similar. El lote E, un lote bueno, tenía un valor $p > 0,05$, lo que indica que su rendimiento no fue significativamente diferente al del lote de control positivo. Sin embargo, el poloxámero tratado térmicamente del lote E tuvo un rendimiento significativamente mejor en la prueba en HSSF que el control positivo (valor de $p = 0,0005$), lo que demuestra que el proceso de tratamiento térmico mejoró un lote ya aceptable.

40 Estos resultados se ilustran en la **FIG. 10**, que muestra los resultados tratados y no tratados de cada lote en comparación con el conjunto global de datos de control positivo. Por ejemplo, la **FIG. 10** ilustra que para el lote G malo, el G no tratado, el lote D de control positivo y el G tratado térmicamente eran todos distinguibles estadísticamente, con el lote G tratado térmicamente mostrando una viabilidad significativamente mejor, en comparación con el lote de control positivo bueno (D) o el lote G no tratado.

45 Según este análisis, los casos en que el proceso de tratamiento térmico se consideró exitoso demostraron una mejora del 18 % respecto al material no tratado. Además, el material tratado funcionó al menos tan bien, globalmente, como el lote de control positivo utilizado en estos experimentos.

50 El tratamiento térmico de lotes malos de poloxámero antes de su uso en medios de cultivo celular fue un procedimiento eficaz para mejorar su rendimiento de protección celular. El tratamiento térmico fue eficaz en un amplio intervalo de temperaturas y duraciones; sin embargo, cuanto menor es la temperatura, mayor es el tiempo de tratamiento necesario. Este proceso fue robusto, demostrando resultados similares en varios lotes de poloxámero, y reproducible. Si bien los resultados presentados aquí provienen de experimentos realizados en un horno, el proceso puede transferirse a equipos a mayor escala. El proceso de tratamiento térmico descrito en el presente documento puede transferirse a cualquier procedimiento de tratamiento que garantice el calentamiento homogéneo del poloxámero durante la duración requerida a la temperatura necesaria.

Ejemplo 11: Análisis estadístico de los datos de la prueba del DOE

5 Los ejemplos descritos anteriormente demuestran el efecto del tratamiento térmico del poloxámero en el rendimiento subsiguiente en cultivo celular (por ejemplo, la viabilidad celular). A continuación, se realizaron análisis para producir una función de transferencia, que es un modelo matemático del resultado (viabilidad a las 3 horas en un modelo de matraz agitado) en función de las dos variables dependientes (temperatura y tiempo).

10 Los datos de la prueba del DOE (descritos en la Tabla 12) recopilados en un horno con temperatura y tiempo como variables se analizaron en Minitab mediante el procedimiento de regresión de superficie de respuesta. Un lote malo conocido de poloxámero (G) se trató térmicamente según el diseño de la prueba de DOE y se sometió a prueba en un modelo de matraz agitado con alta velocidad de cizallamiento utilizado como sustituto de la funcionalidad de protección contra el cizallamiento. Una mayor viabilidad al final de la prueba de 3 horas indica un mejor rendimiento del poloxámero. Del mismo modo, se realizó una evaluación entre el mismo lote de poloxámero que se ha tratado para mejorar el rendimiento en comparación con una muestra no tratada (control negativo). Para tener en cuenta la variabilidad intralote observada en los lotes de bajo rendimiento, se usó la viabilidad final promedio de seis controles G como valor de referencia para calcular el porcentaje de mejoras de viabilidad observadas para cada caso sometido a prueba. La viabilidad (%) a las 3 horas y la diferencia en los lotes tratados frente a los no tratados (%) fueron las variables de respuesta. Los resultados muestran que la calidad de este lote de bajo rendimiento se puede mejorar según lo medido por el incremento de la viabilidad. El objetivo de viabilidad deseado de un cambio positivo en la viabilidad (lote tratado-lote no tratado) se puede lograr con diversos tratamientos de temperatura y tiempo.

25 El análisis se realizó con el cambio en la viabilidad (lote tratado - lote no tratado) a las 3 horas. Dado que la viabilidad final promedio de uno de los lotes de bajo rendimiento estudiados en condiciones de estrés, G, se encontró que era de 79,7 +/- 5,0 %, se fijó como objetivo un aumento del 10 % o 20 % en la viabilidad para la gráfica de contorno y para establecer la duración mínima del tratamiento térmico a una temperatura designada. También se debe tener en cuenta que en el caso de otro lote de rendimiento bajo, el C, se pueden esperar viabilidades más bajas (44,8 +/- 7,8 %) que las observadas para G para el control no tratado. Por lo tanto, puede esperarse una mejora > 35 % en las viabilidades para C en condiciones en las que se logró un aumento del 20 % para el lote G. Estos resultados indican que existe un efecto lineal de temperatura y tiempo, interacción de temperatura y tiempo. Los términos en los modelos son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95 % con un valor $P < 0,05$. La identificación del intervalo operativo óptimo y los factores en el modelo son hallazgos inesperados y novedosos.

35

Tabla12. Conjunto de datos para el tratamiento térmico del lote G.

Número de lote	Tiempo, min	Temperatura, °C	Viabilidad a las 3 h	Mejora de viabilidad (respecto al promedio de control no tratado) %
G	1	110	74,9	-4,77
G	5	140	77,05	-2,62
G	10	170	88,9	9,23
G	30	185	89,5	9,83
G	60	155	88,65	8,98
G	120	125	82,25	2,58
G	10	140	91,3	11,63
G	1	155	93,6	13,93
G	30	140	95,5	15,83
G	120	185	95,85	16,18
G	1	185	93,9	14,23
G	5	155	92,6	12,93
G	10	125	73,4	-6,27
G	30	110	51,9	-27,77
G	60	140	93,7	14,03
G	120	170	82,6	2,93
G	60	110	82,1	2,43
G	120	140	95,9	16,23
G	1	140	68,5	-11,17
G	5	170	94,5	14,83
G	10	185	95,6	15,93
G	30	155	95,2	15,53
G	60	125	68,15	-11,52
G	120	110	94,75	15,08
G	1	140	91,5	11,83
G	30	140	89,5	9,83
G	30	140	90	10,33
G	1	155	90,8	11,13
G	1	155	90,7	11,03
G	30	155	89,5	9,83
G	1	170	90,6	10,93
G	30	170	89,4	9,73
G	120	60	77,2	-2,47
G	120	80	74,7	-4,97

Experimento por duplicado del modelo de HSSF

5

Como software de análisis, se utilizó Minitab versión 17.1 (Minitab.com, State College PA). El análisis fue el análisis de regresión (RSRegress). Se utilizó la regresión de superficie de respuesta para analizar la mejora de la viabilidad (respecto al lote no tratado) frente al tiempo (min) y la temperatura (°C).

10

El análisis de la varianza, el resumen del modelo y los coeficientes codificados se proporcionan a continuación en las Tablas 13-15.

Tabla 13. Análisis de la varianza

Fuente	GL	SC aj.	CM aj.	Valor de F	Valor de p
Modelo	5	1666,90	333,38	5,29	0,002
Lineal	2	1369,54	684,77	10,87	0,000
Tiempo, min	1	484,39	484,39	7,69	0,010
Temp. °C	1	1356,83	1356,83	21,54	0,000
Cuadrado	2	203,14	101,57	1,61	0,217
(Tiempo, min) ²	1	12,47	12,47	0,20	0,660
(Temperatura, °C) ²	1	201,47	201,47	3,20	0,085
Interacción bidireccional	1	432,89	432,89	6,87	0,014
(Tiempo, min) * (Temperatura, °C)	1	432,89	432,89	6,87	0,014
Error	28	1764,05	63,00		
Falta de ajuste	22	1455,72	66,17	1,29	0,403
Error puro	6	308,33	51,39		
Total	33	3430,94			

Tabla 14. Resumen del modelo.

