

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 775**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2015 PCT/US2015/013524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15116820**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2015 E 15742902 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3099324**

54 Título: **Medios de perfusión**

30 Prioridad:

**30.01.2014 US 201461933665 P**

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

**30.09.2020**

73 Titular/es:

**COHERUS BIOSCIENCES, INC (100.0%)  
333 Twin Dolphin Drive, Suite 600  
Redwood City, CA 94065, US**

72 Inventor/es:

**PUCHACZ, ELA y  
GROVE, JAMES, RUSSELL**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 784 775 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

Medios de perfusión

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a medios adecuados para la fabricación de una proteína terapéutica en un proceso de perfusión.

## 10 Antecedentes de la invención

Las proteínas tales como las destinadas a aplicaciones farmacéuticas pueden fabricarse ya sea mediante el uso de un método por lotes o por lotes alimentados o un método de perfusión. La presente invención se dirige a procesos de perfusión, que incluyen los usados para fabricar proteínas terapéuticas.

15

Los procesos de perfusión para la fabricación de proteínas terapéuticas son sensibles a los cambios en la composición de los medios de cultivo, la temperatura, la acumulación de desechos metabólicos y los parámetros físicos y químicos del biorreactor. Las condiciones inadecuadas o fluctuantes afectan las modificaciones postraduccionales de la proteína, tal como su perfil de glicosilación, siendo conocido este último por su correlación con las propiedades farmacocinéticas.

20

El procesamiento de perfusión es conveniente sobre el procesamiento por lotes alimentados ya que permite una producción de más producto en un período de tiempo dado con un costo de bienes mejorado. Por lo tanto, es conveniente superar los desafíos de desarrollar condiciones de alimentación adecuadas que respalden un proceso de perfusión.

25

La patente de Estados Unidos 7,300,773 y el documento EP 1,781,802 describen la producción de la proteína de fusión TNFR-IG mediante el uso de un proceso por lotes alimentados en el que se prescriben medios de alimentación que tienen concentraciones específicas de aminoácidos y/o iones inorgánicos.

Breve descripción de las figuras

30

La Figura 1 es un gráfico de densidad de células viables (VCD) de cultivos que contienen las concentraciones más bajas de alimentación (SF3 y SF4) de acuerdo con la presente invención.

35

La Figura 2 es un gráfico de VCD de cultivos que contienen medios más altamente enriquecidos en nutrientes.

La Figura 3 es un gráfico de los niveles de amoníaco en los cultivos que contienen medios más altamente enriquecidos en nutrientes.

40

La Figura 4 es un gráfico de barras de la producción de proteínas en los medios reducidos en nutrientes y los medios más altamente enriquecidos en nutrientes.

45

La Figura 5 es una imagen de un gel de enfoque isoeléctrico (IEF) que contiene la distribución de especies cargadas del medio basal SFM4CHO que se suplementa con dos concentraciones diferentes de alimentación Cell Boost 5, así como también la de etanercept comercial (Enbrel®).

La Figura 6 es un gráfico de VCD de cultivos que contienen 10 % y 20 % de alimentación CHOZN.

La Figura 7 también es un gráfico de VCD de cultivos que contienen 10 % y 20 % de alimentación CHOZN.

50

La Figura 8 es una imagen de un gel de IEF que contiene la distribución de isoformas en productos aislados de cultivos que contienen 10 % y 20 % de cultivos de alimentación; así como también el del estándar de referencia.

La Figura 9 es un gráfico de barras de la producción de proteínas en los cultivos que contienen una concentración de alimentación más escasa (10 %) y más abundante (20 %).

55

La Figura 10 es un gráfico de VCD y la viabilidad del cultivo crecido como se describe en el Ejemplo 7.

Resumen de la invención

60

Ahora hemos descubierto que los medios que se usan en un proceso de perfusión deben ser sustancialmente menos abundantes en términos de contenido de nutrientes, en particular el contenido de aminoácidos, que los medios destinados para su uso en un proceso por lotes o por lotes alimentados. Para los fines de la presente descripción, el contenido de nutrientes debe entenderse como la concentración de nutrientes dados en el volumen del reactor de perfusión. En particular, nuestra invención considera un método para la fabricación de una proteína que comprende la etapa de producir la proteína mediante el cultivo celular por perfusión de células CHO (ovario de hámster chino) en un medio de alimentación que comprende una concentración total de aminoácidos en el intervalo de 15 a 50 mM, en donde la proteína es una

65

proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral)-Fc o un anticuerpo anti-TNF. En diversas modalidades de la invención, la concentración total de aminoácidos está en un intervalo seleccionado de: 15 a 20 mM; 20 a 25 mM; 25 a 30 mM; 30 a 35 mM; 35 a 40 mM; 40 a 45 mM; y entre 45 a 50 mM.

5 Las concentraciones totales de aminoácidos prescritas en la presente descripción son inferiores a las recomendadas para ambos procesos por lotes alimentados y de perfusión en la patente de Estados Unidos 7,300,773. A modo de comparación, la patente de Estados Unidos 7,300,773 requiere una concentración total de aminoácidos superior a 70 mM. A pesar de la afirmación en la patente '773 que las personas expertas en la técnica entenderán que tales concentraciones pueden emplearse en sistemas de perfusión (ver columna 18, líneas 5 a 11), la presente descripción se basa en parte en  
10 nuestro hallazgo, por el contrario, que llevar a cabo un proceso de perfusión para la fabricación de una proteína terapéutica mediante el uso de medios de alimentación que satisfagan las altas concentraciones totales de aminoácidos prescritas en la patente '773 resulta en la producción de cantidades sustancialmente reducidas de la proteína deseada y, por lo tanto, que las concentraciones de aminoácidos en los medios destinados a la perfusión deben necesariamente reducirse, y preferentemente reducirse sustancialmente, en términos de concentración total de aminoácidos. Siempre y cuando se  
15 cumplan las restricciones de la concentración de aminoácidos de la presente invención, las personas expertas en la técnica deben entender que varios componentes que no son aminoácidos típicamente empleados en los medios de alimentación (por ejemplo, vitaminas, hidrolizados, etc.) pueden ajustarse empíricamente en un manera conocida sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente enseñanza.

20 Los medios de alimentación pueden caracterizarse además por uno o más de los siguientes criterios: una relación molar de glutamina a asparagina acumulada mayor que 2; una relación molar de glutamina a concentración total de aminoácidos mayor que 0,2; una relación molar de iones inorgánicos a aminoácidos totales mayor que 1; y una cantidad combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen de menos de 16 mM. Se debe entender que estos criterios denotan concentraciones y cantidades en estado estacionario en el recipiente de la reacción de perfusión.

25 La presente descripción también se refiere a la modificación de un medio de alimentación que de otro modo es adecuado para la producción por lotes alimentados de una proteína terapéutica con el fin de hacer que dicho medio sea adecuado para su uso en un proceso de perfusión para la fabricación de la proteína, donde la modificación comprende reducir la riqueza de nutrientes del medio de los lotes alimentados de manera que, cuando se usa en el reactor de perfusión, la concentración total de aminoácidos de los medios de alimentación está en el intervalo de aproximadamente 40 a  
30 aproximadamente 95 por ciento, y preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 por ciento de la concentración total de aminoácidos del medio de alimentación de los lotes alimentados. Preferentemente, este método logra uno o ambos de (i) un título de producción comparable al que puede lograrse con un proceso por lotes alimentados mediante el uso del alimento con mayor contenido de nutrientes; y/o (ii) una reducción sustancial en los niveles de amoniaco que de otro modo se generarían en el reactor de perfusión si tal proceso de perfusión se realizara mediante el uso de los mismos medios que los usados en un proceso por lotes alimentados.

