

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 708**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2019 PCT/US2019/040298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2020 WO20010080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2019 E 19745845 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3818078**

54 Título: **Métodos para producir proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

**03.07.2018 US 201862693606 P**

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

**07.08.2024**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**XU, JIANLIN;  
YONGKY, ANDREW;  
TIAN, JUN;  
BORYS, MICHAEL C. y  
LI, ZHENGJIAN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 976 708 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para producir proteínas recombinantes

5 **Campo de la invención**

La presente invención en general se refiere a métodos para incrementar la densidad celular viable durante la etapa de cultivo N-1 con estrategia sin perfusión para inoculación de biorreactores de producción N a densidad de alta siembra para manufacturación de cultivo celular.

10

**Antecedentes de la invención**

Las proteínas y polipéptidos han llegado a ser cada vez más importantes como agentes terapéuticos. En muchos casos, las proteínas y polipéptidos terapéuticos se producen en cultivo celular, a partir de células que han sido diseñadas por ingeniería y/o seleccionadas para producir usualmente niveles elevados del polipéptido de interés. El control y optimización de las condiciones de cultivo celular es críticamente importante para producción comercial exitosa de proteínas y polipéptidos.

15

Muchas proteínas y polipéptidos producidos en cultivo celular son elaborados en un proceso por lote alimentado, en el cual las células son cultivadas por un periodo de tiempo, y después el cultivo es terminado y la proteína o polipéptido producido es aislado. Lu *et al.*, (Biotechnol. Bioeng., 110:191-205 (2013)) describen un proceso por lote alimentado, dinámico y automatizado y la optimización de medios para el desarrollo de procesos de cultivo celular de alta productividad.

20

La cantidad y calidad final de la proteína o polipéptido producido puede ser dramáticamente afectada por el cultivo sembrado N-1 y la densidad de siembra en la producción de N. Yongky *et al.* describen una estrategia de siembra por lotes N-1 de alta densidad para la fabricación de cultivos de células CHO (ACS National Meeting & Exposition 288: BIOT 487 (2018)). Mientras se han hecho esfuerzos por mejorar la producción de proteínas y polipéptidos en procesos de cultivo por lote alimentado, permanece una necesidad de mejoramientos adicionales.

25

30

El cultivo celular por perfusión puede lograr densidades celulares mucho más viables que los sistemas de cultivo celular por lote alimentado convencionales. El cultivo celular por perfusión proporciona un suministro continuo de medio fresco en el sistema de cultivo, mientras se remueven los productos residuales, los cuales proporcionan un ambiente rico para que las células crezcan. Xu *et al.* (Biotechnol. Prog., 33:867- 878 (2017)) comparan la productividad del biorreactor a partir de diferentes modos operativos, incluidos los procesos por lote alimentado y de perfusión. Pohlscheidt *et al.* (Biotechnol. Prog., 29:222-229 (2013)) describen una estrategia de perfusión a gran escala para biorreactores de tren de siembra N-1. En comparación con el cultivo de producción por lote alimentado con densidad de baja siembra, el cultivo de producción por lote alimentado de densidad de alta siembra inoculado con siembra de perfusión N-1 puede lograr título final superior dentro de una corta duración. Sin embargo, el cultivo celular por perfusión llega a ser costoso cuando se usa en sistemas de cultivo a gran escala (por ejemplo, biorreactor de más de 200 l) debido a que grandes cantidades de medio de cultivo celular se consumen. También, el cultivo celular por perfusión puede tener complicaciones a partir del sistema de retención celular el cual previene a las células de ser removidas del sistema de cultivo celular, especialmente por una manufacturación a gran escala.

35

40

45

Existe una necesidad particular para el desarrollo de sistemas mejorados para producir proteínas y polipéptidos por cultivo a gran escala a densidad celular de alta siembra con sistemas sin perfusión.

**Breve resumen de la invención**

La presente invención se dirige a un método para la producción a gran escala de un polipéptido recombinante de interés, que comprende cultivar células hospedadoras que expresan el polipéptido recombinante de interés en un sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde las células hospedadoras se cultivan en un medio enriquecido para obtener una densidad de células viables en la etapa N-1 de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml; e inocular un sistema de cultivo de producción N a una densidad de siembra alta de al menos  $1,5 \times 10^6$  células por ml con células hospedadoras del sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde el medio enriquecido comprende una mayor cantidad de una fuente de carbono en relación con el medio no enriquecido y/o una mayor cantidad de nutrientes seleccionados entre aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y poliaminas en relación con el medio no enriquecido. En algunas realizaciones, el sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, es un cultivo por lotes y la célula hospedadora se cultiva en un medio enriquecido. En otras realizaciones, el sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, es un cultivo por lote alimentado y la célula hospedadora se cultiva en un medio de siembra con la adición de un medio de alimentación. En algunas realizaciones, la densidad celular viable en la etapa N-1 es de al menos  $10 \times 10^6$ , al menos  $15 \times 10^6$ , al menos  $20 \times 10^6$ , al menos  $25 \times 10^6$  o al menos  $30 \times 10^6$  células viables por ml. En algunas realizaciones, la viabilidad celular es de al menos el 80 % en el último día de la fase N-1, de al menos el 85 % en el último día de la fase N-1, o de al menos el 90 % en el último día de la fase N-1.

50

55

60

65

En algunas modalidades de la invención, el medio es enriquecido por un medio de alimentación al menos 5 % con relación al medio no enriquecido, al menos 10 % con relación al medio no enriquecido, al menos 15 % con relación al medio no enriquecido, o al menos 20 % con relación al medio no enriquecido. En algunas modalidades, el medio enriquecido o medio libre comprende una cantidad incrementada de una fuente de carbono. En algunas modalidades, la fuente de carbono es glucosa. En algunas modalidades, el medio enriquecido o medio libre comprende una cantidad incrementada de nutrientes. En algunas modalidades, los nutrientes son seleccionados a partir de aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales, y poliaminas. En algunas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de una fuente de carbono y nutrientes. En algunas modalidades, la fuente de carbono es glucosa y los nutrientes son seleccionados a partir de aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales, y poliaminas.

En algunas modalidades de la invención, la célula hospedera es una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula de mamífero se selecciona a partir del grupo que consiste de células CHO, VERO, BHK, HEK, HeLa, COS, MDCK e hibridoma. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula CHO.

En algunas modalidades de la invención, el polipéptido de interés es un polipéptido terapéutico. En algunas modalidades, el polipéptido de interés es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a un antígeno seleccionado a partir del grupo que consiste de PD-1, PD-L1, LAG-3, TIGIT, GITR, CXCR4, CD73, HER2, VEGF, CD20, CD40, CD11a, factor tisular (TF), PSCA, IL-8, EGFR, HER3, y HER4.

En algunas modalidades de la invención, el biorreactor es de al menos 50 l, al menos 500 l, al menos 1000 l, al menos 5000 l, o al menos 10.000 l.

En algunas realizaciones, el sistema de cultivo de producción N es un biorreactor alimentado por lotes.

En algunas realizaciones de la invención, el título del polipéptido de interés es de al menos 100 mg/l, al menos 1 g/l, al menos 3 g/l, al menos 5 g/l o al menos 10 g/l.

En algunas realizaciones de la invención, las células hospedadoras se cultivan en un medio basal o un medio basal enriquecido para obtener una densidad de células viables en la fase de producción de N de al menos  $1,5 \times 10^6$ , al menos  $5 \times 10^6$  o al menos  $10 \times 10^6$  células viables por ml.

En algunas modalidades de la invención, el medio basal enriquecido es enriquecido por un medio de alimentación de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 % con relación al medio no enriquecido. En algunas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de una fuente de carbono. En algunas modalidades, la fuente de carbono es glucosa. En algunas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de nutrientes. En algunas modalidades, los nutrientes son seleccionados a partir de aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales, y poliaminas. En algunas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de una fuente de carbono y nutrientes. En algunas modalidades, la fuente de carbono es glucosa y los nutrientes son seleccionados a partir de aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales, y poliaminas.

En algunas modalidades de la invención, el método comprende además la etapa de aislar el polipéptido de interés del sistema de cultivo de producción N. En algunas modalidades, el polipéptido de interés es un polipéptido terapéutico. En algunas modalidades, el polipéptido de interés es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

### Breve Descripción de las Figuras

Figuras 1A y 1B. La Figura 1A muestra la densidad celular viable ("VCD", por sus siglas en inglés) de un cultivo celular N-1 que crece en los siguientes sistemas de cultivo celular para la línea A de células CHO: perfusión, lote alimentado, lote, lote con glucosa enriquecida, y lote con glucosa enriquecida y sistemas de cultivo de células nutrientes. La Figura 1B muestra la viabilidad celular (%) de cultivos celulares N-1 que crecen en los siguientes sistemas de cultivo celular para la línea A de células: perfusión, lote alimentado, lote, lote con glucosa enriquecida, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

Figuras 2A-2C. La Figura 2A muestra la densidad celular viable de un cultivo de producción N para polipéptido-1 por la línea A de células usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión, lote alimentado, lote enriquecido con glucosa, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 2B muestra el título del polipéptido de interés que crece en un cultivo de producción usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión, lote alimentado, lote enriquecido con glucosa, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 2C muestra enfoque isoeléctrico capilar de imagen ("iCIEF"), cromatografía de exclusión de tamaño ("SEC"), y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en un cultivo de producción para polipéptido-1 por la línea A de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión, lote alimentado, lote enriquecido con glucosa, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

Figuras 3A y 3B. La Figura 3A muestra la VCD de un cultivo celular N-1 que crece en los siguientes sistemas de cultivo celular para la línea B de células CHO: perfusión, lote alimentado, lote, lote con glucosa enriquecida, y

lote con glucosa enriquecida y sistemas de cultivo de células nutrientes. La Figura 3B muestra la viabilidad celular (%) de cultivos celulares N-1 que crecen en los siguientes sistemas de cultivo celular para la línea B de células CHO: perfusión, lote alimentado, lote, lote con glucosa enriquecida, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

5 Figuras 4A-4C. La Figura 4A muestra la densidad celular viable de un cultivo de producción N para polipéptido-2 por la línea B de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión, lote alimentado, lote enriquecido con glucosa, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 4B muestra el título del polipéptido de interés que crece en un cultivo de producción N para el polipéptido-2 por la línea B de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión, lote alimentado, lote enriquecido con glucosa, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 4C muestra iCIEF, SEC, y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en el cultivo de producción N para el polipéptido-2 por la línea B de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión, lote alimentado, lote enriquecido con glucosa, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

15 Figuras 5A y 5B. La Figura 5A muestra la VCD de un cultivo celular N-1 que crece en los siguientes sistemas de cultivo celular para la línea C de células CHO: perfusión, lote alimentado, lote, lote con glucosa enriquecida, y lote con glucosa enriquecida y sistemas de cultivo de células nutrientes. La Figura 5B muestra la viabilidad celular (%) de cultivos celulares N-1 que crecen en los siguientes sistemas de cultivo celular: perfusión, lote alimentado, lote, lote con glucosa enriquecida, y lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

20 Figuras 6A-6C. La Figura 6A muestra la densidad celular viable de un cultivo de producción N para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: lote alimentado y lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 6B muestra el título del polipéptido de interés que crece en el cultivo de producción para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: lote alimentado y lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 6C muestra iCIEF, SEC, y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en el cultivo de producción N para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: lote alimentado y lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

25 Figuras 7A-7C. La Figura 7A muestra la densidad celular viable de un cultivo de producción N para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión y lote alimentado. La Figura 7B muestra el título del polipéptido de interés que crece en el cultivo de producción para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando el cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión y lote alimentado. La Figura 7C muestra iCIEF, SEC, y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en el cultivo de producción N para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: perfusión y lote alimentado.

30 Figuras 8A-8C. La Figura 8A muestra la densidad celular viable de cultivos de producción N a escala 1000 l (n = 3) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-1 por la línea A de células CHO usando un cultivo de siembra a partir del siguiente sistema de cultivo celular N-1: lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 8B muestra el título del polipéptido de interés que crece en los cultivos de producción a escala 1000 l (n = 3) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-1 por la línea A de células CHO usando el cultivo de siembra a partir del siguiente sistema de cultivo celular N-1: lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 8C muestra iCIEF, SEC, y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en los cultivos de producción N a escala 1000 l (n = 3) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-1 por la línea A de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

35 Figuras 9A-9C. La Figura 9A muestra la densidad celular viable de cultivos de producción N a escala de 500 l (n = 1) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-2 por la línea B de células CHO usando un cultivo de siembra a partir del siguiente sistema de cultivo celular N-1: lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 9B muestra el título del polipéptido de interés que crece en los cultivos de producción a escala de 500 l (n = 1) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-2 por la línea B de células CHO usando el cultivo de siembra a partir del siguiente sistema de cultivo celular N-1: lote con glucosa enriquecida y nutrientes. La Figura 9C muestra iCIEF, SEC, y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en los cultivos de producción N a escala de 500 l (n = 1) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-2 por la línea B de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: lote con glucosa enriquecida y nutrientes.