5

S	R ²	R ² (aj)	R ² (prev)
7,93736	48,58 %	39,40 %	8,41 %

Tabla 15. Coeficientes codificados.

Término	Efecto	Coef.	EE Coef.	Valor T	Valor de p	FIV
Constante		1,59	3,01	0,53	0,602	
Tiempo, min	16,01	8,01	2,89	2,77	0,010	2,49
Temp. °C	41,89	20,94	4,51	4,64	0,000	2,31
(Tiempo, min) ²	3,32	1,66	3,73	0,44	0,660	1,08
(Temperatura, °C) ²	-22,36	-11,18	6,25	-1,79	0,085	2,37
(Tiempo, min) * (Temperatura, °C)	-24,78	-12,39	4,73	-2,62	0,014	2,22

10 En base a estos resultados, se determinó una ecuación de regresión (en unidades no codificadas) como: Mejora de viabilidad (respecto al lote no tratado), % = -113,5 + 0,486* (Tiempo, min) + 1,238* (Temperatura, °C) + 0,00047* (Tiempo, min)² -0,00286* (Temperatura, °C)² - 0,00333* (Tiempo, min)* (Temperatura, °C)

15 La función de transferencia que se muestra anteriormente predice la mejora en la viabilidad del lote G respecto al control no tratado en función de la temperatura y la duración del tratamiento térmico. También contiene términos de segundo orden que involucran temperatura y tiempo y su interacción. Usando el modelo anterior, se puede obtener la viabilidad esperada para un caso de prueba (no derivado empíricamente). A continuación se muestra una predicción de resultado de muestra para condiciones de prueba de 157 °C y 1 minuto:

20 Mejora de viabilidad = -113,5 + (0,486 *1) + (1,238 * 157) + 0,00047 *1²) - (0,00286 *157²) - (0,00333 *1* 157) = 10,3 %

25 Los datos experimentales se usaron para generar la gráfica de contorno que se muestra en la **FIG. 11** (los datos empíricos se muestran en círculos negros). Según el modelo generado por la regresión, se pueden inferir matemáticamente 5 puntos.

Primero, la respuesta al tratamiento se puede clasificar en tres zonas de temperatura (157 °C -185 °C). (134 °C -157 °C) y (60 °C-134 °C).

30 Segundo, en la zona de alta temperatura de 157 °C -185 °C, la viabilidad de los lotes tratados térmicamente se puede mejorar del 1 al 20 % dentro de un tratamiento térmico mínimo de un minuto.

Tercero, en la zona de temperatura media de 134 °C -157 °C, la viabilidad de los lotes tratados térmicamente se

puede mejorar entre 1 y 10 % dentro de una duración mínima de tratamiento térmico de 1 minuto. Las viabilidades se pueden mejorar hasta un 20 % con una duración mínima de tratamiento térmico de 120 minutos.

5 Cuarto, en la zona de baja temperatura de 60 °C -134 °C, la viabilidad de los lotes tratados térmicamente se puede mejorar hasta un 10 % dentro de una duración del tratamiento térmico de 140 minutos. Las viabilidades se pueden mejorar hasta un 20 % con una duración mínima de tratamiento térmico de 164 minutos. Se debe observar que las duraciones descritas para las zonas de temperatura media y baja son pautas simplificadas. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 11 las temperaturas de 60 °C, 80 °C, 120 °C dentro de la zona de baja temperatura requieren 164 minutos, 147 minutos y 115 minutos, respectivamente, para lograr al menos un 10 % de mejora en la viabilidad. En la Tabla 16 a continuación se describen valores ejemplares.

Tabla 16. Temperaturas, tiempos ejemplares y mejoras de viabilidad correspondientes.

Intervalo de temperatura, °C	Tiempo mínimo requerido para la mejora de la zona gris claro (1-10 %), min	Tiempo mínimo requerido para la mejora de la zona gris oscuro (10-20 %), min	Tiempo mínimo requerido para la mejora de la zona gris oscuro (> 20 %), min.
60	143	164	186
80	122	147	175
100	98	132	166
120	62	115	162
134	1	102	163
157	1	1	NA
185	1	1	NA

15 Quinto, el modelo expuesto anteriormente se derivó de los datos generados con el lote G. Dado que el control no tratado tenía una viabilidad basal más alta del 79 %, las mejoras de viabilidad se pueden realizar hasta un máximo del 20 %. Sin embargo, para lotes tales como C, donde el lote no tratado tenía una viabilidad mucho menor del 45 %, se pueden lograr niveles más altos de mejora. Por ejemplo, en la zona de temperatura media de 134 °C -157 °C, la viabilidad se puede mejorar en un 42 % dentro de una duración del tratamiento térmico de 15 minutos para el lote C. Las diferencias observadas en el rendimiento entre los lotes C y G se resumen en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17. Resumen del rendimiento de C y G

C		G	
Parámetro	Viabilidad de la muestra (%) a las 3 h	Parámetro	Viabilidad de la muestra (%) a las 3 h
Promedio	44,8	Promedio	79,7
DE	7,4	DE	5,0
N	6	N	6