35 En una modalidad de la invención, el método de perfusión usa las siguientes etapas: (a) preparar una mezcla que comprende células capaces de expresar una proteína terapéutica deseada, y un medio de cultivo adecuado para llevar a cabo tal expresión; (b) en un recipiente adecuado que contiene la mezcla, que hace que las células produzcan la proteína; y (c) retirar periódica o continuamente el medio de cultivo gastado y añadir medio de cultivo fresco al recipiente de  
40 reacción.

45 La invención puede aplicarse a la fabricación de proteínas de fusión TNFR-Fc (a veces denominadas TNFR-Ig) y anticuerpos anti-TNF. Otros ejemplos no limitantes de proteínas adecuadas para la fabricación en la presente invención incluyen etanercept, adalimumab, infliximab, así como también variantes biosimilares o biomejores de las mismas. Debe entenderse que el proceso de perfusión de la invención no se limita a alguna proteína terapéutica específica. Por lo tanto, pueden producirse otras proteínas de fusión TNFR-Fc y anticuerpos anti-TNF que los mencionados aquí.

50 En una modalidad adicional, la invención es un método para producir una proteína terapéutica que comprende las etapas de (a) preparar una mezcla que comprende células CHO capaces de expresar la proteína, y un medio de cultivo adecuado para llevar a cabo tal expresión; (b) en un recipiente adecuado que contiene la mezcla, lo que provoca que las células produzcan la proteína; y (c) retirar periódica o continuamente el medio de cultivo gastado y añadir medio de cultivo fresco al recipiente de reacción, en donde el medio de cultivo comprende (i) una concentración total de aminoácidos de  
55 aproximadamente 15 a aproximadamente 50 mM; y al menos uno de: un medio base adecuado (por ejemplo, SFM4CHO®, BalanCD® CHO Growth A, HyCell® CHO, etc.), una alimentación compleja definida químicamente (por ejemplo, BalanCD® CHO Alimento 1), dexametasona, ManNAc, hidrolizado de semillas de algodón y D-(+)-galactosa.

60 En una modalidad adicional del método de perfusión, antes de la etapa (a), las células capaces de expresar etanercept se cultivan en una fase de crecimiento a una temperatura seleccionada de; (i) 28 a 37 °C; y (ii) 35 ° a 36 °C.

65 En otra modalidad del método de perfusión, durante la producción del etanercept que ocurre en las etapas (b) y (c) anteriores, el recipiente de reacción se mantiene a una temperatura seleccionada de (i) mayor que 32 °C; (ii) mayor que 34 °C; (iii) mayor que 35 °C; (iv) el intervalo de 33 °C a 36 °C; (v) el intervalo de 35 °C a 36 °C; (vi) 32,5 °C; (vii) 33,5 °C; (viii) 34,5 °C; y (ix) 35,5 °C. La capacidad de producir una excelente calidad del producto, proteínas debidamente plegadas y títulos excelentes a estas temperaturas es sorprendente e inesperada, dado que, al contrario, las enseñanzas en la

técnica se dirigen al uso de temperaturas más bajas durante la fase de producción (en comparación con la fase de crecimiento) en un proceso de fabricación de proteína.

5 En cualquiera de las modalidades anteriores, un intervalo preferido de concentración de aminoácidos es de 15 a 30 mM y los medios pueden incluir medios definidos y no definidos.

Se puede entender que términos tales como "cultivo", "densidad celular", "viabilidad celular", "título", "medio" (o "medios"), "siembra", "fase de crecimiento", "fase de producción" tienen significados bien entendidos en la técnica. Por ejemplo, puede hacerse referencia a la patente de Estados Unidos 7,300,773.

10

Descripción detallada de la invención

15

La presente invención proporciona métodos para la fabricación de una proteína de fusión o un anticuerpo mediante el proceso conocido como perfusión. El término "perfusión", como se usa en la presente descripción, pretende denotar generalmente un proceso en el que un cultivo de células en suspensión se suministra continua o periódicamente, y con la máxima preferencia continuamente con medio fresco a un biorreactor mientras los medios de cultivo gastados se eliminan continuamente, es decir, se recolectan (preferentemente con el producto) para que el producto contenido en él pueda recolectarse continuamente, y los desechos y materiales tóxicos presentes en el medio gastado puedan eliminarse del biorreactor. Mediante el uso de los medios de filtración apropiados bien conocidos en la técnica, las células luego se filtran continuamente de la corriente de recolección y se devuelven después al biorreactor para mantener un volumen de cultivo constante. Tal un proceso, típicamente realizado continuamente, permite que las células alcancen altas densidades. En consecuencia, pueden alcanzarse y mantenerse de manera rutinaria densidades tan altas como 10-75 millones de células/ml durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, al menos dos semanas, y típicamente de 20 a 60 días. Esto puede dar como resultado un proceso de cultivo celular altamente productivo que puede producir durante un período de tiempo a diferencia de los cultivos por lotes o por lotes alimentados. Alternativamente, en lugar de recolectar continuamente el producto del medio gastado que se elimina, el producto puede mantenerse y concentrarse en el cultivo, y después recolectarse periódicamente, o al final del cultivo. Como es bien conocido en la técnica, el uso de filtros de tamaño apropiado puede permitir la eliminación de solo desechos, con la retención del producto recombinante en el cultivo del biorreactor. Un objeto de la presente invención es proporcionar un medio de alimentación apropiado para su uso en un proceso de perfusión, en particular procesos para la fabricación de proteínas terapéuticas tales como proteínas de fusión o anticuerpos.

20

25

30

35

40

45

50

Los procesos de perfusión de cultivos celulares pueden experimentar típicamente una velocidad de intercambio del medio de alimentación de 0,5 a 2 volúmenes de biorreactor por día. La presente invención se basa en nuestro descubrimiento de que tales procesos de perfusión no requerirán una concentración de nutrientes tan alta como la que se emplea típicamente en los medios de alimentación usados en el procesamiento por lotes alimentados y, de hecho, requerirán concentraciones sustancialmente menores. En particular, hemos encontrado que la concentración de nutrientes, en particular la concentración de aminoácidos, que se usa en procesos de producción por lotes alimentados para la fabricación de una proteína terapéutica (por ejemplo, una proteína de fusión o un anticuerpo) debe reducirse a niveles que, por un lado, siguen siendo lo suficientemente ricos en nutrientes para satisfacer las necesidades metabólicas de las células a niveles de estado estacionario, pero por otro lado no son tan ricos en nutrientes como para causar otros efectos nocivos, tales como, entre otras cosas, la sobreproducción de amoníaco o lactato, lo que reducirá la viabilidad del cultivo, el título global y la calidad del producto. La invención requiere niveles reducidos de nutrientes en términos de niveles reducidos de concentración total de aminoácidos. Los componentes de nutrientes adicionales pueden determinarse empíricamente de una manera bien conocida basada en la densidad celular, la velocidad de perfusión y la velocidad de productividad específica (pcd), lo que proporciona que el nivel de nutrientes reducido resultante se encuentre dentro de los niveles de concentración global de aminoácidos especificados en la presente invención. Nuestra invención se basa además en el descubrimiento de que se reduce el consumo de aminoácidos en el medio formulado para la perfusión (para estimular la producción en lugar de la proliferación). En consecuencia, tal medio soportará la productividad deseada con concentraciones de aminoácidos significativamente más bajas. También es factible la reducción de otros elementos alimenticios tales como glucosa, vitaminas, etc.

55

El proceso de perfusión de la presente invención es particularmente adecuado para la fabricación de la proteína de fusión conocida como etanercept (que incluye variantes similares y mejores biológicamente). El etanercept (Enbrel®) es un polipéptido de fusión dimérico que consiste en la porción extracelular de unión al ligando del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton (p75) humano unido a la porción Fc de la IgG1 humana. Consiste en 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodalton (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.) El componente Fc de etanercept contiene el dominio constante pesado 2 (CH2), el dominio constante pesado 3 (CH3) y la región bisagra, pero no el dominio constante pesado 1 (CH1) de la IgG1 humana. Un dominio Fc puede contener uno o todos los dominios descritos anteriormente. El etanercept usualmente se produce mediante tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión en células de mamífero de ovario de hámster chino (CHO).