40 Figuras 10A-10C. La Figura 10A muestra la densidad celular viable de cultivos de producción N a escala de 500 l (n = 1) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir del siguiente sistema de cultivo celular N-1: lote alimentado. La Figura 10B muestra el título del polipéptido de interés que crece en los cultivos de producción a escala de 500 l (n = 1) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando el cultivo de siembra a partir del siguiente sistema de cultivo celular N-1: lote alimentado. La Figura 10C muestra iCIEF, SEC, y análisis de N-glicano para el polipéptido de interés que crece en los cultivos de producción N a escala de 500 l (n = 1) y satélites de 5 l (n = 2) para el polipéptido-3 por la línea C de células CHO usando un cultivo de siembra a partir de los siguientes cultivos celulares N-1: lote alimentado.

#### Descripción detallada de la invención

65 La presente invención se dirige a un método para la producción a gran escala de un polipéptido recombinante de

interés, que comprende cultivar células hospedadoras que expresan el polipéptido recombinante de interés en un sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde las células hospedadoras se cultivan en un medio enriquecido para obtener una densidad de células viables de etapa N-1 de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml; e inocular un sistema de cultivo de producción N a una densidad de siembra alta de al menos  $1,5 \times 10^6$  células por ml con células hospedadoras del sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde el medio enriquecido comprende una mayor cantidad de una fuente de carbono en relación con el medio no enriquecido y/o una mayor cantidad de nutrientes seleccionados entre aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y poliaminas en relación con el medio no enriquecido.

10 **Definiciones**

Los artículos indefinidos “un” o “uno”, deben ser entendidos por referirse a “uno o más” de cualquier componente mencionado o enumerado.

15 El término “aproximadamente” como se usa en la presente a un valor o composición que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor o composición particular como se determina por uno de habilidad ordinaria en la técnica, lo cual dependerá en parte, de cómo el valor o composición es medido o determinado, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar para el practicante en la técnica. Alternativamente, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta 20 %. Más aún, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando valores o composiciones particulares se proporcionan en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se declare de otro modo, el significado de “aproximadamente” debe ser asumido por estar dentro de un intervalo de error aceptable para tal valor o composición particular.

25 El término “y/o” donde se usa en la presente está siendo tomado como descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados sin o con el otro. De este modo, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A y/o B” en la presente, está propuesto para incluir “A y B,” “A o B,” “A” (solo), y “B” (solo). Del mismo modo, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A, B, y/o C” está propuesto para abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo). El uso de la alternativa (*por ejemplo*, “o”) debe entenderse por significar ya sea uno, ambos, o cualquier combinación de los mismos de las alternativas.

35 Como se usa en la presente, el término “aminoácido”, en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede ser incorporado en una cadena de polipéptido. En algunas modalidades, un aminoácido tiene la estructura general  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . En algunas modalidades, un aminoácido es un aminoácido que se origina naturalmente. En algunas modalidades, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas modalidades, un aminoácido es un D-aminoácido; en algunas modalidades, un aminoácido es un L-aminoácido. Los aminoácidos, que incluyen aminoácidos carboxi y/o amino-terminales en los péptidos, pueden ser modificados por metilación, amidación, acetilación, grupos protectores, y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida de circulación del péptido sin afectar adversamente su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. Los aminoácidos pueden comprender una o más modificaciones posteriores a la traducción, tales como una asociación con una o más entidades químicas (por ejemplo, grupos metilo, grupos acetato, grupos acetilo, grupos fosfato, porciones formilo, grupos isoprenoides, grupos sulfato, porciones de polietilenglicol, porciones lipídicas, porciones de carbohidratos, porciones de biotina, etc. En algunas modalidades, los aminoácidos de la presente invención pueden ser proporcionados en, o usados para medio de suplemento para cultivos celulares. En algunas modalidades, los aminoácidos proporcionados en, o usados para suplementar medio de cultivo celular pueden ser proporcionados como sales o en forma de hidratos.

50 El término “anticuerpo” como se usa en la presente se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un objetivo, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv), anticuerpos de cadena única Fv (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos monovalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquiera de otras moléculas de inmunoglobulina modificadas que comprenden un sitio de reconocimiento de antígeno en la medida en que los anticuerpos presentan la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2), basados en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada referidos como alfa, delta, épsilon, gama, y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen diferentes y bien conocidas estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales. Los anticuerpos pueden ser puros o conjugados a otras moléculas, que incluyen pero no se limitan a, toxinas y radioisótopos.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, o un "fragmento de unión al antígeno", como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno", por ejemplo, (i) un fragmento Fab (fragmento de escisión de papaína) o un fragmento monovalente similar que consiste de los dominios VL, VH, LC y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub> (fragmento de escisión de pepsina) o un fragmento bivalente similar que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), el cual consiste de un dominio VH; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) y (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas las cuales pueden ser opcionalmente unidas por un enlazador sintético. Más aún, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite ser elaborados como una cadena de proteína única en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también están propuestos para estar abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos con habilidad en la técnica, y los fragmentos son seleccionados para utilidad en la misma manera como son los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno pueden ser producidas por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

El término "cultivo por lotes" como se usa en la presente se refiere a un método para cultivar las células en las cuales todos los componentes que finalmente serán usados en cultivar las células, que incluyen el medio (véase definición de "medio" abajo) así como también las células mismas, son proporcionados en el comienzo del proceso de cultivo. Un cultivo por lotes es típicamente detenido en algún punto y las células y/o componentes en el medio son recolectadas y opcionalmente purificadas. El término "cultivo por lote alimentado" significa la adición incrementada o continua de un segundo medio de cultivo líquido a un cultivo celular inicial sin remoción sustancial o significante del primer medio de cultivo líquido a partir del cultivo celular. En algunos casos, el segundo medio de cultivo líquido es el mismo como el primer medio de cultivo líquido. En otros casos, el segundo medio de cultivo líquido es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido y/o se agrega como un polvo seco.

El término "biorreactor" como se usa en la presente se refiere a cualquier recipiente usado para el crecimiento de un cultivo de células de mamífero. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño en la medida en que es útil para el cultivo de las células de mamífero. Típicamente, el biorreactor será al menos de 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000, 15.000, 20.000 litros o más, o cualquier volumen entre estos. Las condiciones internas del biorreactor, que incluyen, pero no se limitan a pH y temperatura, son típicamente controladas durante el periodo de cultivo. El biorreactor puede estar compuesto de cualquier material que es adecuado para contener los cultivos de células de mamífero suspendidas en medio bajo las condiciones de cultivo de la presente invención, que incluyen vidrio, plástico o metal. El término "biorreactor de producción" como se usa en la presente se refiere al biorreactor final usado en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen del biorreactor de producción de cultivo celular a gran escala es típicamente al menos 500 litros y puede ser de 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000, 15.000, 20.000 litros o más, o cualquier volumen entre estos. Uno de habilidad ordinaria en la técnica estará consciente de, y será capaz de elegir biorreactores adecuados para uso en practicar la presente invención.

El término "densidad celular viable" como se usa en la presente se refiere a tal número de células viables (vivas) presentes en un volumen de medio dado. El término "densidad celular objetivo" significa una concentración específica de células por volumen de medio de cultivo para producir una proteína recombinante en cultivo. La densidad de célula objetivo puede variar dependiendo de la célula de mamífero especificada cultivada.

El término "viabilidad celular" como se usa en la presente se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir bajo una serie dada de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término como se usa en la presente también se refiere a tal porción de células las cuales están vivas en un tiempo particular con relación al número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en tal tiempo.

Los términos "cultivo", "cultivo celular" y "cultivo de células de mamífero" como se usa en la presente se refiere a una población de células de mamífero que es suspendida en un medio bajo condiciones adecuadas a la supervivencia y/o crecimiento de la población celular. Como será claro para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, estos términos como se usan en la presente pueden referirse la combinación que comprende la población de células de mamífero y el medio en el cual la población es suspendida.

El término "cultivar" o "cultivo celular" significa el mantenimiento o crecimiento de una célula de mamífero en un medio de cultivo líquido bajo una serie controlada de condiciones físicas.

Los términos "medio", "medio de cultivo celular", "medio de cultivo", como se usan en la presente, se refieren a una

solución que contiene nutrientes los cuales nutren a las células de mamífero en crecimiento. Típicamente, estas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos, y elementos traza requeridos por la célula para crecimiento mínimo y/o supervivencia. La solución también puede contener componentes que mejoran el crecimiento y/o supervivencia arriba de las tasas mínimas, que incluyen hormonas y factores de crecimiento. La solución es preferiblemente formulada a un pH y concentración de sal óptimos para supervivencia y proliferación celular. El medio también puede ser un "medio químicamente definido", medio libre –un suero- que no contiene proteínas, hidrolizados o componentes de composición desconocida. Los medios definidos están libres de componentes derivados de animal y todos los componentes tienen una estructura química conocida. El término "medios enriquecidos", "medio enriquecido", o "medio químicamente definido enriquecido" es un medio cultivado que comprenden cantidades adicionales o incrementadas de fuentes de carbono y/o nutrientes con relación al medio de cultivo estándar.

El término "etapa N-1" como se usa en la presente se refiere a la última etapa de expansión de siembra justo antes de la inoculación de producción. La etapa N-1 es la etapa de crecimiento celular final antes de sembrar el biorreactor de producción para la producción del polipéptido. Los términos "etapa N-2" y "etapa N-3" como se usa en la presente se refiere al periodo de tiempo durante el crecimiento y expansión celular y, típicamente, antes de la inoculación de la etapa de producción N. La etapa N-3 es la etapa de crecimiento celular usada para incrementar la densidad celular viable que será usada en la etapa N-2. La etapa N-2 es la etapa de crecimiento celular usada para incrementar la densidad celular viable que será usada en la etapa N-1.

El término "perfusión" o "proceso de perfusión" como se usa en la presente se refiere a un método para cultivar células en las cuales los volúmenes equivalentes de medio (que contienen suplementos nutricionales) son simultáneamente agregados y removidos del biorreactor mientras las células son retenidas en el reactor. Un volumen de células y medio que corresponden al medio de suplemento es típicamente removido en una base continua o semicontinua y es opcionalmente purificado. Típicamente, un proceso de cultivo celular que involucra un proceso de perfusión es referido como "cultivo por perfusión". En algunas modalidades, un medio fresco puede ser idéntico o similar al medio base usado en el proceso de cultivo celular. En algunas modalidades, un medio fresco puede ser diferente que el medio base pero contiene los suplementos nutricionales deseados. En algunas modalidades, un medio fresco es un medio químicamente definido.

Los términos "polinucleótido" o "nucleótido" como se usa en la presente están propuestos para abarcar un ácido nucleico singular así como también ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o constructo de ácido nucleico aislado, *por ejemplo*, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), o ADN plásmido (ADNp). En ciertos aspectos, un polinucleótido comprende un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (*por ejemplo*, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés)).

El término "polipéptido" como se usa en la presente se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente por enlaces amida (también conocido como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una duración específica del producto. Como se usa en la presente el término "proteína" está propuesto para abarcar una molécula comprendida de uno o más polipéptidos, los cuales pueden en algunos casos, estar asociados por enlaces distintos de los enlaces amida. Por otro lado, una proteína también puede ser una cadena de polipéptido única. En este último caso, la cadena de polipéptido única puede en algunos casos, comprender dos o más subunidades de polipéptidos fusionadas en conjunto para formar una proteína. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a los productos de modificaciones posteriores a la expresión, que incluyen sin limitación glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de bloqueo/protectores conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos que no se originan naturalmente. Un polipéptido o proteína puede ser derivado de una fuente biológica natural o producido por tecnología recombinante, pero no es necesariamente traducido a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede ser generada en cualquier manera, que incluye por síntesis química.

El término "polipéptido de interés" como se usa en la presente es usado en su sentido más amplio para incluir cualquier proteína (ya sea natural o recombinante), presente en una mezcla, para la cual se desea la purificación. Tales polipéptidos de interés incluyen, sin limitación, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, citosinas, inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos) y/o cualquiera de las proteínas de fusión.

El término "etapa de producción" del cultivo celular se refiere a una etapa de duración del cultivo celular. Durante la etapa de producción, las células crecerán primero y después seguirán con la producción del polipéptido. La etapa de producción es comúnmente referida como "N" o última etapa de manufacturación del cultivo celular.

Los términos "purificar", "separar", "aislar" o "recuperar", como se usan intercambiamente en la presente, se refieren al menos parcialmente a purificar o aislar (por ejemplo, al menos o aproximadamente 5 %, por ejemplo, al menos o aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o al menos o aproximadamente 95 % puro en peso) una proteína recombinante de uno o más de otros componentes presentes en el medio de cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero o proteínas de medio de cultivo) o uno o más de otros componentes (por ejemplo, ADN, ARN, u otras proteínas) presentes en un lisado de

células de mamífero. Típicamente, el grado de pureza de la proteína de interés se incrementa removiendo (completamente o parcialmente) al menos una impureza de la composición.

5 Los términos “polipéptido recombinantemente expresado” y “polipéptido recombinante” como se usa en la presente se refiere a un polipéptido expresado a partir de una célula hospedera de mamífero que ha sido diseñada por ingeniería genética para expresar tal polipéptido. El polipéptido recombinantemente expresado puede ser idéntico o similar a polipéptidos que son normalmente expresados en la célula hospedera de mamífero. El polipéptido recombinantemente expresado también puede ser extraño a la célula hospedera, es decir, heterólogos a los péptidos normalmente expresados en la célula hospedera de mamífero. Alternativamente, el polipéptido recombinantemente expresado puede ser quimérico en tales porciones del polipéptido que contiene secuencias de aminoácido que son idénticas o similares a los polipéptidos normalmente expresados en la célula hospedera de mamífero, mientras otras porciones son extrañas a la célula hospedera.