25 Por lo tanto, el valor del tratamiento térmico es más pronunciado en lotes como C. No se pudo realizar un conjunto de datos completo para este lote debido a la falta de materia prima para realizar un conjunto completo de experimentos. G representa un lote con un rendimiento mínimamente pobre y el modelo predicho anteriormente puede considerarse conservador. Los datos generados con los lotes C y G demuestran que el tratamiento térmico del poloxámero puede mejorar el rendimiento de otros lotes de poloxámero no sometidos a prueba aquí. Las mejoras en el rendimiento pueden verse afectadas por el tiempo y la temperatura como se describe anteriormente. Los resultados descritos anteriormente demuestran que el aumento de la temperatura acorta la duración del tratamiento térmico requerido para mejorar el rendimiento del poloxámero, y que se pueden usar temperaturas más bajas para mejorar el rendimiento del poloxámero durante períodos más prolongados. Sin desear comprometerse con ninguna teoría, se cree que el porcentaje exacto de mejora de la viabilidad observado con el tratamiento térmico dependerá de la viabilidad basal observada para un lote de poloxámero particular antes del tratamiento térmico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un poloxámero para su uso en un medio de cultivo celular, que comprende las etapas de:
- 5 (a) calentar un poloxámero sólido a al menos 60 °C para formar un poloxámero líquido; en el que
- a1) el poloxámero se calienta a entre 157 °C y 185 °C durante al menos 1 minuto; o
- 10 a2) el poloxámero se calienta a entre 134 °C y 157 °C durante al menos 30 minutos; o
- a3) el poloxámero se calienta a entre 120 °C y 134 °C durante al menos 62 minutos; o
- 15 a4) el poloxámero se calienta a entre 100 °C y 120 °C durante al menos 98 minutos; o
- a5) el poloxámero se calienta a entre 80 °C y 100 °C durante al menos 122 minutos; o
- a6) el poloxámero se calienta a entre 60 °C y 80 °C durante al menos 143 minutos; y
- 20 (b) enfriar el poloxámero líquido a una temperatura inferior a 50 °C para formar un poloxámero sólido tratado térmicamente, en el que el enfriamiento no se realiza en un dispositivo de granulación o molienda, en el que el poloxámero comprende un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno, en el que la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero tratado térmicamente se incrementa en al menos un 10 % en comparación con la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a), en el que la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende un poloxámero no tratado está por debajo 80 %, y en el que la viabilidad celular se mide como en la descripción.
- 25 de la etapa (a), en el que la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende un poloxámero no tratado está por debajo 80 %, y en el que la viabilidad celular se mide como en la descripción.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
- 30 a1) el poloxámero se calienta a entre 157 °C y 185 °C durante entre 1 minuto y 250 minutos; o
- a2) el poloxámero se calienta a entre 134 °C y 157 °C durante entre 30 minutos y 250 minutos; o
- a3) el poloxámero se calienta a entre 120 °C y 134 °C durante entre 62 minutos y 250 minutos; o
- 35 a4) el poloxámero se calienta a entre 100 °C y 120 °C durante entre 98 minutos y 250 minutos; o
- a5) el poloxámero se calienta a entre 80 °C y 100 °C durante entre 122 minutos y 250 minutos; o
- 40 a6) el poloxámero se calienta entre 60 °C y 80 °C durante entre 143 minutos y 250 minutos.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la viabilidad celular se incrementa en al menos un 20 %.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la viabilidad celular se incrementa en al menos un 30 %.
- 45 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la viabilidad celular en un medio de cultivo celular que comprende el poloxámero antes de la etapa (a) es inferior al 80 % después de 3 horas de cultivo celular.
- 50 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el poloxámero líquido en la etapa (b) se enfría a temperatura ambiente, de 2 °C a 8 °C, o por debajo de 0 °C.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el poloxámero se calienta a vacío.
- 55 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el poloxámero líquido se enfría durante al menos 20 minutos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el poloxámero tratado térmicamente producido en la etapa (b) se agrega a un medio de cultivo celular.
- 60 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las etapas (a) y (b) se repiten al menos una vez antes de agregar el poloxámero tratado térmicamente al medio de cultivo celular.
- 65 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el poloxámero se ha tratado mediante un proceso de granulación antes de la etapa (a).

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el poloxámero
- a) tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$, en la que n es de 60 a 150 y m es de 25 a 60; y/o
 - 5 b) tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 55 °C; y/o
 - c) tiene un peso molecular promedio de 6.000 a 18.000 Daltons; y/o
 - 10 d) comprende un copolímero que tiene una fórmula de $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ con n que tiene un valor de 80, con m que tiene un valor de 27, y el poloxámero tiene un peso molecular promedio de 7680 a 9510 g/mol; y/o
 - e) es poloxámero 188.
- 15 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la célula es
- a) una célula de mamífero; y/o
 - 20 b) una célula de ovario de hámster chino (CHO); y/o
 - c) una célula de insecto.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la célula produce un polipéptido.
- 25 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