60

El proceso de perfusión de la presente invención también es adecuado para la fabricación del anticuerpo anti-TNF conocido como adalimumab. El adalimumab (Humira®) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano recombinante específico para el TNF humano. El adalimumab también se conoce como D2E7. El adalimumab tiene dos cadenas ligeras,

5 cada una con un peso molecular de aproximadamente 24 kilodalton (kDa) y dos cadenas pesadas de IgG1, cada una con un peso molecular de aproximadamente 49 kDa. Cada cadena ligera consta de 214 residuos de aminoácidos y cada cadena pesada consta de 451 residuos de aminoácidos. Por lo tanto, el adalimumab consta de 1330 aminoácidos y tiene un peso molecular total de aproximadamente 148 kDa. El término adalimumab también pretende abarcar las denominadas variantes biosimilares o biomejores de la proteína adalimumab usada en Humira® disponible comercialmente.

10 El medio de alimentación usado en la presente invención comprende preferentemente un medio base tal como BalanCD® y HyCell®, suplementado con dexametasona. Las células que producen una proteína (por ejemplo, etanercept o una variante biosimilar o biomejor de la misma) están presentes en el recipiente de perfusión a una densidad de al menos 10 000 000 células/ml, y preferentemente a una densidad de al menos 5 000 000, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 10 000 000 células/ml. Antes de la etapa (a), durante una fase de crecimiento para las células capaces de expresar la proteína deseada (antes del inicio sustancial de la producción), tales células capaces de expresar la proteína pueden crecer a una temperatura seleccionada de: (i) 28 ° a 37 °C; y (ii) preferentemente de 35 ° a 36 °C. Durante una fase de producción subsecuente, que implica el procesamiento de perfusión, la producción de etanercept se lleva a cabo a una temperatura seleccionada de (i) mayor que 32 °; (ii) mayor que 34 °; (iii) mayor que 35 °C; (iv) el intervalo de 15 33 °C a 36 °C; (v) el intervalo de 35 °C a 36 °C; (vi) 32,5 °C; (vii) 33,5 °C; (viii) 34,5 °C; y (ix) 35,5 °C. El método de la invención comprende preferentemente recolectar el etanercept continua o periódicamente, pero preferentemente continuamente, durante la fase de producción del proceso de perfusión. Además, la eliminación del medio gastado y el reemplazo con medio de cultivo fresco ocurre preferentemente continuamente. La recolección de la proteína deseada presente en el medio de cultivo retirado continuamente se lleva a cabo preferentemente continuamente.

20 El método de perfusión de la presente invención puede usarse para cualquier proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral)-Fc o anticuerpo anti-TNF, que incluye, por ejemplo, proteínas de fusión y anticuerpos monoclonales. Los ejemplos de tales proteínas adecuadas para la producción en el proceso de perfusión de la invención incluyen etanercept, adalimumab, infliximab, así como también variantes biosimilares o biomejores de tales proteínas. Sin embargo, debe entenderse que el proceso de perfusión de la presente invención no se limita a ninguna proteína específica.

25 La productividad volumétrica del proceso descrito y la calidad del etanercept producido pueden evaluarse mediante el uso de varios métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen pero no se limitan a ensayos que cuantifican la proteína total y activa (títulos), califican el nivel de sialilación de la proteína, tales como los geles de enfoque isoeléctrico (IEF), la cromatografía de interacción hidrofóbica y otros.

30 El proceso de perfusión de la presente invención puede producir proteínas plegadas correctamente con excelentes rendimientos, y preferentemente a temperaturas de producción superiores a las que se creían anteriormente necesarias o convenientes en la técnica.

**EJEMPLOS**

40 Los siguientes materiales se usan en los Ejemplos.

Descripción de la materia prima	Fuente	Número de catálogo del proveedor	Categoría	Intervalo útil	Notas de uso
BalanCD™ CHO Growth A	Irvine Scientific	94120-10L	Medio base	n/a	medio base
HyClone™ HyCell CHO	Thermo Scientific	SH30933	Medio base	n/a	medio base
HyClone™ SFM4CHO	Thermo Scientific	SH30518.04	Medio base	n/a	usado en la preparación de la siembra;
D-(+)-Galactosa	SAFC	G5388	Alimentación de glicanos	≤ 10	usado a 10 mM final; para optimizar la calidad del producto
Dexametasona	SAFC	D4902	Alimentación de glicanos	≤ 1 uM	usado a 0,8-1,0 uM; para optimizar la calidad del producto
ManNAc (N-acetilmanosamina)	SAFC	A8176	Alimentación de glicanos	≤ 20	usado a 10 mM final; para optimizar la calidad del producto
BalanCD™ CHO Alimento 1	Irvine Scientific	94119-10L	Alimentación del título	10 % (v/v)	Aumenta el título cuando se añade solo o con otra alimentación de título

5	HyClone™ Cell Boost 5	Thermo Scientific	SH30865.04	Alimentación del título	10-20 % (v/v)	Usado en experimentos de control
	Hidrolizado de semilla de algodón ("CSH")	FrieslandCampina Domo	CNE50M-UF	Alimentación del título	15 % (v/v)	aumenta la productividad específica
10	Alimentación de plataforma EX-Cell CHOZN	SAFC	24331C-10L	Alimentación del título	10-20 % (v/v)	alimentación compleja para procesos por lotes alimentados
15	Medio de Crecimiento	SAFC	87509CP	Medio base	n/a	Medio base para el crecimiento inicial en el biorreactor de producción
	Medio de producción	SAFC	87496CP	Medio Complejo	n/a	Medio complejo para la fase de producción en el biorreactor de producción
20	Medio de producción	SAFC	87612CP	Medio base	n/a	Medio base para la fase de producción en el biorreactor de producción

Ejemplo 1

25

En este experimento, usamos medios de alimentación compuestos por una mezcla 1:1 de los medios BalanCD™ CHO Growth A y HyClone™ HyCell suplementados con alimentos EX-CELL CHOZN y Alimento 1, hidrolizado de semillas de algodón, galactosa, L-glutamina y glucosa. Algunas condiciones implicaron la suplementación adicional con vitaminas, aminoácidos y concentraciones más altas de CHOZN y Alimento 1, lo que hizo al medio significativamente más rico (ver SF5, SF6 y SF7, más abajo). Antes de la adición de los medios de alimentación, la densidad de la siembra era de 40 millones de células por mililitro de cultivo. El procesamiento de perfusión se simuló en que el cultivo recibió un intercambio completo de medio 24 horas después de la siembra y después el cultivo se continuó durante 96 horas (sin alimentación adicional o intercambio de medios). El comportamiento del cultivo se controló con respecto a la densidad celular viable, la viabilidad, el perfil metabólico (producción de amoníaco y lactato, consumo de L-glutamina y glucosa, niveles de pH, producción de glutamato), y la productividad. Como se muestra en los datos presentados más abajo, los cultivos con un mayor suplemento de vitaminas y aminoácidos (ver SF5 y SF6, más abajo) produjeron niveles muy altos de amoníaco (>40 mM), lo que dio como resultado una disminución prematura de la viabilidad. No observamos ningún otro cambio metabólico en comparación con los datos obtenidos para las células supervivientes diferente a los niveles de amoníaco excepcionalmente altos. Los títulos obtenidos en los medios nutritivos con mayor contenido de nutrientes también se vieron afectados negativamente incluso durante el tiempo en que la viabilidad era comparable entre todos los cultivos. Los cultivos con menor contenido de nutrientes sin las vitaminas y aminoácidos adicionales (SF3 y SF4) permanecieron con alta viabilidad, tuvieron una buena productividad y produjeron material de buena calidad del producto (ver la sección de Datos más abajo).