15 El término “sembrar” como se usa en la presente se refiere al proceso de proporcionar un cultivo celular a un biorreactor u otro recipiente. Las células pueden haber sido propagadas previamente en otro biorreactor o recipiente. Alternativamente, las células pueden haber sido congeladas y descongeladas inmediatamente previo a proporcionarlas al biorreactor o recipiente. El término se refiere a cualquier número de células, que incluye una célula única.

20 El término “matraz sacudido” está significando un recipiente (por ejemplo, un recipiente estéril) que puede contener un volumen de medio de cultivo líquido que tiene al menos una superficie permeable al gas. Por ejemplo, un matraz sacudido el cual puede ser un matraz de cultivo celular, tal como un matraz T, un matraz Erlenmeyer, o cualquier versión modificada del mismo reconocida en la técnica.

25 El término “título” como se usa en la presente se refiere a la cantidad total de polipéptido o proteína recombinantemente expresado producido por un cultivo de célula de mamífero dividido por una cantidad dada de volumen de medio. El título es típicamente expresado en unidades de miligramos del polipéptido o proteína por miligramo de medio.

30 Varios aspectos de la descripción se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

### Métodos

35 Esta descripción proporciona métodos novedosos para incrementar la densidad celular viable de un cultivo celular de biorreactor a gran escala N-1, que comprende cultivar una célula hospedera que expresa un polipéptido recombinante de interés en un sistema de cultivo celular no basado en perfusión, y en donde la densidad celular viable se incrementa en al menos  $5 \times 10^6$  células/ml.

40 La descripción proporciona además métodos novedosos para la producción a gran escala de un polipéptido recombinante de interés, que comprende: (1) cultivar una célula hospedera que expresa un polipéptido recombinante de interés en una etapa N-1 en un sistema de cultivo celular no basado en perfusión, en donde la densidad celular viable se incrementa en al menos  $5 \times 10^6$  células/ml; y (2) cultivar las células en una etapa de producción N, las cuales son inoculadas a partir del cultivo celular N-1 en un sistema de cultivo sin perfusión, en medio enriquecido de densidad de alta siembra hasta al menos  $1,5 \times 10^6$  células/ml.

45 La presente invención se refiere a un método para la producción a gran escala de un polipéptido recombinante de interés, que comprende cultivar células hospedadoras que expresan el polipéptido recombinante de interés en un sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde las células hospedadoras se cultivan en un medio enriquecido para obtener una densidad de células viables en la etapa N-1 de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml; e inocular un sistema de cultivo de producción N a una densidad de siembra alta de al menos  $1,5 \times 10^6$  células por ml con células hospedadoras del sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde el medio enriquecido comprende una mayor cantidad de una fuente de carbono en relación con el medio no enriquecido y/o una mayor cantidad de nutrientes seleccionados entre aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y poliaminas en relación con el medio no enriquecido.

### 55 Células hospederas

60 Cualquier célula de mamífero o tipo de célula susceptible a cultivo celular, y para expresión de los polipéptidos, puede ser usada de conformidad con la presente invención. Ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden ser usados de conformidad con la presente invención incluyen línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas de crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovario de hámster Chino  $\pm$ DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 77:4216 (1980)); células 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-1

587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); 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). En una modalidad, la presente invención se usa en el cultivo de y expresión de, polipéptidos y proteínas a partir de líneas de células CHO.

Adicionalmente, cualquier número de líneas de células de hibridoma comercialmente disponibles y no comercialmente disponibles que expresan los polipéptidos o proteínas pueden ser usados de conformidad con la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que las líneas de células de hibridoma tendrán diferentes requerimientos de nutrición y/o requerirán diferentes condiciones de cultivo para crecimiento óptimo y expresión de la proteína y polipéptido, y será capaz de modificar las condiciones como sean necesarias.

Como se indica anteriormente, en muchos casos las células serán seleccionadas o diseñadas por ingeniería genética para producir altos niveles de proteína o polipéptido. A menudo, las células son diseñadas por ingeniería genética para producir altos niveles de proteína, por ejemplo, por introducción de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés y/o por introducción de elementos de control que regulan la expresión del gen (sea endógeno o introducido) que codifica el polipéptido de interés.

Ciertos polipéptidos pueden tener efectos perjudiciales en el crecimiento celular, viabilidad celular, o alguna otra característica de las células que finalmente limitan la producción del polipéptido o proteína de interés en alguna forma. Aún entre una población de células de un tipo particular diseñado por ingeniería para expresar un polipéptido específico, existe variabilidad dentro de la población celular de manera que ciertas células individuales crecerán mejor y/o producirán más polipéptidos de interés. En ciertas modalidades de la presente invención, la línea celular es empíricamente seleccionada por el practicante para crecimiento robusto bajo las condiciones particulares elegidas para cultivar las células. En otras modalidades, las células individuales diseñadas por ingeniería para expresar un polipéptido particular son elegidas para producción a gran escala con base en el crecimiento celular, densidad celular final, porcentaje de viabilidad celular, título del polipéptido expresado o cualquier combinación de estos o cualquiera de otras condiciones consideradas importantes por el practicante.

#### 30 *Producción de Cultivo Celular por Lote Alimentado*

Los procedimientos típicos para producir un polipéptido de interés incluyen cultivos por lotes para expansión de la siembra y etapa de producción de cultivo por lote alimentado. Los procesos de cultivo sembrados por lotes tradicionalmente comprenden inocular un cultivo de producción a gran escala con un cultivo de siembra de una densidad celular particular, haciendo crecer las células bajo condiciones que conducen al crecimiento y viabilidad celular, y transferir el cultivo de siembra a la siguiente etapa cuando las células alcanzan una densidad celular especificada. Los procedimientos de cultivo por lote alimentado incluyen una etapa o etapas adicionales para suplementar el cultivo por lotes con nutrientes y otros componentes que son consumidos durante el crecimiento de las células. Uno de habilidad ordinaria en la técnica reconocerá que la presente invención puede ser empleada en cualquier sistema en el cual las células son cultivadas que incluye, pero no se limita a, lote, lote alimentado y sistemas de perfusión. En ciertas modalidades preferidas de la presente invención, las células se hacen crecer en sistemas por lotes o lote alimentado.

#### 45 *Medio Enriquecido*

La presente invención hace uso de formulaciones de medio químicamente definido, enriquecido, que cuando se usa de conformidad con otras etapas de cultivo descritas en la presente, incrementan la densidad celular viable de las células hospederas en cultivo N-1 y/o proporcionan más nutrientes en el cultivo de producción con densidad de alta siembra, con relación a células hospederas cultivadas en medio no enriquecido. Las formulaciones de medio enriquecido de la presente invención que se han mostrado por tener efectos benéficos en el crecimiento celular o en la producción de polipéptido de interés incluyen i) una cantidad incrementada de una fuente de carbono y/o ii) nutrientes incrementados con relación a un medio de cultivo estándar. Sin embargo, la fuente de carbono puede ser: caseína, lactato, dextrosa, fructuosa, fructano, glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, acetato, glicerol, sorbitol, manitol, sacarosa, xilosa, melasas, fucosa, glucosamina, dextrano, una grasa, un aceite, glicerol, acetato de sodio, arabinosa, proteína de soja, proteína soluble, rafinosa, amilosa, almidón, triptona, extracto de levadura y combinaciones de los mismos, y los nutrientes pueden ser aminoácidos. El medio enriquecido es enriquecido con medio libre a 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % con una fuente de carbono y/o nutrientes con relación al medio no enriquecido. Uno de habilidad ordinaria en la técnica entenderá que las formulaciones del medio de la presente invención abarcan tanto medio definido como no definido.

Un resultado inesperado de usar medio enriquecido, se muestra en los Ejemplos 1-3, que son células hospederas cultivadas en un método por lotes con medio enriquecido durante la etapa de cultivo N-1 que muestra densidad celular viable incrementada con relación a células hospederas cultivadas en un método por lotes con medio no enriquecido. También, las células hospederas cultivadas en un método por lotes con medio enriquecido muestran densidad celular viable similar y/o viabilidad celular como célula hospedera cultivada en un método por lote

alimentado sin medio enriquecido. De este modo, las células hospederas cultivadas en un método por lotes con medio enriquecido pueden lograr resultados similares a células hospederas cultivadas en un sistema de perfusión o lote alimentado con medio no enriquecido.

5 Otro resultado inesperado de usar medio enriquecido, se muestra en los Ejemplos 1-3, es que los cultivos de producción que se sembraron de células que crecen en un cultivo por lotes con medio enriquecido que tiene títulos similares para el polipéptido de interés como los cultivos de producción que se sembraron con células a partir de métodos de perfusión o lote alimentado sin medio enriquecido. Las condiciones listadas anteriormente pueden ser usadas ya sea individualmente o en varias combinaciones entre sí.

10 Cualquiera de estas formulaciones de medio descritas en el presente documento pueden ser opcionalmente suplementadas como sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento, particularmente iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos usualmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, hidrolizados de proteína, o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas modalidades de la presente invención, puede ser benéfico suplementar el medio con inductores químicos tales como hexametileno-bis(acetamida) ("HMBA") y butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales pueden ser agregados al comienzo del cultivo o pueden ser agregados en un punto posterior con el fin de rellenar los nutrientes agotados o por otra razón. Uno de habilidad ordinaria en la técnica será consciente de cualquiera de los suplementos deseables o necesarios que pueden ser incluidos en las formulaciones de medios descritos.

#### *Proporcionar un Cultivo Celular de Mamífero*

25 Una vez que se ha identificado una célula que expresa el polipéptido o proteína de interés, la célula es propagada en cultivo por cualquiera de la variedad de los métodos bien conocidos por uno de habilidad ordinaria en la técnica. La célula que expresa el polipéptido o proteína de interés es típicamente propagada haciéndola crecer a una temperatura y en un medio que conduce a la supervivencia, crecimiento y viabilidad de la célula. El volumen de cultivo inicial puede ser de cualquier tamaño, pero es a menudo más pequeño que el volumen de cultivo del biorreactor de producción usado en la producción final del polipéptido o proteína de interés, y frecuentemente las células son pasadas varias veces en biorreactores de volumen incrementado previo a sembrar el biorreactor de producción. Una vez que las células han alcanzado una densidad celular viable específica, las células se hacen crecer en un biorreactor para incrementar además, el volumen de las células viables. Estos biorreactores son referidos como N-1, N-2, N-3, y etc. "N" se refiere al biorreactor de cultivo de producción principal, mientras el "N-1" significa el biorreactor previo al cultivo de producción principal, y así sucesivamente.

35 El cultivo celular puede ser agitado o sacudido para incrementar la oxigenación del medio y dispersión de nutrientes a las células. Alternativamente o adicionalmente, los dispositivos de dispersión especiales que son bien conocidos en la técnica pueden ser usados para incrementar y controlar la oxigenación del cultivo. De conformidad con la presente invención, uno de habilidad ordinaria en la técnica entenderá que puede ser benéfico controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor, que incluyen pero no se limitan a pH, temperatura, oxigenación, etc.

45 La densidad celular de partida en el biorreactor N-3 puede ser elegida por uno de habilidad ordinaria en la técnica. La densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser tan baja como  $2 \times 10^4$  células viables por ml. En ciertas modalidades, las densidades celulares de partida en el biorreactor N-3 pueden variar desde  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células viables por ml y superior. Cultivar las células hospederas de N-3 con medio enriquecido puede conducir a densidades celulares viables de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml a  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  o  $30 \times 10^6$  células viables por ml y superior.

50 La densidad celular de partida en el biorreactor N-2 puede ser elegida por uno de habilidad ordinaria en la técnica. La densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser tan baja como  $2 \times 10^4$  células viables por ml. En ciertas modalidades, las densidades celulares de partida en el biorreactor N-2 pueden variar desde aproximadamente  $2 \times 10^4$  células viables por ml hasta aproximadamente  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células viables por ml y superior. Cultivar las células hospederas N-2 con medio enriquecido puede conducir a densidades celulares viables de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml hasta  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  o  $30 \times 10^6$  células viables por ml y superior.

60 La densidad celular de partida en el biorreactor N-1 puede ser elegida por uno de habilidad ordinaria en la técnica. La densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser tan baja como una célula única por volumen de cultivo. En ciertas modalidades, las densidades celulares de partida en el biorreactor de producción pueden variar desde aproximadamente  $2 \times 10^4$  células viables por ml hasta aproximadamente  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células viables por ml y superior. Cultivar las células hospederas N-1 con medio enriquecido puede conducir a densidades celulares viables de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml hasta aproximadamente  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  o  $30 \times 10^6$  células viables por ml y superior. De acuerdo con la invención, las células hospederas se cultivan en un medio enriquecido para obtener una densidad de células viables en la etapa N-1 de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml.