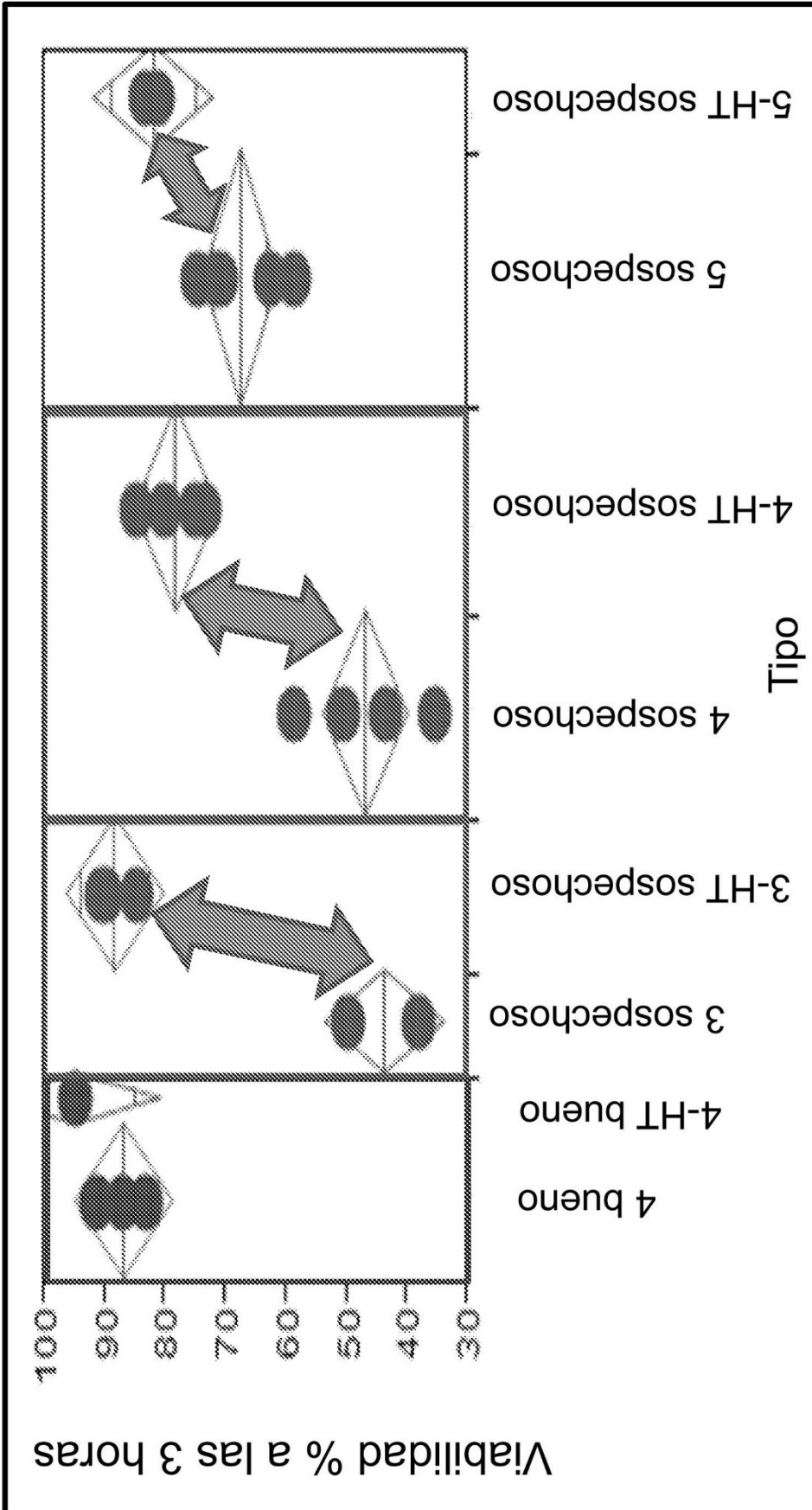


FIG. 1

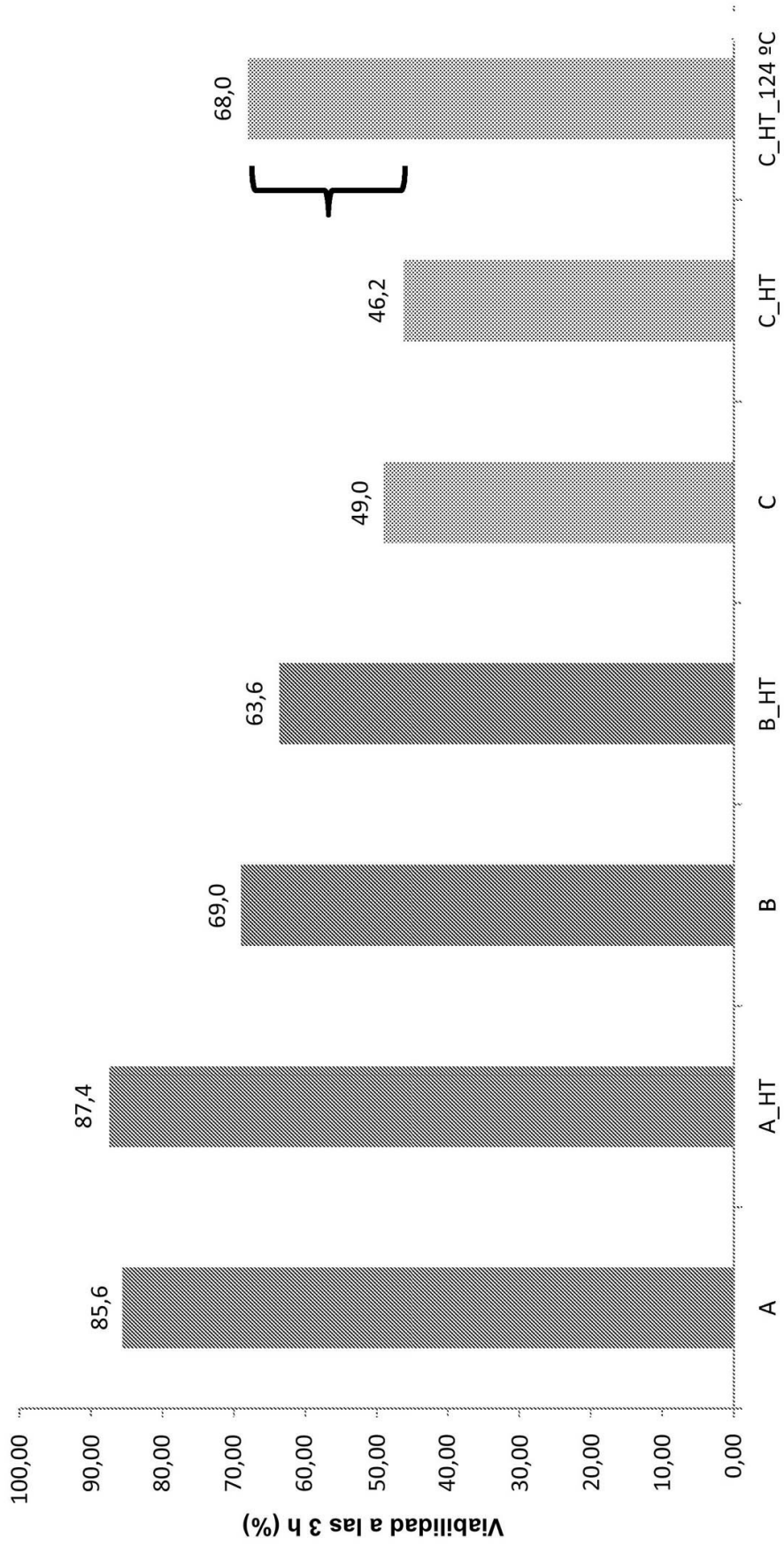


FIG. 2

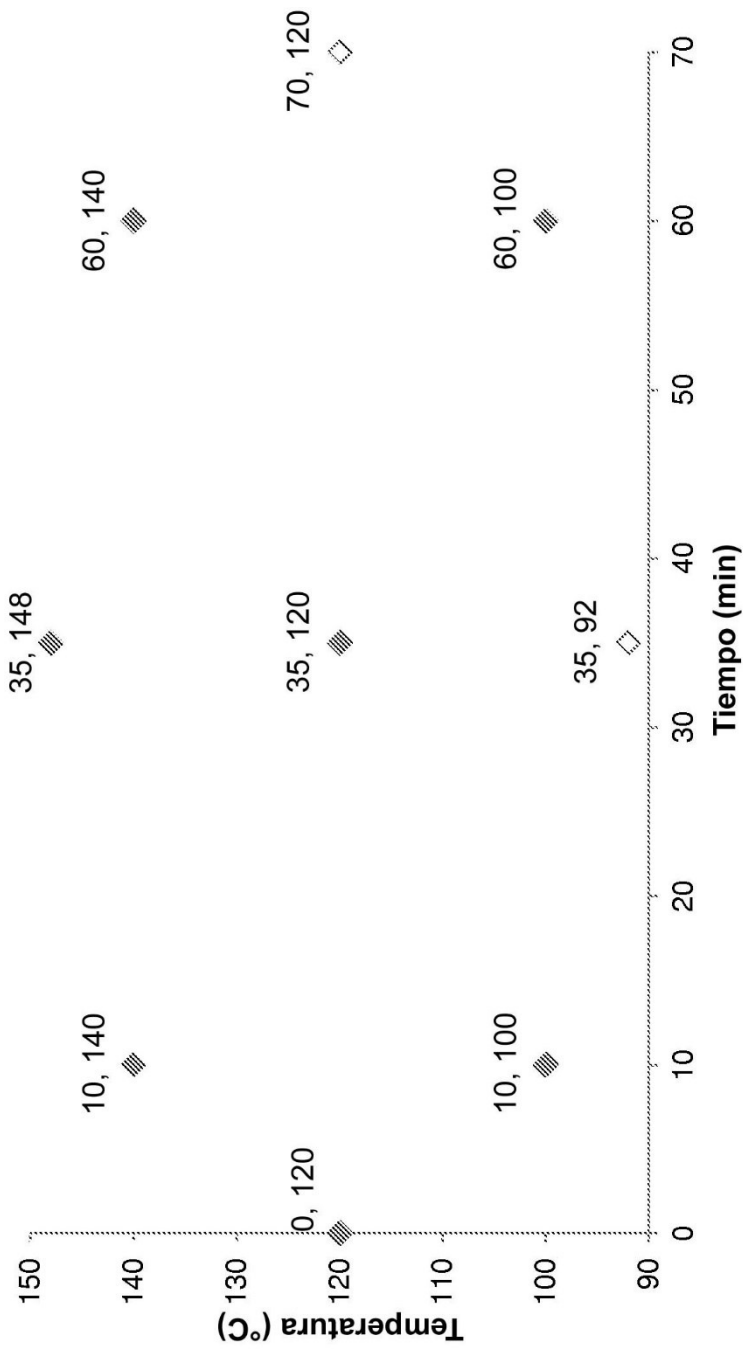