45

Este Ejemplo 1, mediante el uso de un reemplazo de alimentación única a las 24 horas, seguido por una fase de producción de 96 horas (sin más intercambio de medios durante el periodo de 96 horas) demuestra que un medio destinado para su uso en perfusión (en el que los medios se intercambian continua o periódicamente) necesariamente requerirá niveles reducidos de nutrientes, a niveles inferiores a los usados para los alimentos en SF3 y SF4. En consecuencia, como se proporciona en los Ejemplos 2 y 3 más abajo, los medios de alimentación usados en un proceso de perfusión deben emplear un contenido total de aminoácidos de menos de 70 mM y preferentemente un contenido total de aminoácidos en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 mM, aún da como resultado una excelente densidad celular, viabilidad celular y título de producción. Debe entenderse que el contenido total de aminoácidos como se usa en la presente descripción significa la concentración total de aminoácidos en estado estacionario, basada en el volumen del recipiente de reacción de perfusión.

55

Resultados del Ejemplo 1

60

La Tabla 1, más abajo, resume los medios de alimentación usados en cinco experimentos (SF3 a SF7) en los que, como se describió anteriormente, los medios se intercambian, después de la siembra, a las 24 horas, y después se permite que el proceso continúe (sin ningún otro intercambio de medios) por unas 96 horas adicionales. Este experimento comparó alimentos con menor contenido de nutrientes (corridas SF3, SF4) con alimentos con mayor contenido de nutrientes (corridas SF5, SF6, SF6 y SF7). Los alimentos que se muestran en la Tabla se usaron para suplementar un medio base que consiste en BalanCD y Hycell (como se identifica en la lista de materiales, arriba). Se añadieron vitaminas (Invitrogen, cat# 11120-052) y aminoácidos (Invitrogen, cat# 11130-036) a una concentración 1x a partir de la solución madre a 100x.

65

Tabla 1

Alimentos de perfusión					
Alimentos	SF3 Alimento Bajo en Nutrientes	SF4 Alimento Bajo en Nutrientes	SF5 Alimento Alto en Nutrientes	SF6 Alimento Alto en Nutrientes	SF7 Alimento Alto en Nutrientes
CHOZN	10 %	10 %	10 %	10 %	20 %
CSH		7,5 %	7,5 %	7,5 %	
Alimento 1	10 %	10 %	10 %	10 %	20 %
L- Glutamina	8 mM				
Vitaminas			1x	1x	
AA				1x	
Galactosa	10 mM				

La Figura 1 expone datos sobre la densidad celular viable (VCD) de los cultivos que contienen las concentraciones más bajas de alimentación (SF3 y SF4) de acuerdo con la presente invención. Tenga en cuenta que se obtuvieron densidades de cultivo muy altas. El medio relativamente más escaso (10 % de CHOZN + 7,5 % del hidrolizado de semilla de algodón (CSH) y 10 % de Alimento 1, y sin suplementación adicional con vitaminas o aminoácidos) (ver SF3 y SF4) proporcionó suficiente apoyo nutricional para que las células mantengan una alta viabilidad para al menos 96 horas.

La Figura 2 demuestra (en el caso de los alimentos SF5, SF6 y SF7) que los medios altamente enriquecidos en nutrientes (resultantes de la suplementación con vitaminas y aminoácidos o alimentos complejos) redujeron la longevidad del cultivo. En particular, descubrimos que la adición de aminoácidos a concentraciones que parecen exceder los requerimientos metabólicos del cultivo da como resultado una disminución rápida de la viabilidad. Se observó además que todos los cultivos con una longevidad más corta (por ejemplo, SF6 y SF7) producían altos niveles de amoníaco (ver Figura 3).

La Figura 3 muestra que los cultivos (ver SF6 y SF7 en la Tabla 1 anterior) que usan los medios de alimentación con mayor contenido de nutrientes muestran una producción inaceptablemente alta de amoníaco lo que postulamos puede causar o contribuir a la disminución prematura de la viabilidad.

La Figura 4 muestra que la producción de proteínas en el medio con mayor contenido de nutrientes (por ejemplo, SF5, SF6 y SF7) se ve afectada negativamente como se muestra por los títulos reducidos. Compare la producción a partir de los cultivos que usan los alimentos reducidos en nutrientes de SF3 y SF4 de acuerdo con la invención con la producción que se logra a partir de los cultivos que usan los alimentos más altamente enriquecidos de SF5, SF6 y SF7.

Ejemplo 2

En base a los datos obtenidos en el Ejemplo 1, y de acuerdo con nuestra invención, encontramos que un medio con nutrientes reducidos, tal como el empleado en las corridas SF3 y SF4 en el Ejemplo 1 anterior, puede modificarse para reducir aún más sustancialmente la concentración total de aminoácidos cuando se emplea en un proceso de perfusión sometido a reemplazo continuo o periódico de los medios. En particular, en tal un proceso de perfusión, una concentración total de aminoácidos en el intervalo de 15 mM a 50 mM, y con la máxima preferencia en el intervalo de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, respaldará las necesidades metabólicas del cultivo celular en un proceso de perfusión para la fabricación de proteínas terapéuticas tal como, por ejemplo, una proteína de fusión TNFR-Fc o un anticuerpo monoclonal anti-TNF. En consecuencia, en un proceso de perfusión que implica reemplazos periódicos de medios, se emplea un proceso de perfusión de acuerdo con la invención en el que los medios de alimentación, que tienen una concentración total de aminoácidos en el intervalo de 15 a 50 mM, y con la máxima preferencia aproximadamente 20 a aproximadamente 30 mM se reemplazan con medio fresco cada 24 horas. Tal un proceso que simula la perfusión es equivalente a una velocidad de perfusión de 1 volumen de biorreactor por día. Las células se inoculan a una densidad de preferentemente 50 millones de células por mililitro, y el medio se intercambia cada 24 horas para un total de 3 intercambios. El cultivo finaliza el día 4 (tiempo total 96 horas). Se observan diariamente la densidad celular viable y la viabilidad. El título y el perfil de la isoforma que reflejan la calidad del producto se determinan para cada muestra de recolección mediante el uso de los ensayos apropiados conocidos en la técnica. Las células pueden requerir aproximadamente 3 días (72 h) para cambiar gradualmente el metabolismo al modo de producción, como se refleja en el título mejorado y la calidad del producto (muestras de 96 h). El proceso da como resultado una excelente densidad celular y viabilidad celular, así como también un excelente título, a pesar del uso de medios de alimentación que contienen concentraciones totales de aminoácidos sustancialmente más bajas en comparación con los medios típicamente empleados en procesos por lotes alimentados, tal como se recomienda en la patente de Estados Unidos 7,300,773 en la que se requiere que la concentración total de aminoácidos acumulada supere los 70 mM.

## Ejemplo 3

## Perfusión con reemplazo continuo de medios

5 Se repite el ejemplo 2, excepto que se emplea un proceso de perfusión continua en el que los medios frescos se introducen continuamente en el reactor, y los medios gastados se eliminan continuamente de una manera bien conocida en la técnica, de manera que la concentración total de aminoácidos en estado estacionario de los medios de alimentación en el reactor es menor que 70 mM, y preferentemente en el intervalo de 15 a aproximadamente 65 mM, y con la máxima preferencia en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 55 mM. El proceso de perfusión continua da como resultado una excelente densidad celular, viabilidad celular y título. Además de los requisitos para la concentración total de aminoácidos, el medio de alimentación se formula preferentemente de manera que en la concentración de medios en estado estacionario en el reactor de perfusión se cumplan uno o más de los siguientes criterios: (i) una cantidad total de aminoácidos en estado estacionario por unidad de volumen menor que aproximadamente 70 mM; (ii) una relación de glutamina a asparagina acumulada en estado estacionario mayor que aproximadamente 2; (iii) una relación de glutamina a aminoácidos totales en estado estacionario mayor que aproximadamente 0,2; (iv) una relación molar de iones inorgánicos en estado estacionario a aminoácidos totales mayor que 1; y (v) una cantidad combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen en estado estacionario menor que 16 mM. El término estado estacionario pretende denotar que la concentración y la relación de los componentes de alimentación, como se expresó anteriormente, permanecen esencialmente constantes a los niveles establecidos en el recipiente de reacción de perfusión.