65

- La densidad celular de partida en el biorreactor de producción N puede ser elegida por uno de habilidad ordinaria en la técnica. La densidad celular de partida en el biorreactor de producción N puede ser tan baja como  $1 \times 10^6$  células por ml. Las densidades celulares de partida en el biorreactor de producción pueden variar desde aproximadamente  $1 \times 10^6$  células viables por ml hasta aproximadamente  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células viables por ml y superior. De acuerdo con la presente invención, la densidad celular de partida en el biorreactor de producción es de al menos  $1,5 \times 10^6$  células viables por ml. Cultivar las células hospederas con medio enriquecido puede conducir a densidades celulares viables de al menos  $1 \times 10^6$  células viables por ml hasta aproximadamente  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  o  $30 \times 10^6$  células viables por ml y superior.
- En general, los cultivos celulares de N-1 pueden hacerse crecer a una densidad deseada antes de sembrar al siguiente biorreactor de producción. Se prefiere que la mayoría de las células permanezcan vivas previo al sembrado, aunque la viabilidad total cercana o total no se requiere. En una modalidad de la presente invención, las células pueden ser removidas del sobrenadante, por ejemplo, por centrifugación a baja velocidad. También puede ser deseable lavar las células removidas con un medio antes de sembrar al siguiente reactor para remover cualquiera de los productos residuales metabólicos o componentes de medio indeseados. El medio puede ser el medio en el cual las células se hicieron crecer previamente o pueden ser un medio diferente o una solución de lavado seleccionada por el practicante de la presente invención.
- Las células de N-1 pueden entonces ser diluidas a una densidad apropiada para sembrar el biorreactor de producción. En una cierta modalidad de la presente invención, las células son diluidas en el mismo medio que será usado en el biorreactor de producción. Alternativamente, las células pueden ser diluidas en otro medio o solución, dependiendo de las necesidades y deseos del practicante de la presente invención o para acomodar los requerimientos particulares de las células mismas, por ejemplo, si están siendo almacenadas por un periodo de tiempo corto previo a sembrar el biorreactor de producción.
- De conformidad con la presente invención, el biorreactor de producción puede ser cualquier volumen que es apropiado para producción a gran escala de polipéptidos o proteínas. En ciertas modalidades, el volumen del biorreactor de producción es al menos de 500 litros. En otras modalidades, el volumen del biorreactor de producción es 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 15.000, o 20.000 litros o more, o cualquier volumen entre estos. Uno de habilidad ordinaria en la técnica será consciente de, y será capaz de elegir un biorreactor adecuado para uso para practicar la presente invención. El biorreactor de producción puede ser construido de cualquier material que está conduciendo al crecimiento y viabilidad celular que no interfiere con la expresión o estabilidad del polipéptido o proteína producido.
- En ciertas modalidades de la presente invención, la etapa de producción comprende medio enriquecido con relación al medio no enriquecido. Por ejemplo, el medio es enriquecido por un medio libre al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % con relación al medio no enriquecido. En ciertas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa). En ciertas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de nutrientes (por ejemplo, aminoácidos). En ciertas modalidades, el medio enriquecido comprende una cantidad incrementada de una fuente de carbono y nutrientes.
- La temperatura del cultivo celular en la etapa N-1 o la etapa de producción será seleccionada con base principalmente en el intervalo de temperaturas en las cuales el cultivo celular permanece viable. En general, la mayoría de células de mamífero crecen bien dentro de un intervalo de aproximadamente  $25^\circ\text{C}$  a  $42^\circ\text{C}$ . Preferiblemente, las células de mamífero crecen bien dentro del intervalo de aproximadamente  $35^\circ\text{C}$  a  $40^\circ\text{C}$ . Aquellos de habilidad ordinaria en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura apropiada o temperaturas en las cuales crecen las células, dependiendo de las necesidades de las células y los requerimientos de producción del practicante. Opcionalmente, la temperatura se mantiene a una temperatura constante, única. Opcionalmente, la temperatura se mantiene dentro de un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura puede ser incrementada o reducida constantemente. Alternativamente, la temperatura puede ser incrementada o reducida por cantidades discretas en varios tiempos. Uno de habilidad ordinaria en la técnica será capaz de determinar si una temperatura única o múltiple debe ser usada, y si la temperatura debe ser ajustada constantemente o por cantidades discretas.
- Las células en la etapa N-1 o la etapa de producción pueden hacerse crecer por una cantidad mayor o menor de tiempo, dependiendo de las necesidades del practicante y el requerimiento de las células mismas. En una modalidad, las células se hacen crecer por un periodo de tiempo suficiente para lograr una densidad celular viable que es un porcentaje dado de la densidad celular viable máxima que las células podrían eventualmente alcanzar si se dejan crecer sin alterarlas. Las células son dejadas crecer por un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de inicio del cultivo celular, la temperatura en la cual las células se hacen crecer, y la velocidad de crecimiento intrínseco de las células, las células pueden hacerse crecer por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. El practicante de la presente invención será capaz de elegir la duración de crecimiento dependiendo de los requerimientos de producción del polipéptido y las necesidades de las células mismas.

65 *Monitoreo de Condiciones de Cultivo*

En ciertas modalidades, se monitorean condiciones particulares del cultivo celular en crecimiento. El monitoreo de condiciones de cultivo celular permite la determinación de si el cultivo celular está produciendo polipéptido o proteína recombinante a niveles subóptimos o si el cultivo está a punto de entrar en una etapa de producción subóptima.

5 Como ejemplos no limitantes, puede ser benéfico o necesario monitorear la temperatura, pH, densidad celular, viabilidad celular, densidad de células viables integradas, niveles de lactato, niveles de amonio, osmolaridad, o título del polipéptido o proteína expresados. Numerosas técnicas son bien conocidas en el arte que permiten a uno de habilidad ordinaria en la técnica medir estas condiciones. Por ejemplo, la densidad celular puede ser medida usando un hemocitómetro, un contador Coulter (Vi-Cell), o examinación de Densidad Celular (CEDEX). La densidad celular viable puede ser determinada por teñido de una muestra de cultivo con azul Tripano. Puesto que solamente las células muertas tomadas del azul Tripano, la densidad de células viables puede ser determinada contando el número total de células, dividiendo el número de células que toman el tinte por el número total de células, y tomando el recíproco. La HPLC puede ser usada para determinar los niveles de lactato, amonio o el polipéptido o proteína expresada. Alternativamente, el nivel del polipéptido o proteína expresados puede ser determinado por técnicas de biología molecular estándar tales como el teñido coomassie de geles SDS-PAGE, manchado Western, ensayos Bradford, ensayos Lowry, ensayos Biuret, y absorbancia UV. Puede también ser benéfico o necesario monitorear las modificaciones posteriores a la traducción del polipéptido o proteína expresados, que incluyen fosforilación y glicosilación.

#### 20 *Aislamiento de Polipéptido Expresado*

En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar proteínas o polipéptidos expresados de conformidad con la presente invención. En una modalidad, el polipéptido o proteína expresados, son secretados en el medio y de este modo las células y otros sólidos pueden ser removidos, como por centrifugación o filtración, por ejemplo, como una primera etapa en el proceso de purificación. Esta modalidad es particularmente útil cuando se usa de conformidad con la presente invención, puesto que los métodos y composiciones descritos en la presente resultan en viabilidad incrementada. Como un resultado, algunas células mueren durante el proceso de cultivo, y pocas enzimas proteolíticas son liberadas en el medio, lo cual puede reducir potencialmente el rendimiento del polipéptido o proteína expresados.

#### 30 *Polipéptidos Recombinantes*

Los métodos de la presente invención pueden ser usados para producción a gran escala de cualquiera de los polipéptidos recombinantes de interés, que incluyen anticuerpos terapéuticos. Ejemplos no limitantes de polipéptidos recombinantes que pueden ser producidos por los métodos proporcionados en la presente incluyen anticuerpos (que incluyen fragmentos de inmunoglobulinas intactos, o fragmentos de anticuerpo), enzimas (por ejemplo, una galactosidasa), proteínas (por ejemplo, eritropoyetina humana, factor de necrosis del tumor (TNF), o un alfa o beta interferón), receptores celulares (por ejemplo, EGFR) o proteínas inmunogénicas o antigénicas o fragmentos de proteína (por ejemplo, proteínas para uso en una vacuna). Los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos anti-HER2 que incluyen Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992); anticuerpos anti-HER3; anticuerpos anti-HER4; Patente Estadounidense No. 5.725.856); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico "C2B8" como en Patente Estadounidense No. 5.736.137 (RITUXAN®), una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la Patente Estadounidense No. 5.721.108B1, o Tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John *et al.*, *Chest*, 103:932 (1993), y Publicación Internacional No. WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF que incluyen anticuerpos anti-VEGF de afinidad madura y/o humanizados tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN® (Kim *et al.*, *Growth Factors*, 7:53-64 (1992), Publicación Internacional No. WO 96/30046, y WO 98/45331, publicada en Oct. 15, 1998); anticuerpos anti-PSCA (WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, que incluyen S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (WO00/75348); anti-CD11a (Patente Estadounidense No. 5.622.700, WO 98/23761, Steppe *et al.*, *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991), y Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58:377-380 (1994)); anti-IgE (Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993), y Publicación Internacional No. WO 95/19181); anti-CD18 (Patente Estadounidense No. 5.622.700, publicada en Abril 22, 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicada en Julio 31, 1997); anti-IgE (que incluye E25, E26 y E27; Patente Estadounidense No. 5.714.338, publicada en Feb. 3, 1998 o Patente Estadounidense No. 5.091.313, publicada en Feb. 25, 1992, WO 93/04173 publicada en Mar. 4, 1993, o Solicitud Internacional No. PCT/US98/13410 presentada en Jun. 30, 1998, Patente Estadounidense No. 5.714.338); anticuerpo receptor anti-Apo-2 (WO 98/51793 publicada en Nov. 19, 1998); anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  que incluyen cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (Véase, Patente Estadounidense No. 5.672.347 publicada en Sep. 30, 1997, Lorenz *et al.*, *J. Immunol.* 156(4):1646-1653 (1996), y Dhainaut *et al.*, *Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469 (1995)); anti-Factor tisular (TF) (Patente Europea No. 0 420 937 B1 otorgada en Nov. 9, 1994); integrina  $\alpha_4\beta_7$  anti-humana (WO 98/06248 publicada en Feb. 19, 1998); anti-EGFR (anticuerpo 225 humanizado o quimérico como en WO 96/40210 publicada en Dec. 19, 1996); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (Patente Estadounidense No. 4.515.893 publicada en Mayo 7, 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (Véase, Patente Estadounidense No. 5.693.762 publicada en Dic. 2, 1997); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, *Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-337 (1988)); anticuerpos del receptor anti-Fc tales como el

anticuerpo M22 dirigido contra Fc $\gamma$ R1 como en Graziano *et al.*, *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos de antígeno anti-carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey *et al.*, *Cancer Res.* 55(23 Supl): 5935s-5945s (1995); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama que incluyen huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.*, *Cancer Res.* 55(23 Sup): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton *et al.*, *Eur J. Immunol.* 26(1):1-9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis *et al.*, *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, *Cancer Res* 55(23 Suppl): 5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid *et al.*, *Cancer Res* 55(23 Suppl): 5899s-5907s (1995)); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-HIV tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo BEC2 de epítipo anti-idiotípico GD3; anticuerpo anti- $\alpha\beta$ 3 VITAXIN®; anticuerpo de carcinoma de células renales anti-humanas tales como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-human 17-1A (3622W94); anticuerpo de tumor colorrectal anti-humano (A33); anticuerpo de melanoma anti-humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; carcinoma de células escamosas anti-humanas (SF-25); anticuerpos de antígeno de leucocito anti-humano (HLA) tales como Smart ID10; anticuerpos anti-PD-1; anticuerpos anti-PD-L1; anticuerpos anti-LAG-3; anticuerpos anti-GITR; anticuerpos anti-TIGIT; anticuerpos anti-CXCR4; anticuerpos anti-CD73; y el anticuerpo Oncolym anti-HLA DR (Lym-1).

## 20 EJEMPLOS

### Líneas y Medios Celulares

Se usaron tres diferentes líneas de células CHO que producen estos diferentes anticuerpos o polipéptidos monoclonales en estos experimentos. La siembra, medio basal y libre fueron químicamente definidos.

### Cultivos de Siembra N-1

Para cultivos N-1 por lotes y lote alimentado, se hicieron crecer ya sea en matraces sacudidos de 250 ml en un volumen inicial de 80-100 ml o matraces sacudidos de 2 l con un volumen inicial de 1000 ml. Se usó una velocidad de agitación de 150 rpm en un sacudidor orbital con distancia de tiro de 25 mm. Los ajustes de la incubadora fueron a temperatura constante de 36,5 °C y se controló el CO<sub>2</sub> a 5 %. Para los cultivos N-1 por lotes, los medios de siembra fueron ya sea sin enriquecimiento o con enriquecimiento de glucosa, o con enriquecimientos de glucosa y nutriente. No se agregó alimentación a los cultivos N-1 por lotes. Para los cultivos N-1 por lote alimentado, el medio de siembra se alimentó diariamente del día 3 en adelante.