FIG. 3

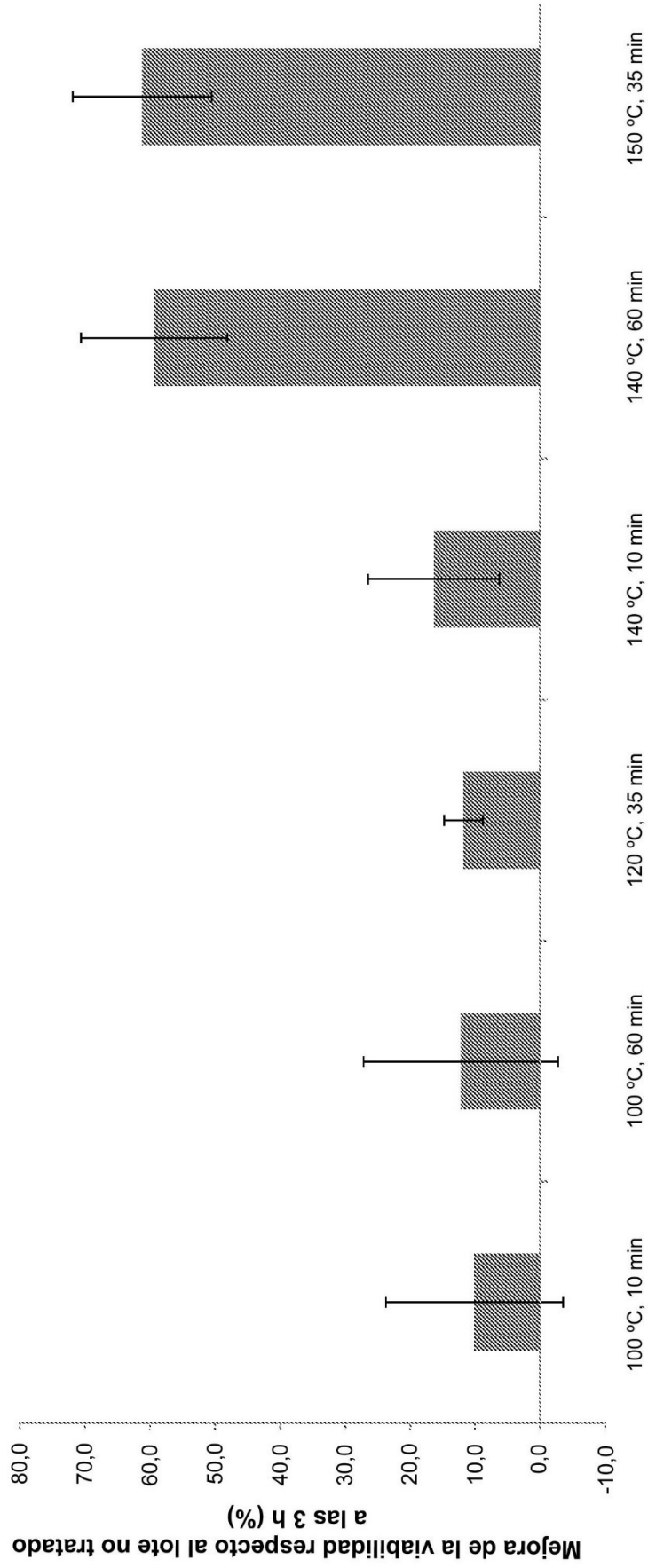


FIG. 4

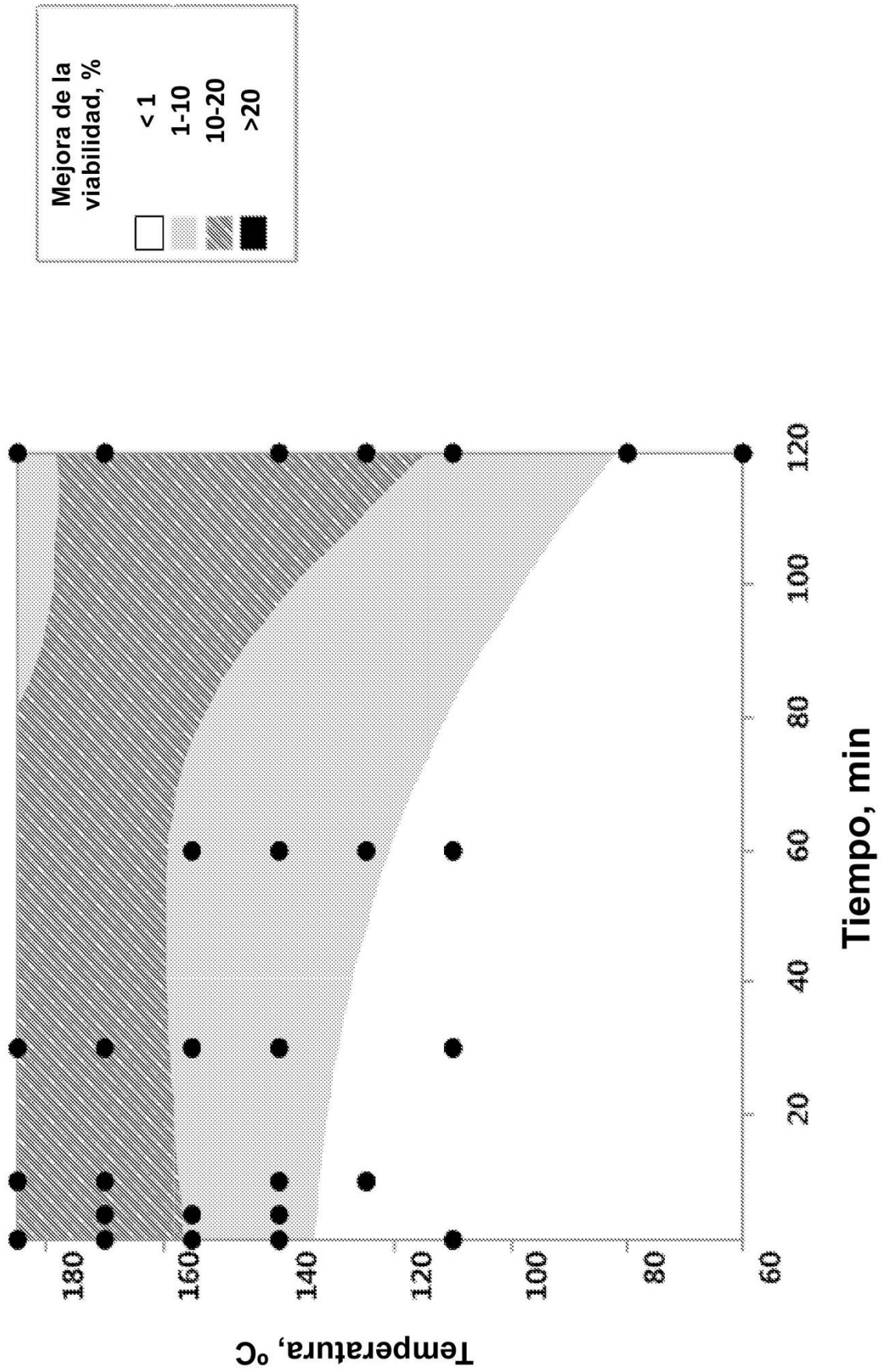


FIG. 5