## Ejemplo 4

25 Evaluamos varias composiciones de medios que permiten un rendimiento de cultivo robusto en condiciones de perfusión con respecto al crecimiento, la productividad y la calidad del producto. En uno de nuestros experimentos que lograron una densidad celular de 10 millones de células por mililitro, probamos el medio basal SFM4CHO suplementado con dos concentraciones diferentes de alimento Cell Boost 5 y encontramos que es más escaso (10 % de alimento), lo que da como resultado una concentración total de aminoácidos de aproximadamente 50 mM, lo que da como resultado una mejor calidad del producto que un cultivo que se suplementó con 20 % de alimento, lo que da como resultado una concentración total de aminoácidos de aproximadamente 100 mM. La diferencia en calidad se demuestra con los datos que se muestran en la Figura 5). Los carriles 2 y 4 muestran una distribución de especies cargadas muy similar a la del etanercept comercial (Enbrel®) (carril 6), con una preponderancia de bandas ácidas que migran más hacia el gel. Por el contrario, las muestras de los alimentos más ricos (carriles 3 y 5) muestran menos especies ácidas que migran rápidamente y son menos similares a Enbrel®.

35 Un experimento posterior probó mayores densidades de cultivo (25 millones de células por ml) mediante el uso de exactamente las mismas condiciones de alimentación. Descubrimos que la formulación del medio con el contenido más bajo de la alimentación Cell Boost 5 no pudo mantener la viabilidad del cultivo, lo que finalmente dio como resultado una disminución de la calidad del producto. Sin embargo, también encontramos que si bien el medio de alimentación que contenía la concentración total de aminoácidos más alta (aproximadamente 100 mM) soportaba una alta viabilidad, la calidad del producto no era comparable a la observada en la densidad celular más baja. Este resultado requirió más investigaciones para encontrar otros medios y alimentos que pudieran proporcionar una buena calidad del producto y al mismo tiempo soportar densidades celulares de 25-50 millones de células por ml. Por lo tanto, investigamos varias combinaciones de medios y medios basados en modo discontinuo para identificar las composiciones de medios que pudieron soportar la mayor longevidad de los cultivos sembrados con 30 a 50 millones de células por ml de cultivo. Esta investigación incluyó el experimento y los hallazgos enunciados en el Ejemplo 1 anterior.

## Ejemplo 5

## Requisitos de los medios en la producción de una proteína de fusión TNFR-Fc por perfusión

50 Llevamos a cabo una variedad de experimentos de intercambio medio que simulan perfusión mediante el uso de cultivos de alta densidad ( $25 \times 10^6$  células/ml) en la producción de una proteína de fusión TNFR-Fc en desarrollo como biosimilar al etanercept. En estos experimentos, encontramos consistentemente que puede lograrse una alta viabilidad con alimentos que proporcionan concentraciones reducidas de nutrientes. Nuestros hallazgos se ejemplifican mediante un experimento en el que se establecieron dos cultivos de alta densidad, cada uno con 25 millones de células por mililitro de cultivo, ambos cultivos usaron el mismo medio base (BalanCD®/Hycell®, 1:1) y suplementación adicional con 10 mM de galactosa y 10 mM de ManNAc. La diferencia entre ambos cultivos estuvo en el nivel de suplementación con el alimento CHOZN (10 % versus 20 %) e hidrolizado de semilla de algodón (7,5 % versus 15 %). Ambos alimentos proporcionaron suministros adicionales de aminoácidos a los cultivos. La viabilidad del cultivo con la menor concentración de alimentos coincidió con la del cultivo que recibió el medio más rico. Este resultado indicó que la reducción de la concentración de alimento del 20 % (contenido total de aminoácidos 98 mM) al 10 % (contenido total de aminoácidos 78 mM) no limitó los requerimientos nutricionales de ese cultivo e indicó claramente que la concentración total de aminoácidos podría reducirse aún más a los niveles que ahora hemos prescrito en la presente invención. Los datos se muestran en la Figura 6 y la Figura 7.

65

El análisis de los medios gastados con respecto al contenido de aminoácidos mostró que el cultivo con un contenido de alimento más bajo, incluso después de 48 horas de cultivo, no agotó de manera significativa ninguno de los aminoácidos proporcionados. Esto demuestra que el contenido de aminoácidos es mayor que los requerimientos nutricionales del cultivo y de acuerdo con la presente invención puede reducirse aún más por debajo del nivel de 78 mM. En consecuencia, encontramos que las células perfundidas con medio a una velocidad constante necesitarán niveles mucho más bajos de aminoácidos, y que la velocidad de perfusión igual a 1 volumen de biorreactor por día debería requerir una concentración total de aminoácidos en estado estacionario en el intervalo de aproximadamente 20-50 mM.

Uno de los requisitos principales en los proyectos de desarrollo de productos es la expresión de alto título del producto con la calidad deseada. La mayoría de las proteínas requieren una modificación postraducciona adecuada para sus actividades terapéuticas. Por ejemplo, la proteína de fusión TNFR-FC producida en este Ejemplo requiere un grado significativo de sialilación que da como resultado una distribución específica de isoformas basada en un perfil de carga molecular. El análisis de enfoque isoelectrico mostrado por el gel IEF (Figura 8) demuestra que la reducción del contenido de alimento no resultó en la alteración de la distribución de isoformas del producto en comparación con el estándar de referencia comercial y las muestras obtenidas de cultivos alimentados con 20 % de alimento.

En la Figura 8, el gel de enfoque isoelectrico (IEF) muestra una distribución de isoformas comparable en productos aislados de cultivos que contienen una concentración de alimento más baja (10 %) (mostrada en los pocillos 1 y 4, primer y segundo intercambio de medio, IM), en comparación con el aislado de cultivos ricos en alimento (20%) (mostrados en los pocillos 2 y 5, primer y segundo intercambio de medio, IM). El perfil del estándar de referencia se muestra en el pocillo 3.

Como se observa en la Figura 9, los títulos obtenidos para cultivos alimentados con alimentos más escasos (10 %) y más ricos (20 %) muestran que una mayor concentración de alimentos puede dar como resultado una menor productividad del cultivo. Al proporcionar a las células los requisitos de nutrientes especificados para la perfusión en la presente invención, y así evitar un medio rico innecesariamente, puede lograrse un estado metabólico de cultivo en el procesamiento de perfusión que resulta en una mejor productividad y calidad del producto en comparación con los requisitos de medios recomendados hasta ahora en la técnica (ver, por ejemplo, el documento de Estados Unidos 7,300,773)

Ejemplo 6

Para la producción de una proteína de fusión TNFR-Fc en desarrollo como biosimilar de etanercept, la preparación de semillas se expande en matraces de agitación de gran volumen a 37 °C en SFM4CHO. El biorreactor de producción se inocula a densidades de siembra de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> células/ml en un medio donde la concentración total de aminoácidos varía en nueve repeticiones separadas de este experimento de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 mM (ver la tabla más abajo). En cada una de las corridas, la temperatura durante una etapa de producción (con perfusión continua) es de 33,5 °C a 35 °C. Se usa un dispositivo de retención de células ATF™ (tecnología de refinamiento) para recircular el medio (que contiene productos de desecho y el producto deseado) a través de un filtro de fibra hueca, con velocidades de recirculación de 0,05 a 2,0 volúmenes de cultivo de trabajo por minuto. El cultivo se expande primero en una etapa de crecimiento durante 0 a 2 días, y después se inicia la perfusión a velocidades de 0,2 a 2 volúmenes de cultivo por día para facilitar una etapa de producción. Se añade un nuevo medio, ya que el medio gastado (que contiene el producto) se recolección a través de un filtro de fibra hueca con un tamaño de poro de 0,2 um. El fluido recolectado se enfría a 2-8 °C, se purifica por captura en resina de proteína A. Las alícuotas se analizan por el título y los atributos de calidad del producto, tales como la distribución de N-glicano y el análisis de HIC (para evaluar las cantidades relativas de etanercept correctamente plegado, versus el material incorrectamente plegado/agregado (inactivo)). Las concentraciones totales de aminoácidos investigadas en estas corridas se muestran más abajo:

Concentración total de aminoácidos (estado estacionario) (aprox.)