Los cultivos N-1 por perfusión involucraron hacer crecer las células en bolsas de 10 l de células con un volumen inicial de 5 l. La velocidad de oscilación se controló a 28 rpm y el ángulo de oscilación se ajustó a 7°. Se controló el CO<sub>2</sub> a 4 % entre el día 0 y 1 y después se apagó. Un ATF-2 auxiliar (Repligen) se conectó a la bolsa celular para perfundir el cultivo. El medio de cultivo fresco (concentrado 1x) se agregó continuamente mientras el medio de cultivo viejo se removió continuamente a la misma velocidad de conformidad con el esquema 0,5 VVD D2-4, incrementada a 1,0 VVD D4-5, e incremento final a 2,0 VVD D5-6.

### Cultivos de Producción

Los biorreactores de producción por lote alimentado se realizaron en biorreactores Sartorius de 5 l con volumen de trabajo inicial de 3,3 l.

### Análisis

La densidad celular viable (VCD) y viabilidad celular se midieron fuera de línea usando un contador celular automatizado Vi-Cell (Beckman Coulter). Las muestras de cultivo también se analizaron fuera de línea usando un Cedex Bio HT (Roche) para monitorear la glucosa, glutamina, glutamato, lactato, y amonio. Para cultivos de biorreactor, el pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> también se midieron fuera de línea usando un BioProfile pHOX (Nova Biomedical). Se usó un método UPLC de Proteína A para medir los títulos de proteína, los cuales se reportaron como valores normalizados.

Se realizó cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) para alto peso molecular (HMW) usando una columna Tosoh TSK G3000SW<sub>xl</sub>, 7,8 x 30 cm, 5 $\mu$ m, con gradiente isocrático monitoreado a 280 nm en un sistema Waters Alliance HPLC (Milford, MA) equipado con un automuestreador controlado por temperatura y detector Waters 2996 PDA.

Variantes de carga se sometieron a ensayo por enfoque isoeléctrico capilar de imagen (iCIEF), el cual se realizó en un instrumento Protein Simple iCE3 con un automuestreador Alcott 720NV (San José, CA). Las muestras se mezclaron con marcadores pl apropiados, anfolitos, y urea e inyectaron en un cartucho capilar recubierto con fluorocarbono. Se aplicó alto voltaje y las variantes cargadas migraron a su pl respectivos. Una cámara UV capturó

la imagen a 280 nM. El pico principal se identificó y los picos que migraron en el intervalo ácido y el intervalo básico se sumaron, cuantificaron, y reportaron como porcentaje de área relativa.

Se realizó análisis de N-glicano usando un kit comercialmente disponible de Preparación Rápida de N-Glicano Prozyme, GlykoPrep® con 2-AB (Hayward, CA). Los oligosacáridos libres se perfilaron usando un Glicano BEH Amida Acquity UPLC, 130 Å, 1,7 µm, columna 2,1 x 10 mm (Milford, MA) en un sistema Waters Acquity H-Class (Milford, MA) equipado con un automuestreador de temperatura controlada y detector de fluorescencia.

### Ejemplo 1

#### Línea de Células A: Cultivos de Siembra N-1

Para la línea de células A, los cultivos N-1 se hicieron crecer en lote, lote con enriquecimiento de glucosa, lote con enriquecimiento de glucosa y nutrientes, lote alimentado o modo de perfusión. El cultivo N-1 por lotes alcanzó la VCD pico de solamente  $15 \times 10^6$  células por ml y no logró mantener la alta viabilidad celular cerca del término del periodo de cultivo (Figura 1A). Por el contrario, el cultivo N-1 por lotes con enriquecimiento de glucosa alcanzó la VCD de  $17 \times 10^6$  células por ml y mantuvo >99 % de viabilidad celular (Figura 1A). De manera similar, tanto el lote alimentado N-1 como el lote N-1 con enriquecimientos de glucosa y nutriente crecieron a  $>20 \times 10^6$  células por ml en el día 6 y las viabilidades se mantuvieron a >99 % (Figuras 1A y 1B). Las células en cultivo N-1 por perfusión crecieron a  $44 \times 10^6$  células por ml en el día 6 y la viabilidad fue >99 % (Figuras 1A y 1B).

#### Línea de Células A para Producción del Polipéptido-1: Cultivos de Producción por Lote Alimentado de Alta Densidad

Para la línea de células A, cultivos de producción por lote alimentado de alta densidad se iniciaron usando siembras que crecen en lote enriquecido con glucosa, lote con glucosa enriquecida y nutrientes, cultivo por lote alimentado o perfusiones.

El cultivo de producción N se inoculó a alta densidad de siembra de  $5 \times 10^6$  células por ml por 14 días. La alimentación diaria se inició en el día 2 a un volumen de alimentación de 3,5 % del volumen de cultivo. El oxígeno disuelto (DO) se mantuvo a 40 % y el pH se controló entre 6,8 y 7,6. La temperatura se mantuvo inicialmente a 36,5 °C y se cambió a 34 °C en el día 4.

La Figura 2A demuestra que todos los cultivos de producción mantienen >90 % de viabilidad celular durante el periodo de cultivo completo. El cultivo de siembra por perfusión tiene una densidad celular viable máxima de  $22 \times 10^6$  células por ml comparado con  $17 \times 10^6$  células por ml por cultivo de siembra por lote alimentado y cultivos de siembra por lotes con ya sea glucosa enriquecida o glucosa enriquecida y nutrientes (Figura 2A). El título para el polipéptido-1 a partir del cultivo de siembra por perfusión fue de aproximadamente 9,3 g/l, mientras el cultivo de siembra por lote alimentado tiene un título de aproximadamente 9 g/l (Figura 2B). El título del polipéptido de interés a partir de la siembra por lote enriquecido con ya sea glucosa o glucosa y nutrientes fue de aproximadamente 8,5 g/l y 9 g/l, respectivamente. La Figura 2C muestra que los atributos de calidad tales como iCIEF, SEC, y N-glicano fueron similares para todas las condiciones de producción N con respecto de diferentes siembras N-1.

### Ejemplo 2

#### Línea de Células B: Cultivos de Siembra N-1

Para la línea de células B, los cultivos N-1 se hicieron crecer en lote, lote con enriquecimiento de glucosa, lote con enriquecimiento de glucosa y nutrientes, lote alimentado o modo de perfusión. El cultivo N-1 por lotes alcanzó la VCD pico de solamente  $24,5 \times 10^6$  células por ml y no logró mantener la alta viabilidad (Figuras 3A y 3B). Por el contrario, los cultivos N-1 por lotes enriquecidos con glucosa sola o enriquecidos con tanto glucosa como nutrientes alcanzaron  $\geq 25,5 \times 10^6$  células viables por ml y mantuvieron  $\geq 99$  % de viabilidad celular (Figuras 3A y 3B). De manera similar, los cultivos N-1 por lote alimentado N-1 crecieron a  $\geq 30 \times 10^6$  células viables por ml en el día 5 y las viabilidades se mantuvieron a  $\geq 99$  % (Figuras 3A y 3B). Las células en cultivo N-1 por perfusión crecieron a  $41 \times 10^6$  células por ml en el día 5 y la viabilidad fue  $\geq 99$  % (Figuras 3A y 3B).

#### Línea de Células B para Producción del Polipéptido-2: Cultivos de Producción por Lote Alimentado de Alta Densidad

Para la línea de células B, cultivos de producción por lote alimentado de alta densidad se iniciaron usando siembras que crecen en lote, lote con glucosa enriquecida y nutrientes, cultivo por lote alimentado o perfusiones.

El cultivo de producción se inoculó a alta densidad de siembra de  $3 \times 10^6$  células por ml por 14 días. La alimentación diaria se inició en el día 2 a un volumen de alimentación de 3,1 % del volumen de cultivo. El oxígeno disuelto (DO) se mantuvo a 40 % y el pH se controló entre 6,7 y 7,6. La temperatura se mantuvo a 36,5 °C.

La Figura 4A demuestra que todos los cultivos de producción mantuvieron >90 % de viabilidad celular durante el periodo de cultivo completo. El cultivo de siembra por perfusión tiene una densidad celular viable máxima de

aproximadamente  $26 \times 10^6$  células por ml, comparado con solamente aproximadamente  $24 \times 10^6$  células por ml para los cultivos de siembra por lote y lote alimentado con ya sea glucosa enriquecida o glucosa y nutrientes enriquecidos (Figura 4A). El título del polipéptido de interés a partir de los cultivos de siembra por perfusión y lote (glucosa enriquecida y nutrientes) cultivos fue de aproximadamente 3,2 g/l, mientras los cultivos de siembra por lote y lote alimentado tienen un título de aproximadamente 3 g/l (Figura 4B). La Figura 4C muestra que los atributos de calidad tales como iCIEF, SEC, y N-glicano fueron similares para todas las condiciones de producción N con respecto de diferentes siembras N-1.

### Ejemplo 3

#### Línea de Células C: Cultivo de Siembra N-1

Para la línea de células C, los cultivos N-1 se hicieron crecer en lote, lote con enriquecimiento de glucosa, lote con enriquecimiento de glucosa y nutrientes, lote alimentado o modo de perfusión. El cultivo N-1 del lote alcanzó la VCD pico de solamente a  $26 \times 10^6$  células por ml y no logró mantener la alta viabilidad (Figuras 5A y 5B). Por el contrario, los cultivos N-1 por lote enriquecidos con glucosa solo o enriquecidos con tanto glucosa como nutrientes alcanzaron  $\geq 30 \times 10^6$  células viables por ml y mantuvieron  $\geq 99$  % de viabilidad celular (Figuras 5A y 5B). De manera similar, los cultivos N-1 por lote alimentado N-1 crecieron a  $\geq 33 \times 10^6$  células viables por ml en el día 5 y las viabilidades se mantuvieron a  $\geq 99$  % (Figuras 5A y 5B). Las células en cultivo N-1 por perfusión crecieron a  $62 \times 10^6$  células por ml en el día 5 y la viabilidad fue  $\geq 99$  % (Figuras 5A y 5B).

#### Línea de Células C Para Producción del Polipéptido-3 (Experimento 1): Cultivos de Producción por Lote Alimentado de Alta Densidad Usando Siembras por Lote Alimentado o Lote con Glucosa Enriquecida y Nutrientes

Para la línea de células C, cultivos de producción por lote alimentado de alta densidad se iniciaron usando siembras que crecen en lote alimentado o lote con glucosa enriquecida y nutrientes culture.

El cultivo de producción se inició a una alta densidad de siembra de  $6 \times 10^6$  células por ml por 14 días. La alimentación diaria se inició en el día 2 a un volumen de alimentación de 5 % del volumen de cultivo D2-10 y después 3,3 % del volumen de cultivo inicial D11-13. La alimentación se realizó dos veces al día a la mitad de la cantidad indicada. El oxígeno disuelto (DO) se mantuvo a 40 % y el pH se controló entre 6,8 y 7,3. La temperatura se mantuvo inicialmente a  $36,5$  °C y se cambió a  $33$  °C en el día 6.

La Figura 6A demuestra que todos los cultivos de producción mantienen  $>80$  % de viabilidad celular durante el periodo de cultivo completo. Los cultivos de siembra por lote alimentado y de siembra por lote (glucosa enriquecida y nutrientes) tienen una densidad celular viable máxima de aproximadamente  $27 \times 10^6$  células por ml (Figura 6A). El título del polipéptido de interés a partir de los cultivos de siembra por lote alimentado y lote (glucosa enriquecida y nutrientes) fue de aproximadamente 4,3 g/l (Figura 6B). La Figura 6C muestra que los atributos de calidad tales como iCIEF, SEC, y N-glicano fueron similares para todas las condiciones de producción N con respecto de diferentes siembras de N-1.

#### Línea de Células C para producción del polipéptido-3 (Experimento 2): Cultivos de Producción por Lote Alimentado de Alta Densidad Usando Siembras por Perfusión o Lote Alimentado

Para la línea de células C, cultivos de producción por lote alimentado de alta densidad se iniciaron usando siembras que crecen en cultivo por lote alimentado o perfusión.

El cultivo de producción se inició a una alta densidad de siembra de  $6 \times 10^6$  células por ml por 14 días. La alimentación diaria se inició en el día 1 a un volumen de alimentación de 3,7 % del volumen de cultivo. El oxígeno disuelto (DO) se mantuvo a 40 % y el pH se controló entre 6,8 y 7,3. La temperatura se mantuvo inicialmente a  $36,5$  °C y se cambió a  $33$  °C en el día 6.

La Figura 7A demuestra que todos los cultivos de producción mantienen  $>80$  % de viabilidad celular durante el periodo de cultivo completo. El cultivo sembrado por perfusión tiene una densidad celular viable máxima de aproximadamente  $33 \times 10^6$  células por ml, mientras el cultivo sembrado por lote alimentado tiene una densidad celular viable máxima de aproximadamente  $30 \times 10^6$  células por ml (Figura 7A). El título del polipéptido de interés a partir de los cultivos sembrados por perfusión y lote alimentado fue de aproximadamente 7 g/l (Figura 7B). La Figura 7C muestra que los atributos de calidad tales como iCIEF, SEC, y N-glicano fueron similares para todas las condiciones de producción N con respecto de diferentes siembras de N-1.