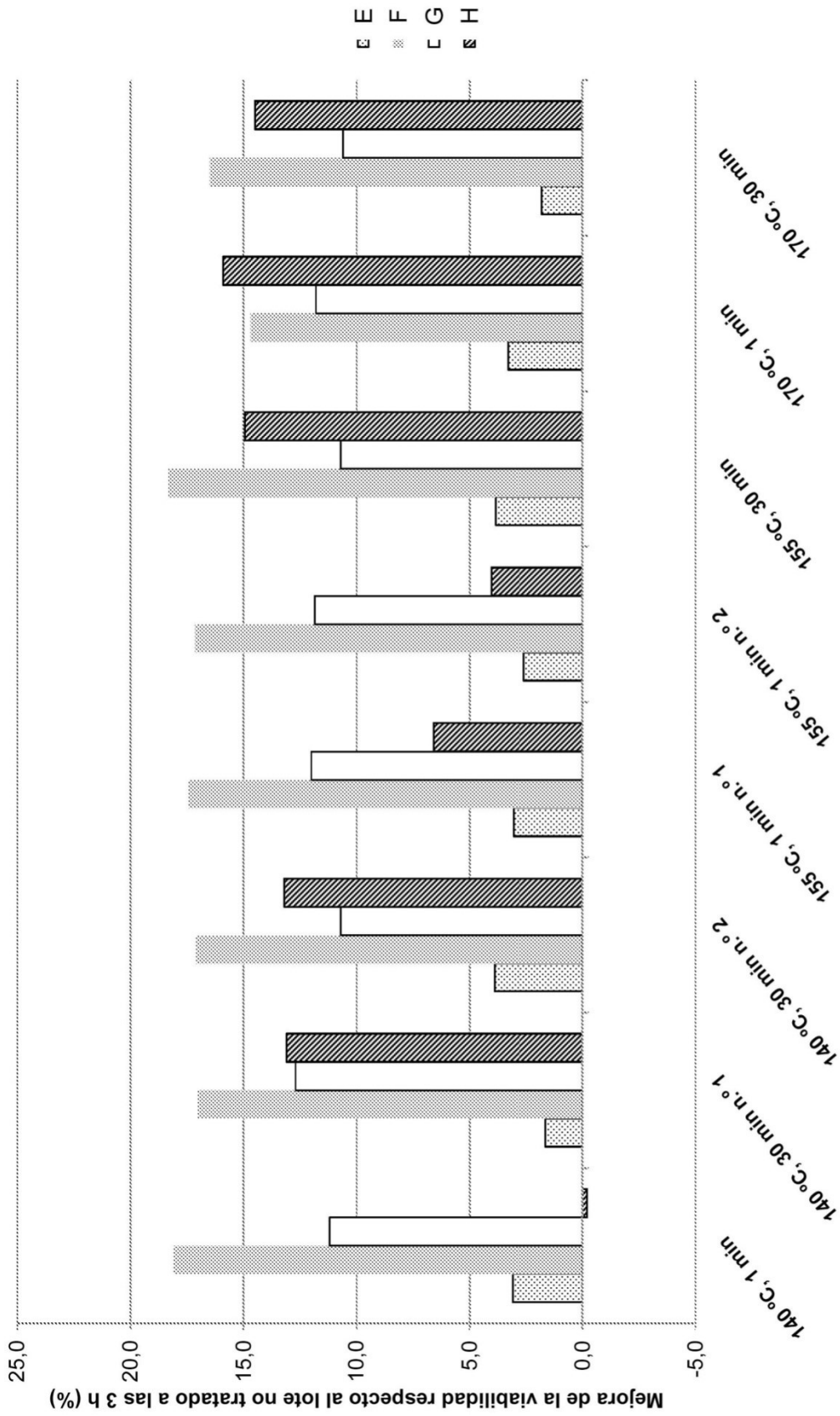


FIG. 6

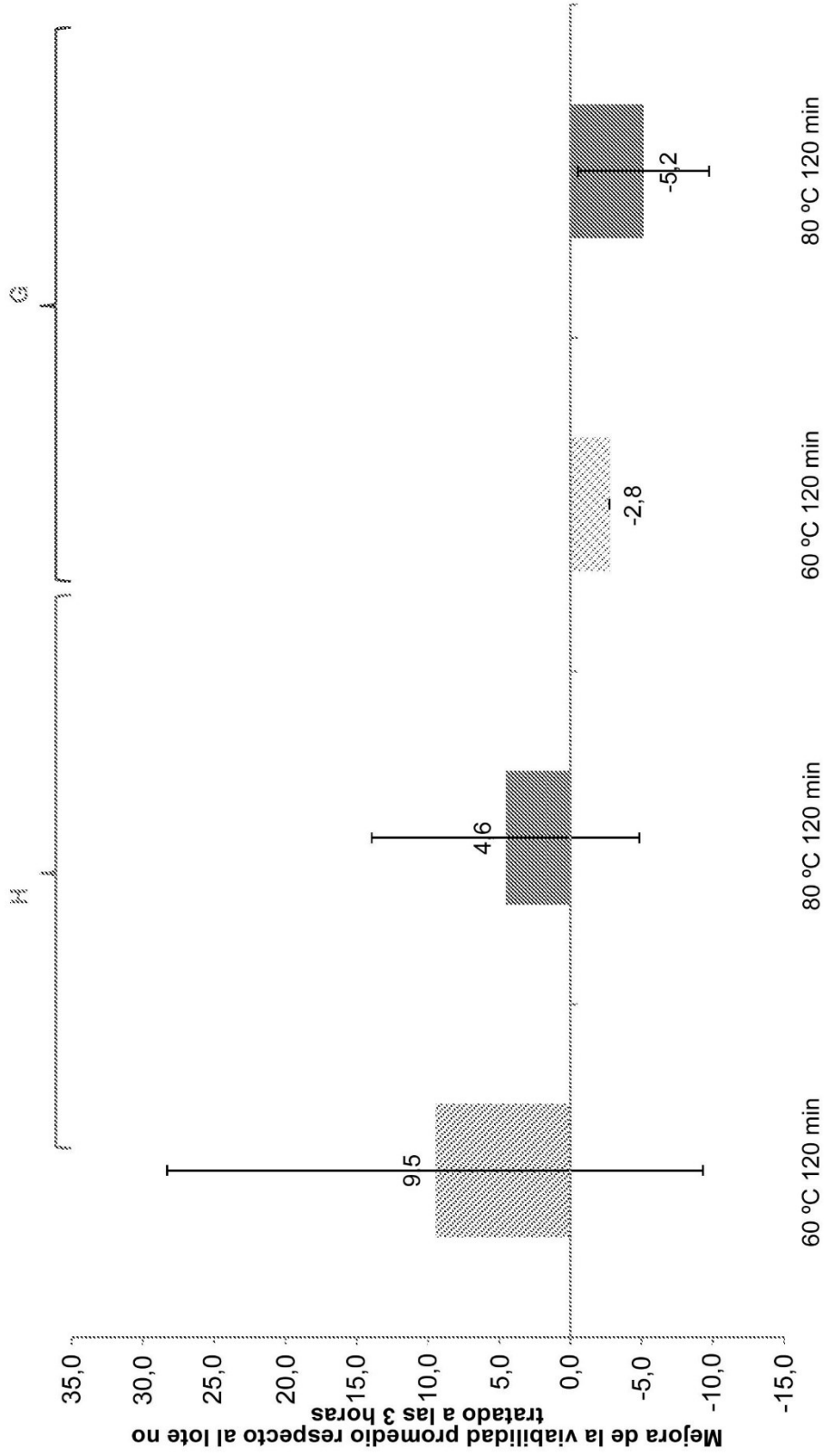


FIG. 7

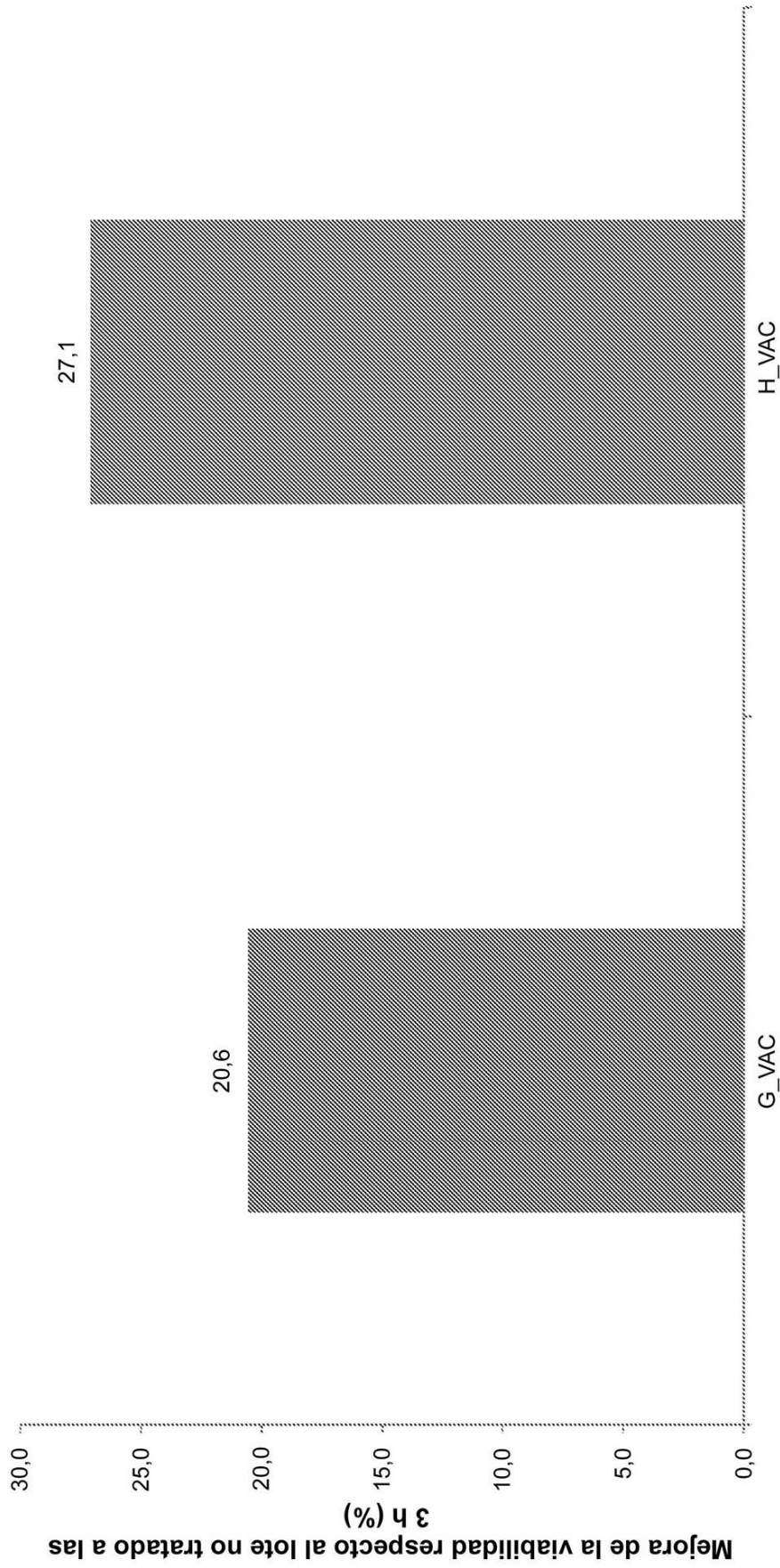