Corrida # 1	15 a 20 mM
Corrida # 2	20-25 mM
Corrida # 3	25-30 mM
Corrida # 4	30-35 mM
Corrida # 5	35-40 mM
Corrida # 6	45-50 mM
Corrida # 7	55-60 mM
Corrida # 8	60-65 mM
Corrida # 9	65-70 mM

5 El análisis de la densidad celular viable, la viabilidad, la calidad del producto y el título para cada una de las corridas 1 a 9 demuestra excelentes resultados con respecto a estas características en el extremo inferior del intervalo de concentración total de aminoácidos de 15 a 70 mM, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 mM, con un deterioro creciente de estas características a medida que se avanza hacia el extremo superior del intervalo.

#### Ejemplo 7

10 Para la producción de una proteína de fusión TNFR-Fc en desarrollo como biosimilar de etanercept, la preparación de semillas se expandió en matraces de agitación de gran volumen a 37 °C en SFM4CHO. El biorreactor de producción se inoculó a densidades de siembra de 0,3 a 0,75 x 10<sup>6</sup> células/ml en una serie de biorreactores de perfusión en un medio donde la concentración total de aminoácidos fue de aproximadamente 20 a aproximadamente 56 mM. En cada una de las corridas, la temperatura durante una etapa de producción (con perfusión continua) fue de 35 a 37 °C. Se usó un dispositivo de retención celular ATF™ (Tecnología de refinamiento) para recircular el medio (que contiene productos de desecho y el producto deseado) a través de un filtro de fibra hueca, con velocidades de recirculación de 0,5 a 2,0 volúmenes de cultivo de trabajo por día. El cultivo se expandió primero en una etapa de crecimiento durante hasta 8 días, con perfusión a una velocidad de perfusión específica de la célula de 0,05 a 0,1 nl por célula por día. La temperatura se redujo a, por ejemplo, 33,5 °C para facilitar una etapa de producción. Se añadió un nuevo medio, ya que el medio gastado (que contenía el producto) se recolectó a través de un filtro de fibra hueca con tamaño de poro de 0,2 µm. El fluido recolectado se enfrió a 2-8 °C, en preparación para la captura en resina de proteína A. Las alícuotas se analizaron por el título y los atributos de calidad del producto, tales como la distribución de N-glicano y el análisis de HIC (para evaluar las cantidades relativas de etanercept correctamente plegado, versus el material incorrectamente plegado/agregado (inactivo)).

25 El análisis de la densidad celular viable, la viabilidad, la calidad del producto y el título para cada corrida demostró excelentes resultados con respecto a estas características en el extremo inferior del intervalo de concentración total de aminoácidos de 20 a 56 mM, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 mM. Como se muestra en la Figura 10, un cultivo crecido como se describe aquí logró aproximadamente 30 millones de células/ml durante una etapa de crecimiento de nueve días y mantuvo esa concentración celular en alta viabilidad durante una etapa de producción que se extendió durante 11 a 12 días adicionales.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la fabricación de una proteína que comprende la etapa de producir la proteína mediante el cultivo celular por perfusión de células CHO (ovario de hámster chino) en un medio de alimentación que comprende una concentración total de aminoácidos en el intervalo de 15 a 50 mM, en donde la proteína es una proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral)-Fc o un anticuerpo anti-TNF.
- 10 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el medio de alimentación comprende una concentración total de aminoácidos en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en: 15 a 20 mM; 20 a 25 mM; 25 a 30 mM; 30 a 35 mM; 35 a 40 mM; 40 a 45 mM; y 45 a 50 mM.
- 15 3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en etanercept, adalimumab, infliximab y un biosimilar de los mismos.
- 20 4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde los medios de alimentación comprenden uno o más de los siguientes: Los medios base SFM4CHO®, medios base BalanCD®, medios base Hycell®, hidrolizado de semilla de algodón, dexametasona, ManNAc (N-acetilmanosamina) y/o D-(+)-Galactosa.
- 25 5. El método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además antes de la etapa de producción de proteínas, preparar una mezcla que comprende células CHO (ovario de hámster chino) capaces de expresar una proteína terapéutica deseada, y un medio de cultivo adecuado para llevar a cabo tal expresión; y en donde la etapa de producción de proteínas comprende (a) en un recipiente adecuado que contiene la mezcla, hacer que las células produzcan la proteína, y (b) eliminar periódica o continuamente el medio de cultivo gastado y añadir medio de cultivo fresco al recipiente.
- 30 6. El método de conformidad con la reivindicación 5 en donde, antes de la etapa de producción de proteínas, las células capaces de expresar la proteína se cultivan en una fase de crecimiento a una temperatura seleccionada de (i) 28 ° a 37 °C; y (ii) 35 ° a 36 °C.
- 35 7. El método de conformidad con la reivindicación 6 en donde la etapa de producción de proteínas se lleva a cabo a una temperatura seleccionada de (i) mayor que 32 °C; (ii) mayor que 34 °C; (iii) mayor que 35 °C; (iv) el intervalo de 33 °C a 36 °C; (v) el intervalo de 35 °C a 36 °C; (vi) 32,5 °C; (vii) 33,5 °C; (viii) 34,5 °C; y (ix) 35,5 °C.
- 40 8. El método de conformidad con la reivindicación 7 en donde la proteína que se produce se selecciona del grupo que consiste en etanercept, adalimumab, infliximab y un biosimilar de los mismos.
- 45 9. Un método de perfusión para producir una proteína terapéutica que comprende las etapas de (a) preparar una mezcla que comprende células CHO capaces de expresar la proteína, y un medio de cultivo adecuado para llevar a cabo tal expresión; (b) en un recipiente adecuado que contiene la mezcla, hacer que las células produzcan la proteína; y (c) eliminar periódica o continuamente el medio de cultivo gastado y añadir medio de cultivo fresco al recipiente, en donde el medio de cultivo comprende (i) una concentración total de aminoácidos de 15 a 50 mM; y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en: un alimento complejo definido químicamente, dexametasona, ManNAc (N-acetilmanosamina), hidrolizado de semilla de algodón y D-(+)-galactosa; en donde la proteína terapéutica es una proteína de fusión TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral)-Fc o un anticuerpo anti-TNF.
- 50 10. El método de conformidad con la reivindicación 9 en donde la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en etanercept, adalimumab, infliximab y un biosimilar de los mismos.
- 55 11. El método de conformidad con la reivindicación 10 en donde la proteína terapéutica es etanercept, o un biosimilar de la misma.
- 60 12. El método de perfusión de conformidad con la reivindicación 11 en donde, antes de la etapa (a), las células capaces de expresar etanercept o un biosimilar del mismo se cultivan en una fase de crecimiento a una temperatura seleccionada de; (i) 28 °C a 37 °C; y (ii) 35 ° a 36 °C.
13. El método de perfusión de conformidad con la reivindicación 12 en donde, durante la producción del etanercept o biosimilar del mismo que se produce en las etapas (b) y (c), el recipiente se mantiene a una temperatura seleccionada de (i) mayor que 32 °C; (ii) mayor que 34 °C; (iii) mayor que 35 °C; (iv) el intervalo de 33 °C a 36 °C; (v) el intervalo de 35 °C a 36 °C; (vi) 32,5 °C; (vii) 33,5 °C; (viii) 34,5 °C; y (ix) 35,5 °C.