### Ejemplo 4

Los procesos de manufacturación a gran escala para las tres moléculas se realizaron en las instalaciones GMP de Bristol-Myers Squibb GMP ya sea a escala 1000 l (para la línea de células A) o instalación de escala a escala de 500 l (para las líneas de células B y C). Los cultivos sembrados N-1 para las líneas de células A y B usan el cultivo por lotes glucosa enriquecida y nutrientes, mientras la siembra N-1 para la línea de células C se cultivó en el modo de

5 lote alimentado. Todos los tres procesos se mostraron por ser robustos y escalables a 1000 l o 500 l. Los perfiles de densidad celular, título y calidad de producto son consistentes con aquellos de los cultivos de satélite en biorreactores a escala de laboratorio (Figuras 8A-10C). Para la línea de células A, los cultivos de producción se recolectaron en el día 10 debido al título excepcionalmente alto que excede la capacidad para purificación corriente abajo. La duración de cultivo acortada para la línea de células A permite a un nuevo cultivo de producción, ser inoculado cada semana (con dos recipientes de producción), incrementando significativamente el rendimiento de producción.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción a gran escala de un polipéptido recombinante de interés, que comprende cultivar células hospedadoras que expresan el polipéptido recombinante de interés en un sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde las células hospedadoras se cultivan en un medio enriquecido para obtener una densidad de células viables en la etapa N-1 de al menos  $5 \times 10^6$  células viables por ml; e inocular un sistema de cultivo de producción N a una densidad de siembra alta de al menos  $1,5 \times 10^6$  células por ml con células hospedadoras del sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, en donde el medio enriquecido comprende una mayor cantidad de una fuente de carbono en relación con el medio no enriquecido y/o una mayor cantidad de nutrientes seleccionados entre aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y poliaminas en relación con el medio no enriquecido.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, es un cultivo por lotes y la célula hospedadora se cultiva en un medio enriquecido, o en donde el sistema de cultivo no basado en perfusión, de etapa N-1, es un cultivo por lote alimentado y la célula hospedadora se cultiva en un medio de siembra sin la adición de un medio de alimentación.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la densidad celular viable en una etapa N-1 es de al menos  $10 \times 10^6$ , al menos  $15 \times 10^6$ , al menos  $20 \times 10^6$ , al menos  $25 \times 10^6$  o al menos  $30 \times 10^6$  células viables por ml.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la viabilidad celular el último día de la etapa N-1 es de al menos el 80 %, al menos el 85 % o al menos el 90 %.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el medio está enriquecido por un medio de alimentación en al menos el 5 % con relación al medio no enriquecido, al menos el 10 % con relación al medio no enriquecido, al menos el 15 % con relación al medio no enriquecido o al menos el 20 % con relación al medio no enriquecido.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el medio enriquecido o medio de alimentación comprende una mayor cantidad de una fuente de carbono.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la fuente de carbono es glucosa.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el medio enriquecido o el medio de alimentación comprende una mayor cantidad de nutrientes seleccionados entre aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y poliaminas.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el medio enriquecido comprende una mayor cantidad de una fuente de carbono y nutrientes seleccionados entre aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales y poliaminas.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la célula hospedera es una célula de mamífero.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la célula hospedera es una célula CHO.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el sistema de cultivo de producción N es un biorreactor de lote alimentado.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el título del polipéptido de interés es de al menos 100 mg/l, al menos 1 g/l, al menos 3 g/l, al menos 5 g/l o al menos 10 g/l.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde las células hospedadoras se cultivan en un medio basal o un medio basal enriquecido para obtener una densidad de células viables en etapa de producción N de al menos  $1,5 \times 10^6$ , al menos  $5 \times 10^6$  o al menos  $10 \times 10^6$  células viables por ml.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende además la etapa de aislar el polipéptido de interés del sistema de cultivo de producción N.