FIG. 8

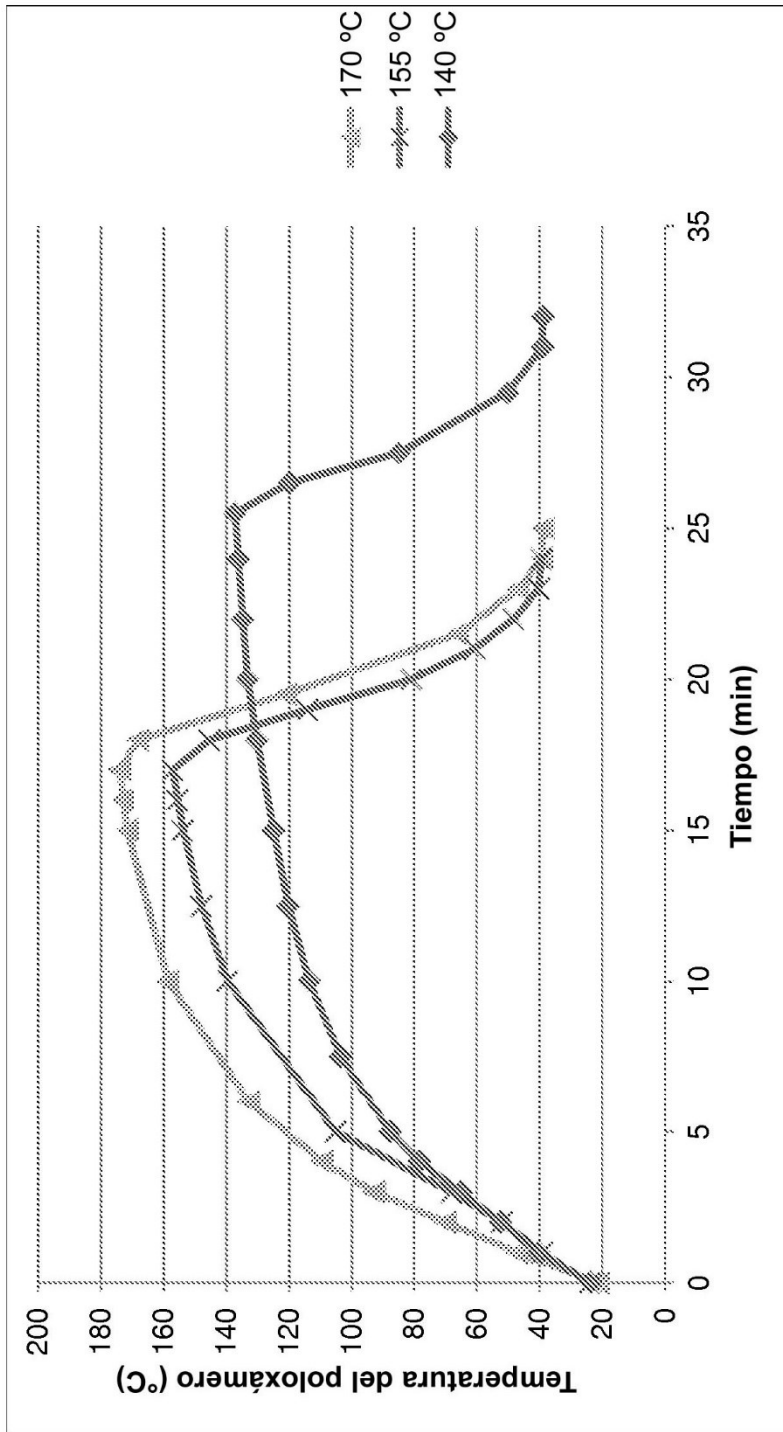


FIG. 9

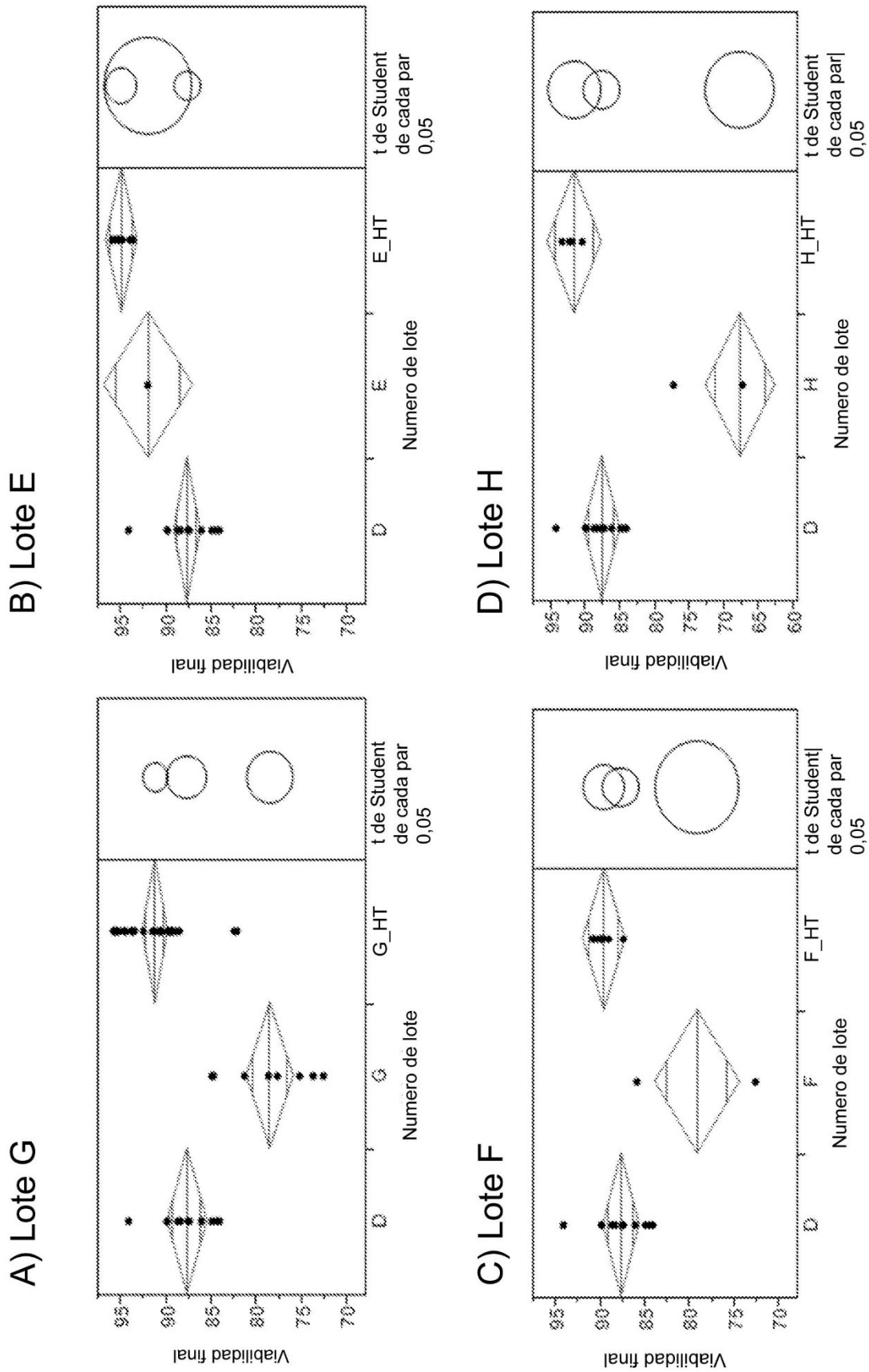


FIG. 10