FIGURA 1

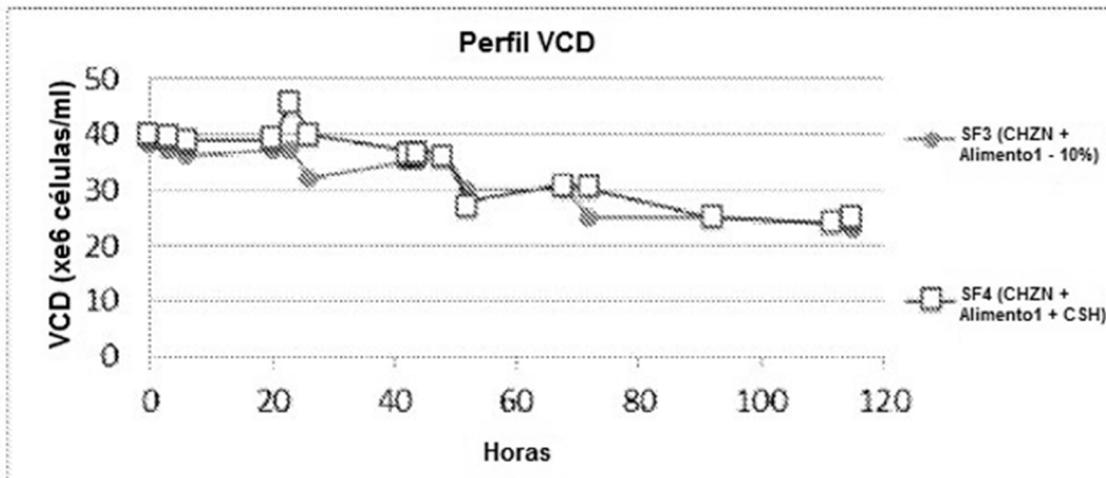


FIGURA 2

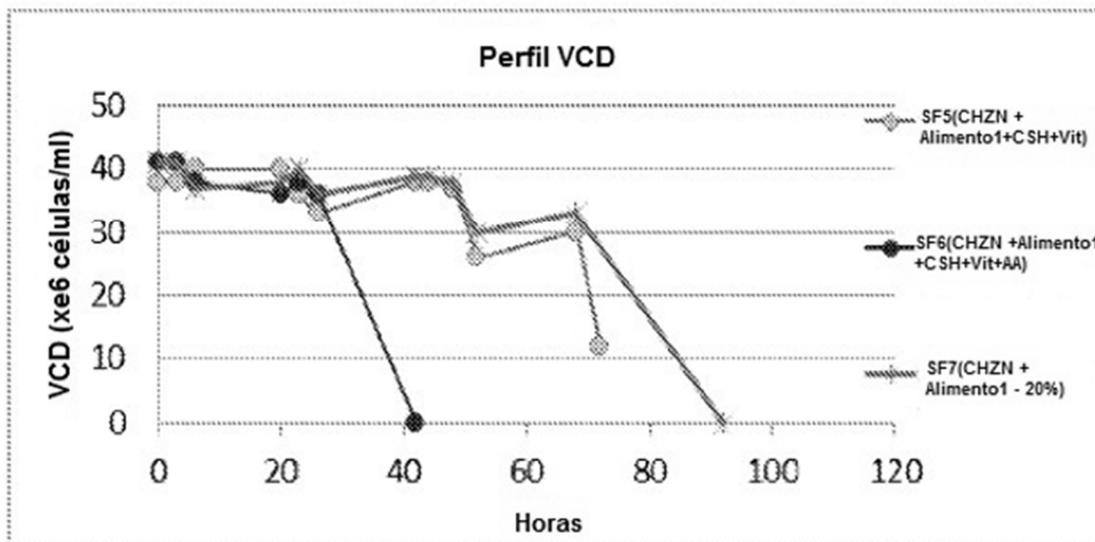


FIGURA 3

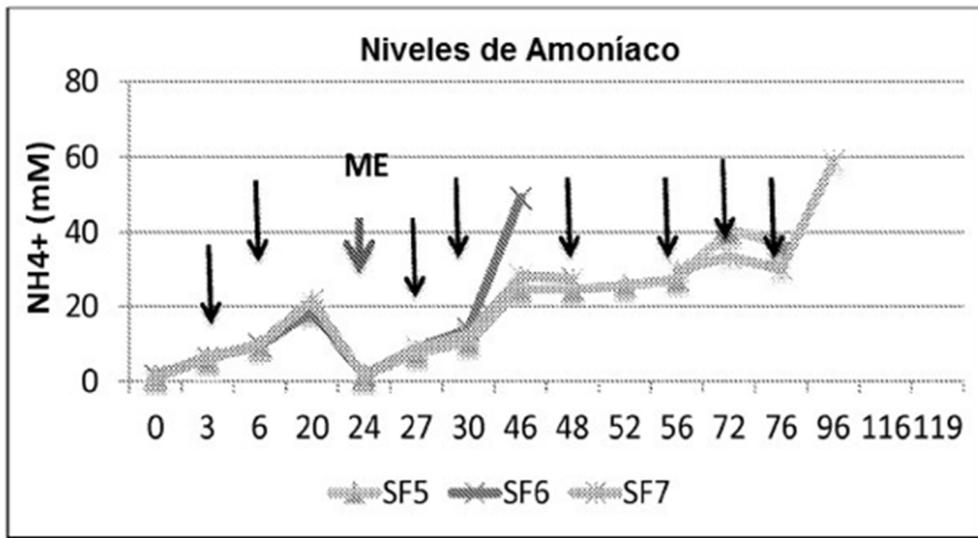


FIGURA 4

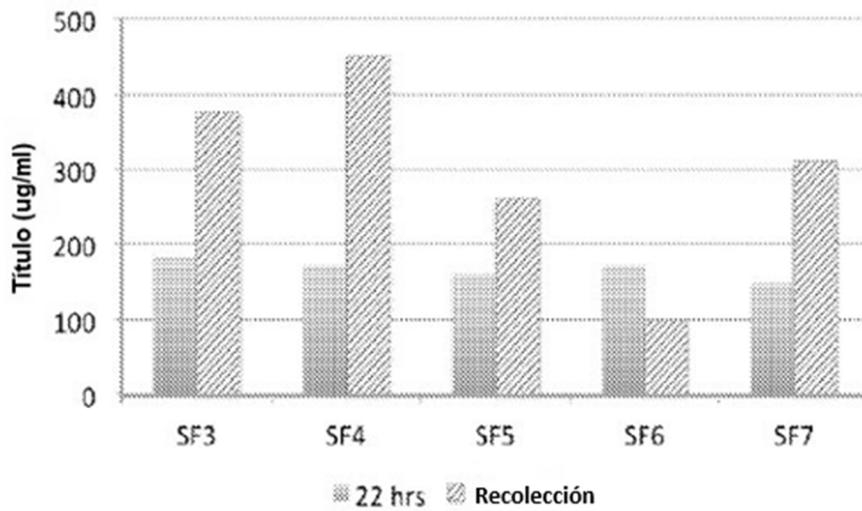


FIGURA 5