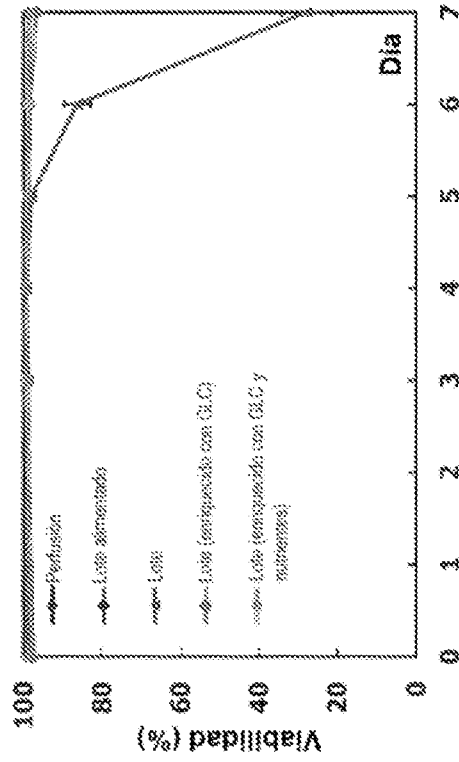


FIGURA 1B

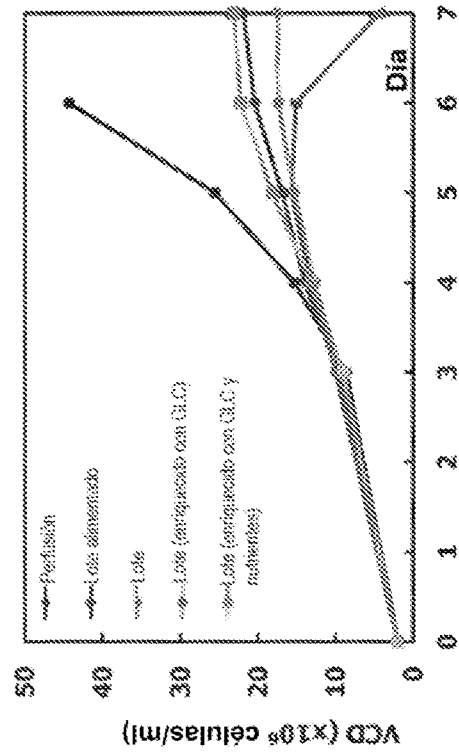


FIGURA 1A

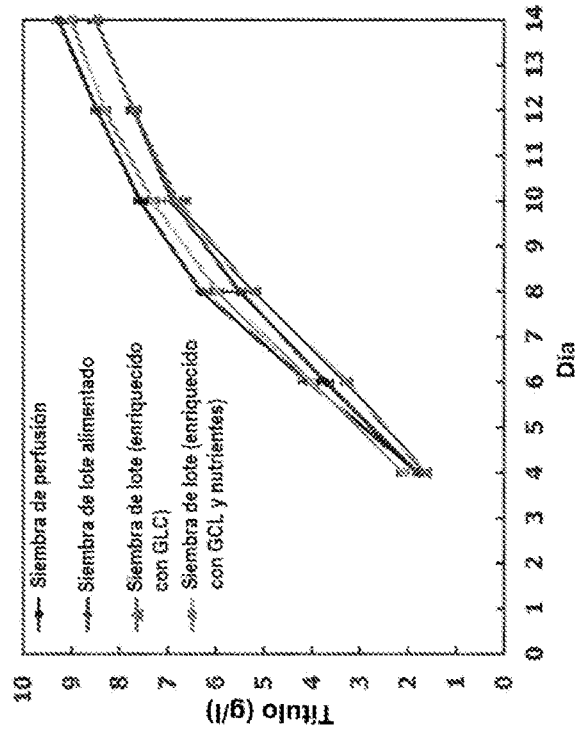


FIGURA 2B

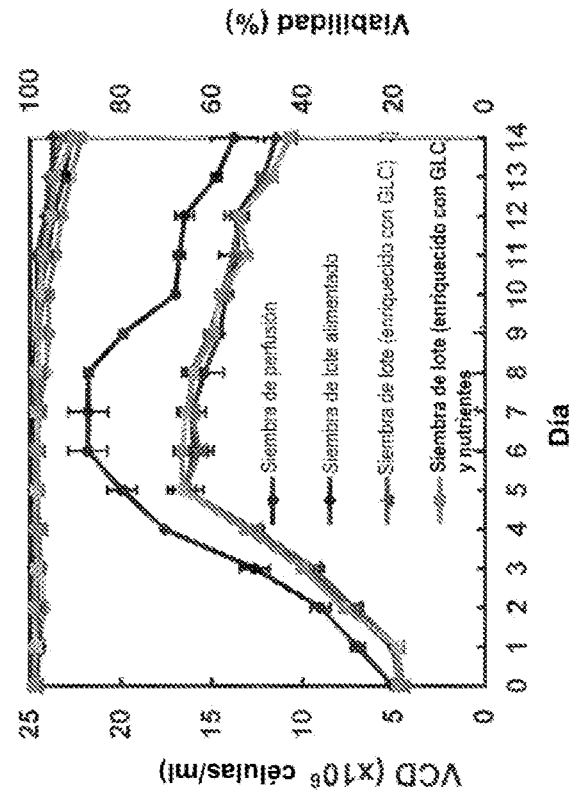


FIGURA 2A

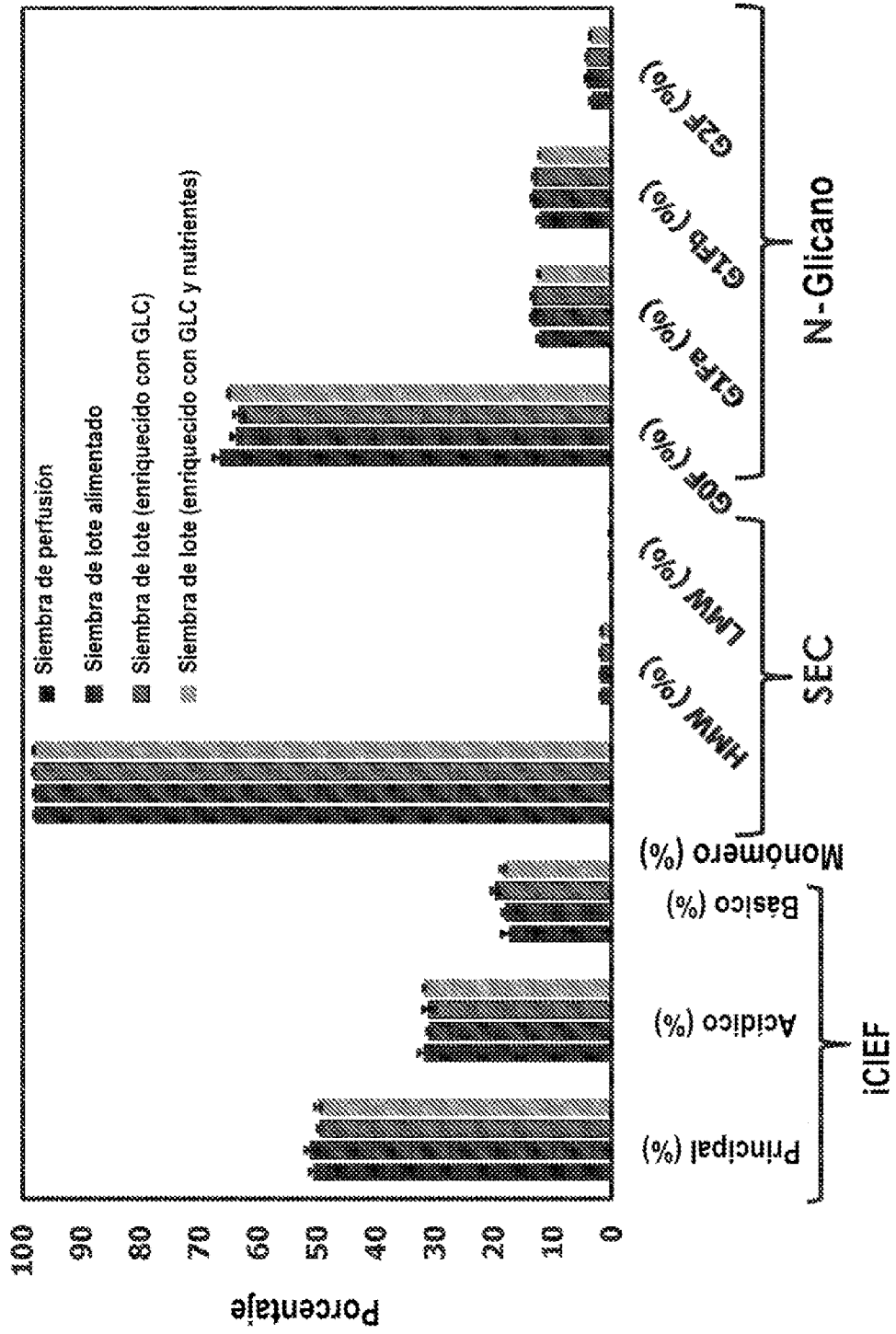


FIGURA 2C

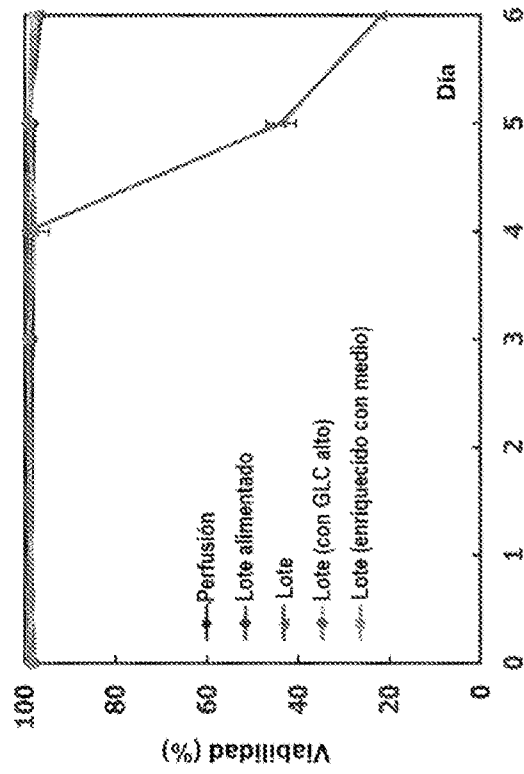


FIGURA 3B

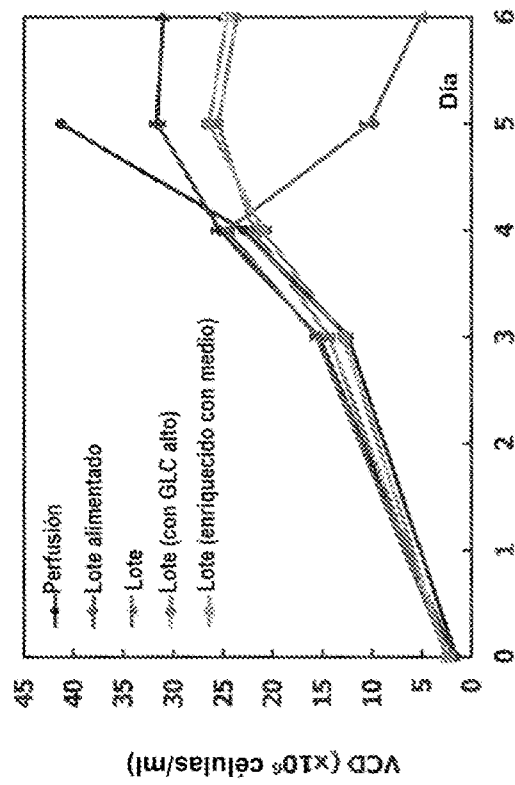


FIGURA 3A

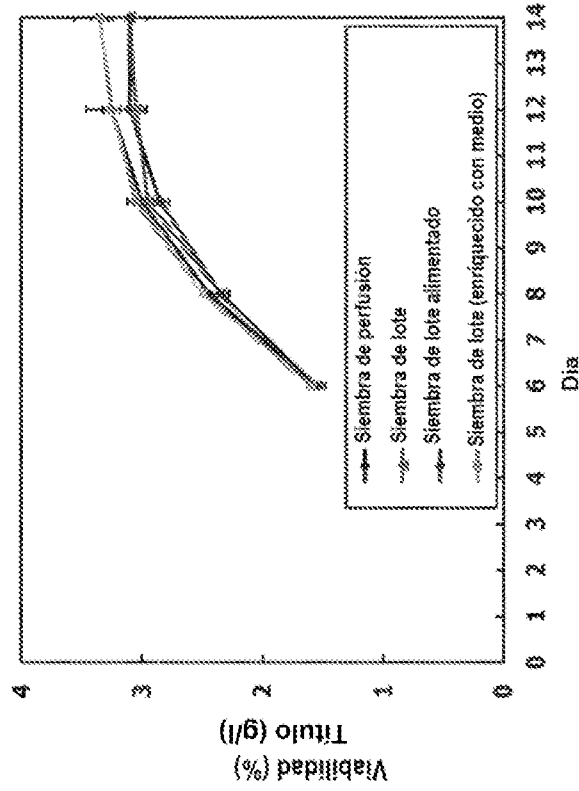


FIGURA 4B

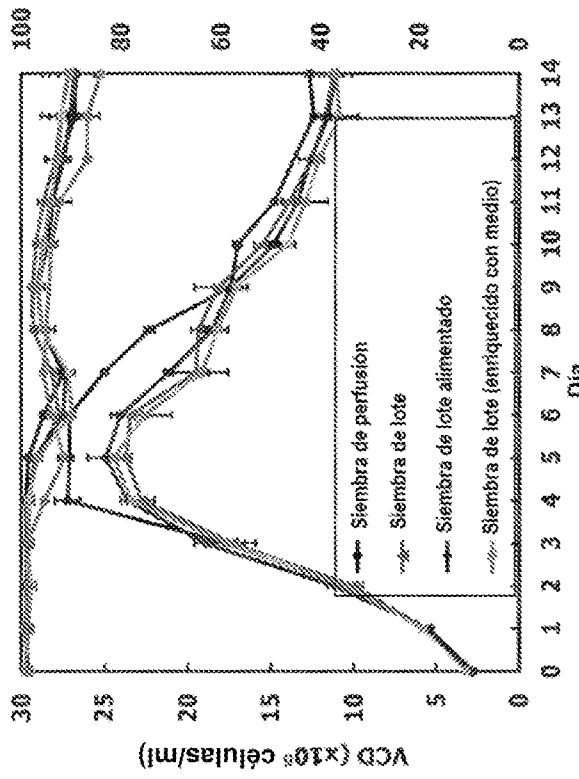


FIGURA 4A

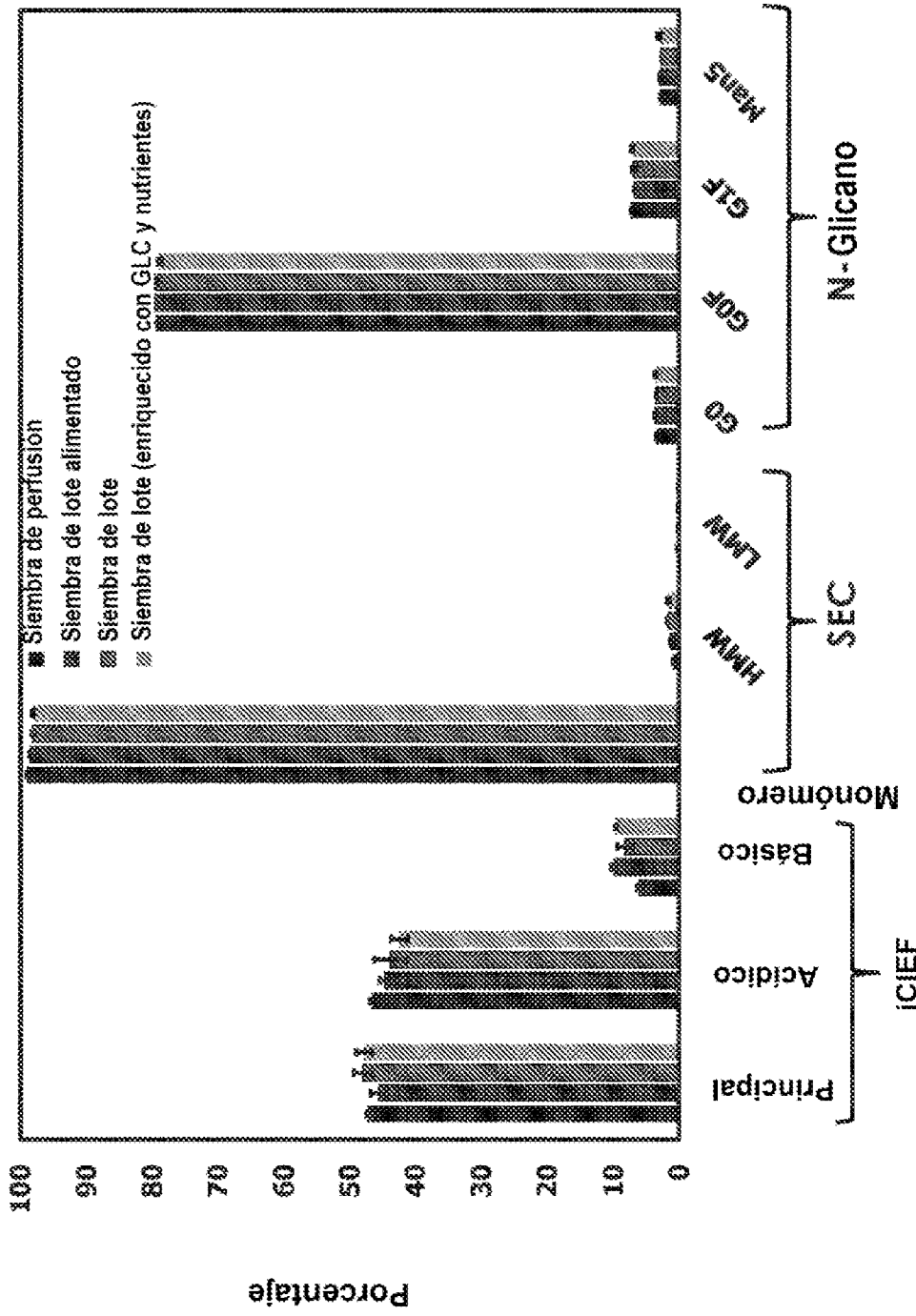