Gráfica de contorno: Mejora de la viabilidad respecto al lote no tratado, %

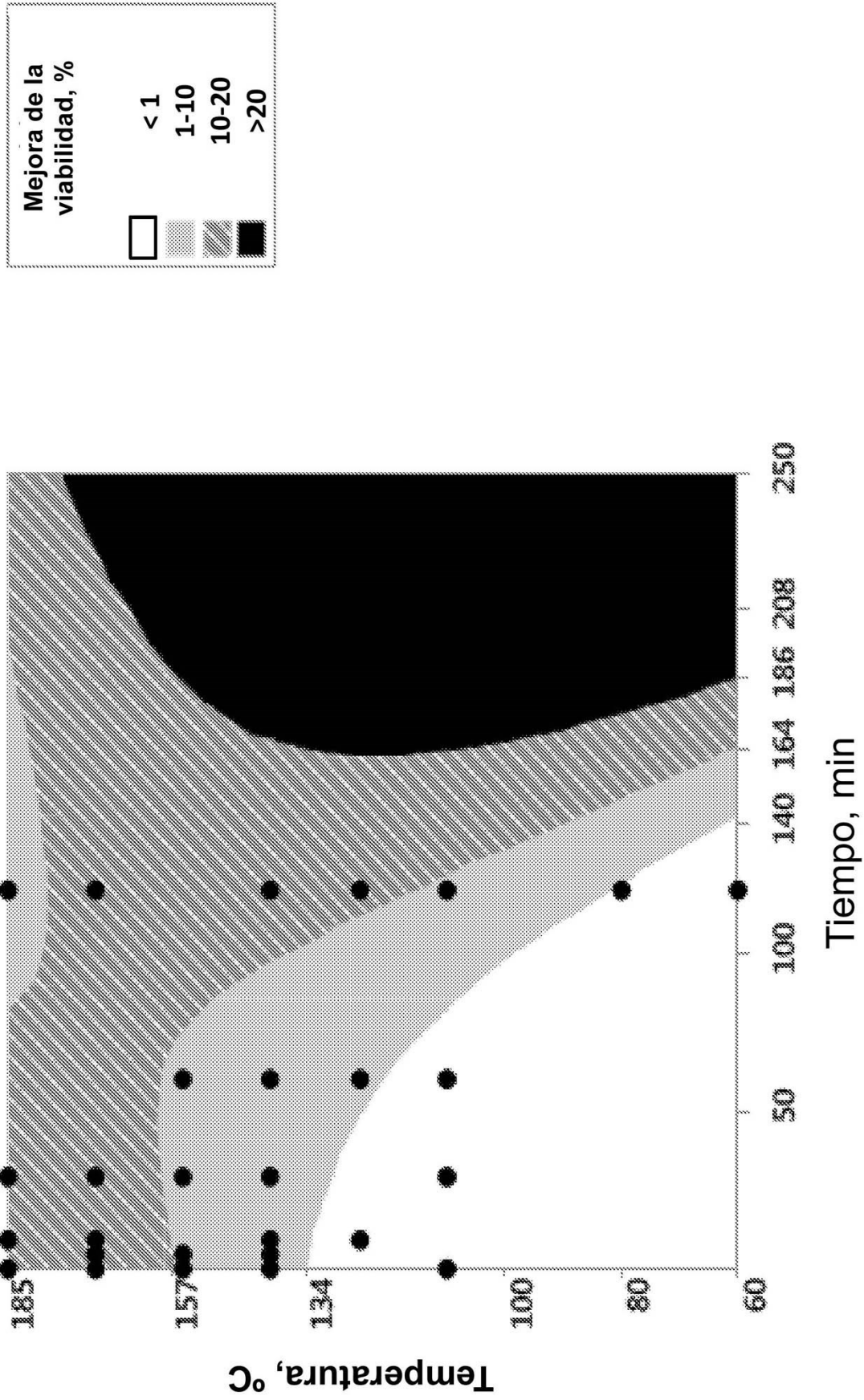


FIG. 11