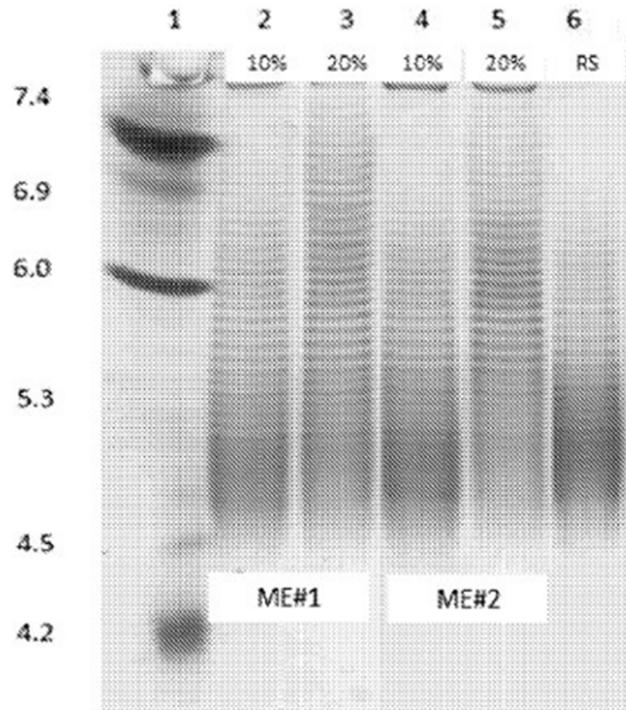


FIGURA 6

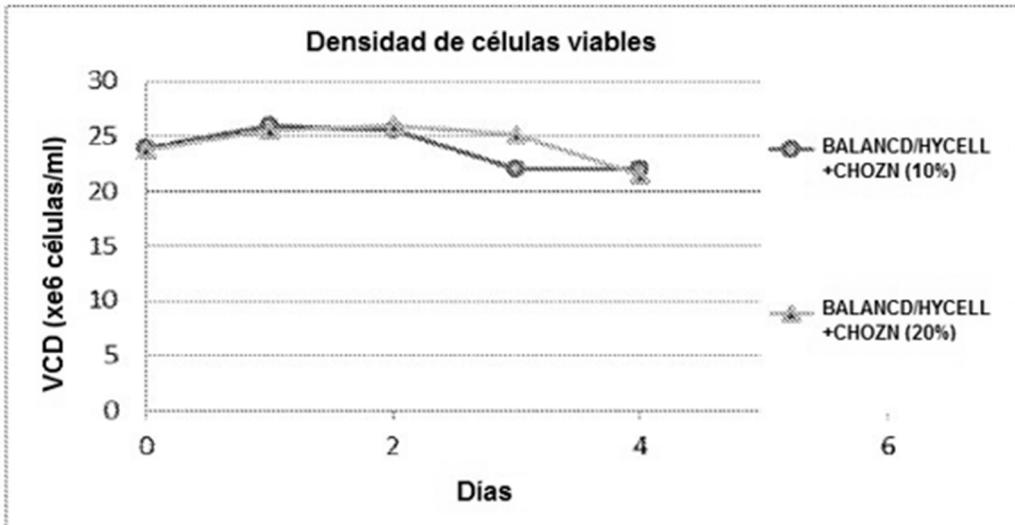
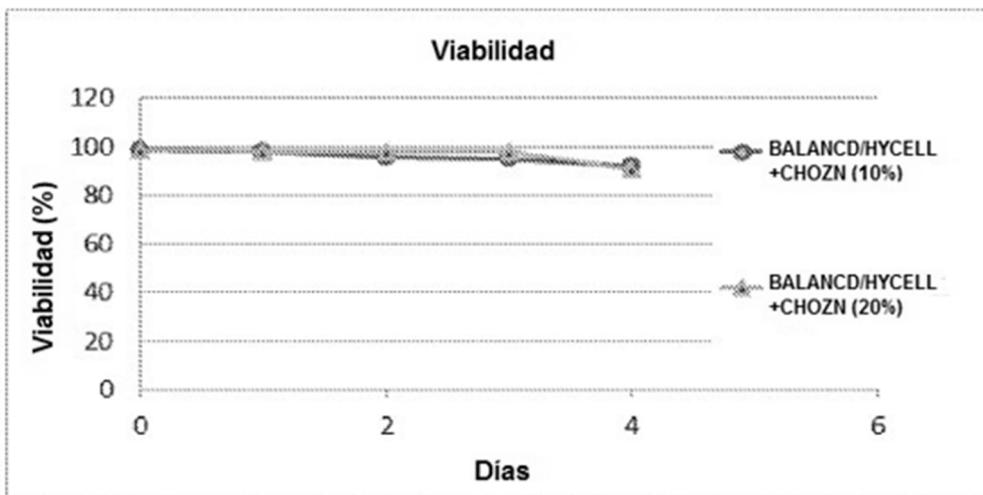


FIGURA 7



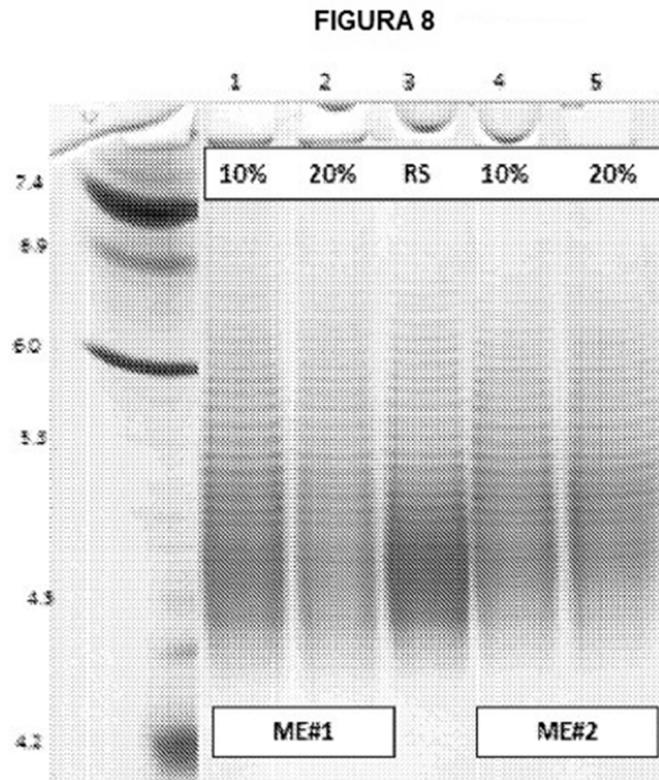


FIGURA 9

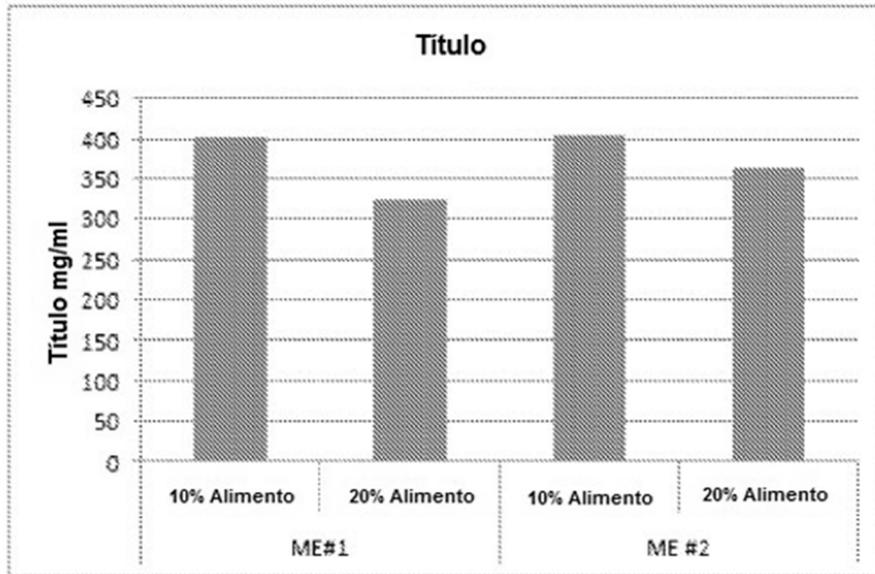


FIGURA 10