FIGURA 4C

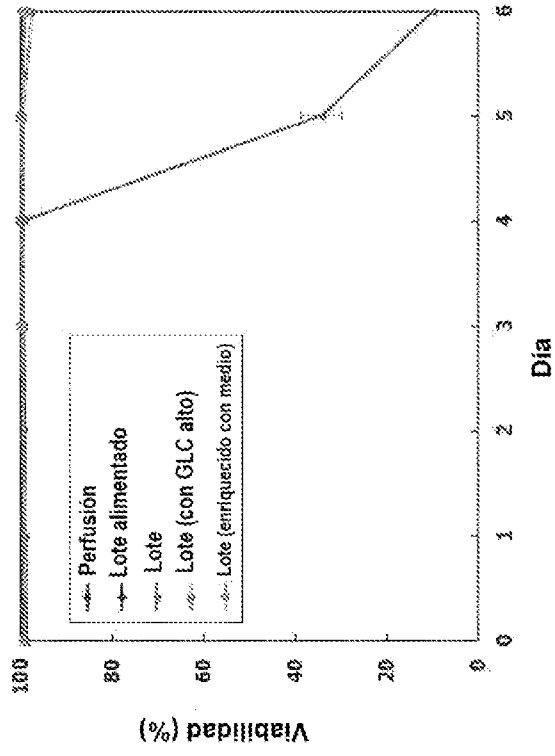


FIGURA 5B

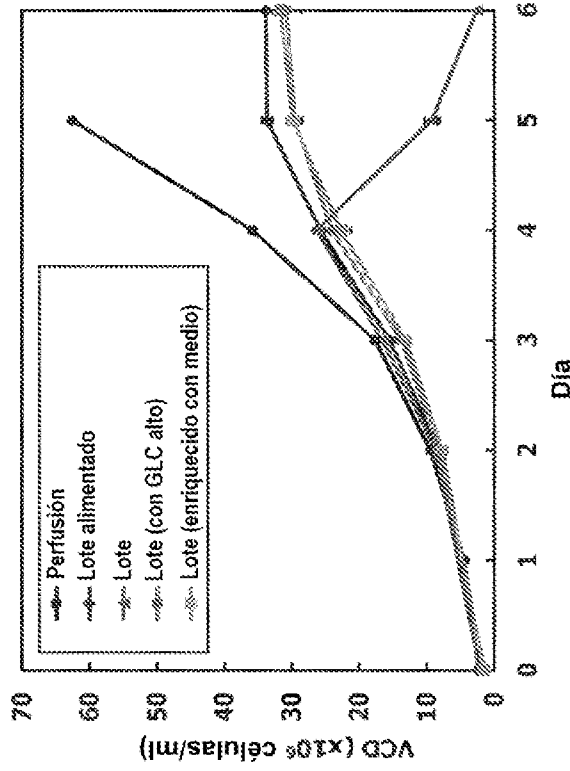


FIGURA 5A

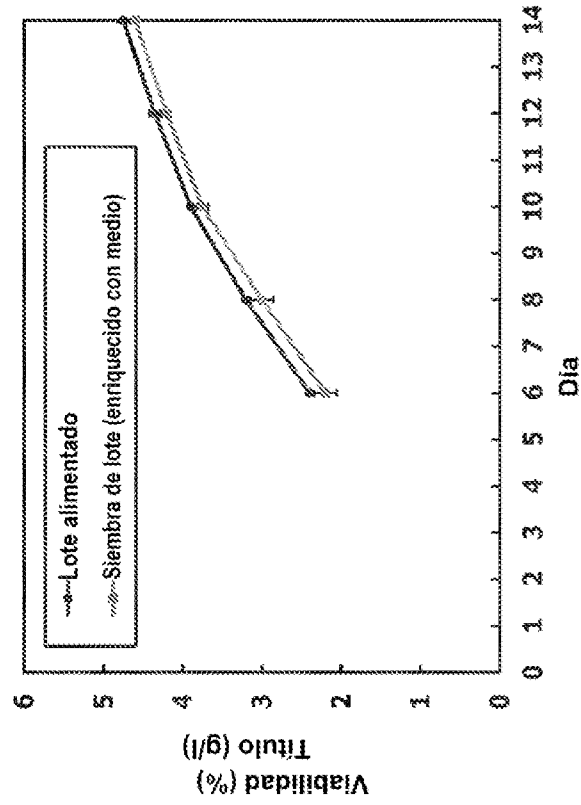


FIGURA 6B

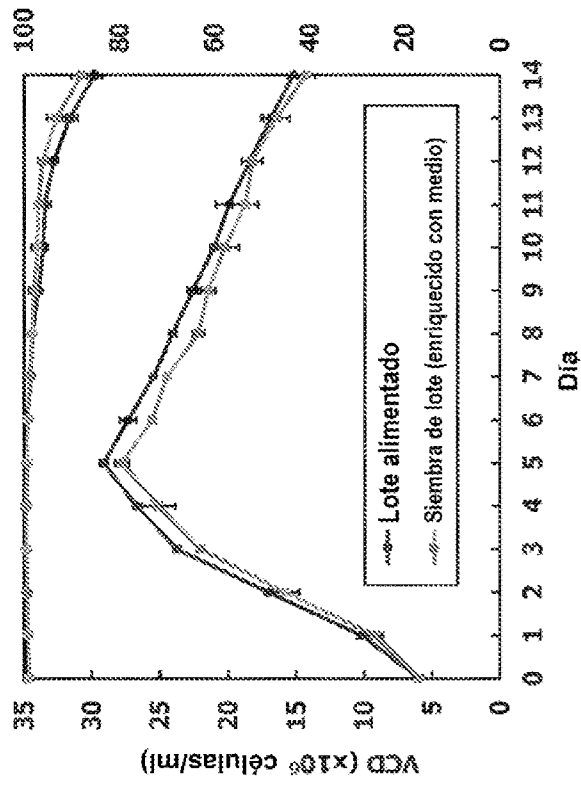


FIGURA 6A

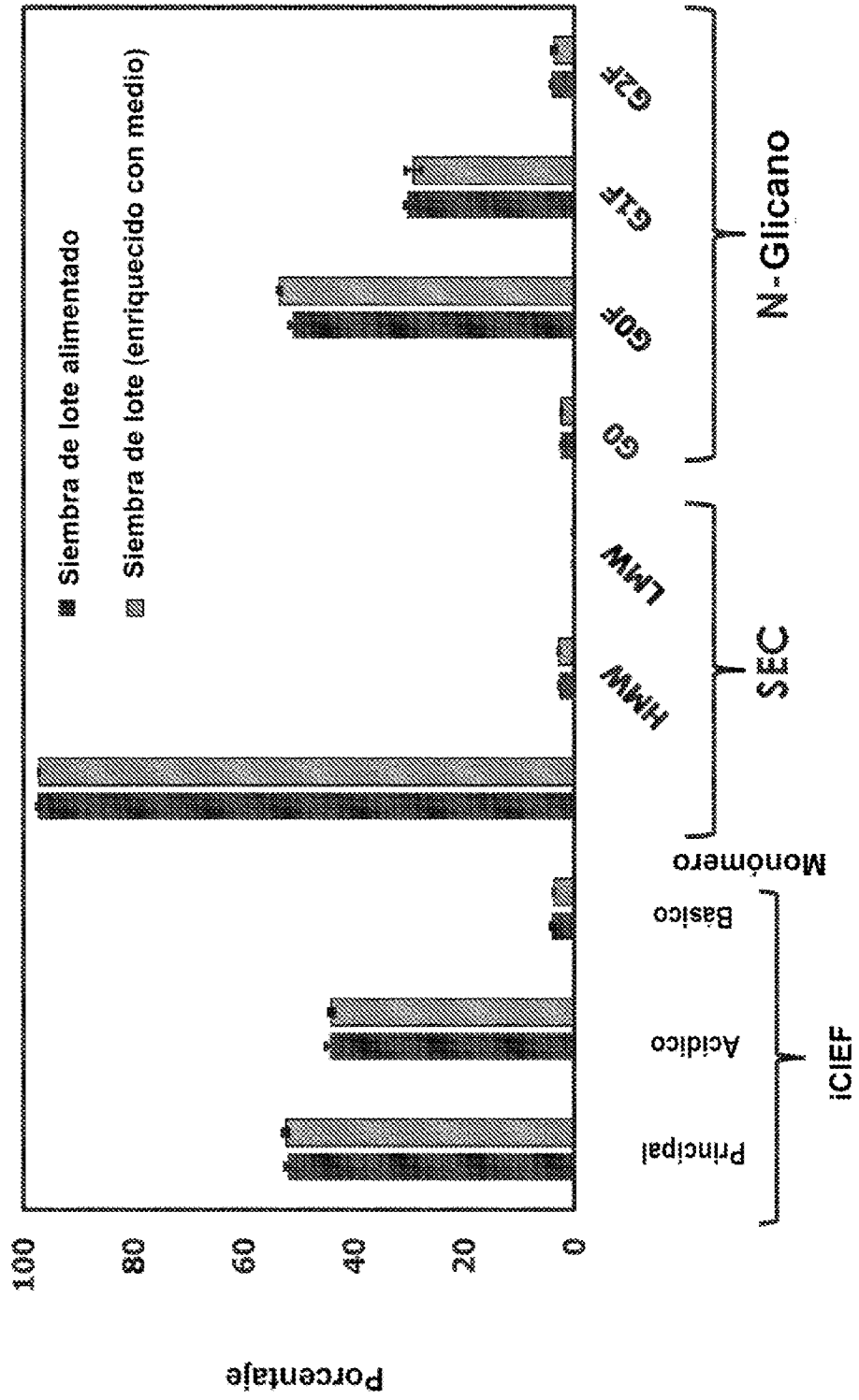


FIGURA 6C

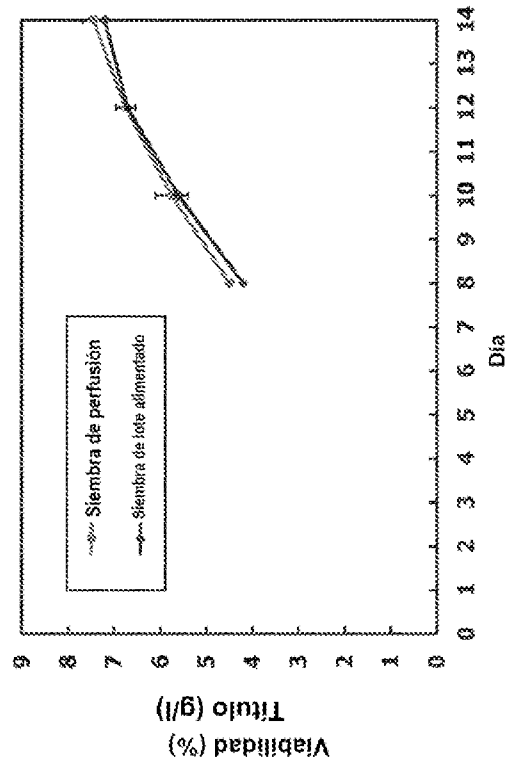


FIGURA 7B

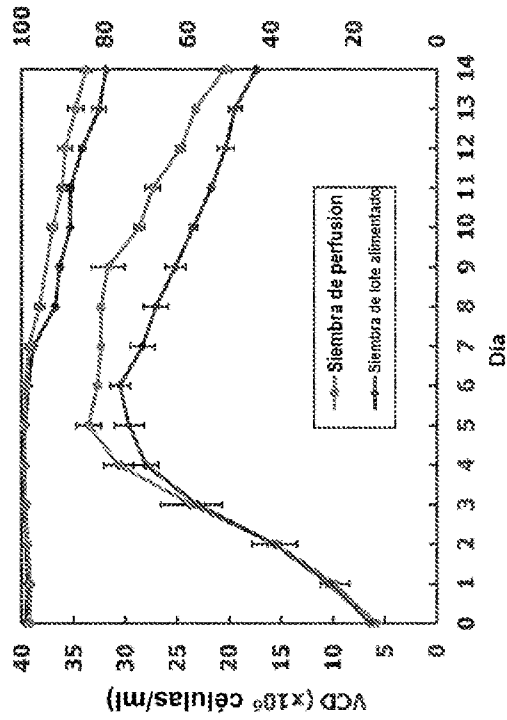


FIGURA 7A

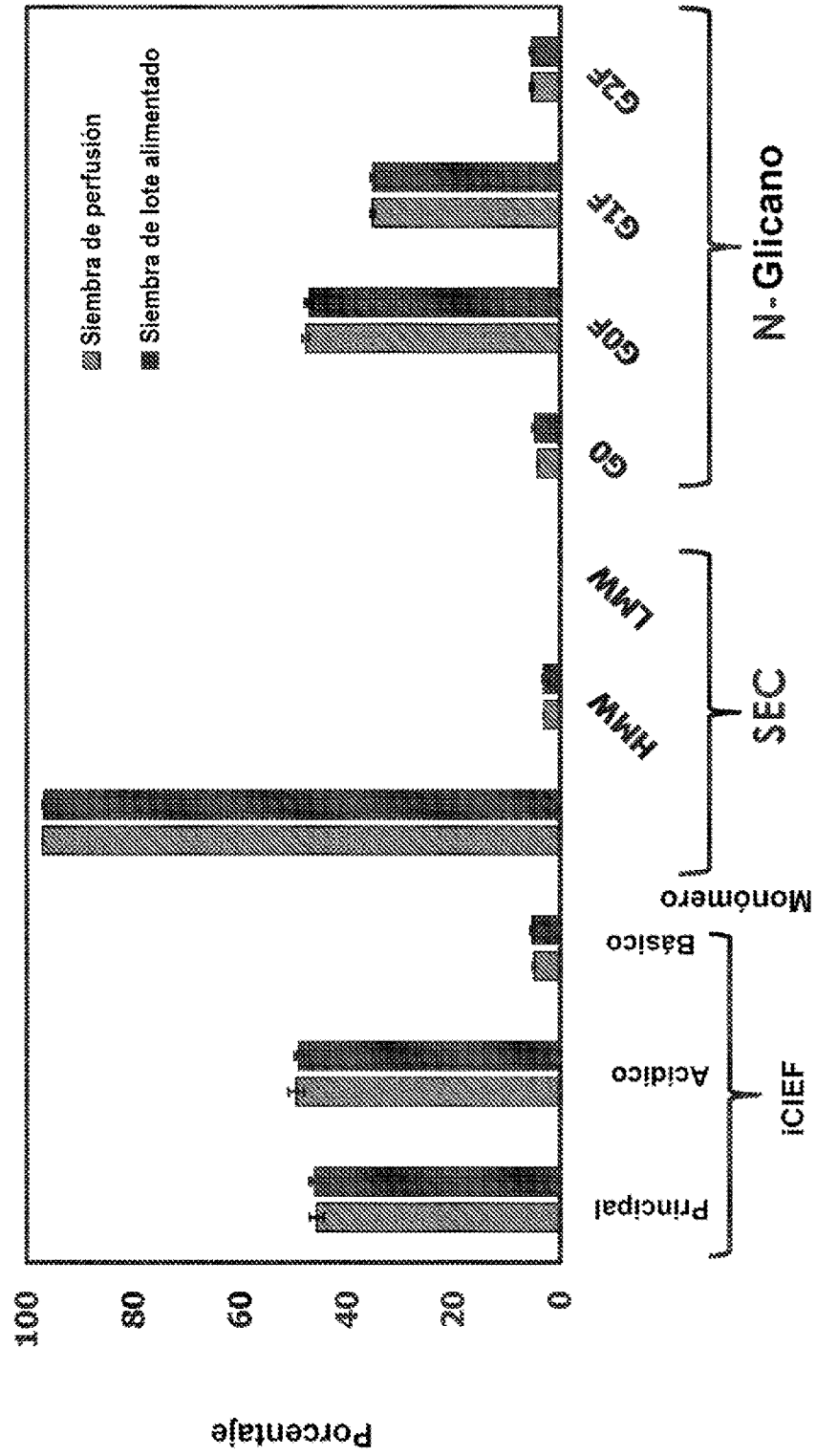


FIGURA 7C

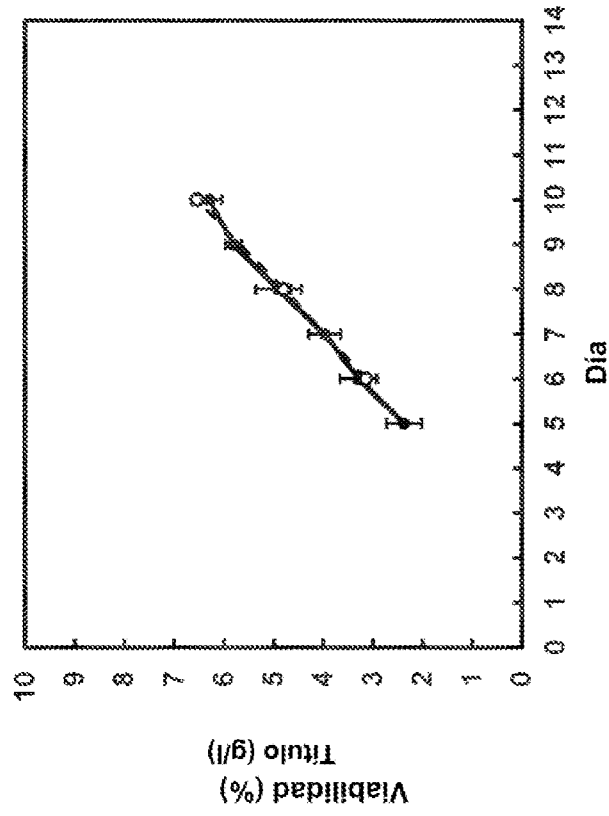


FIGURA 8B

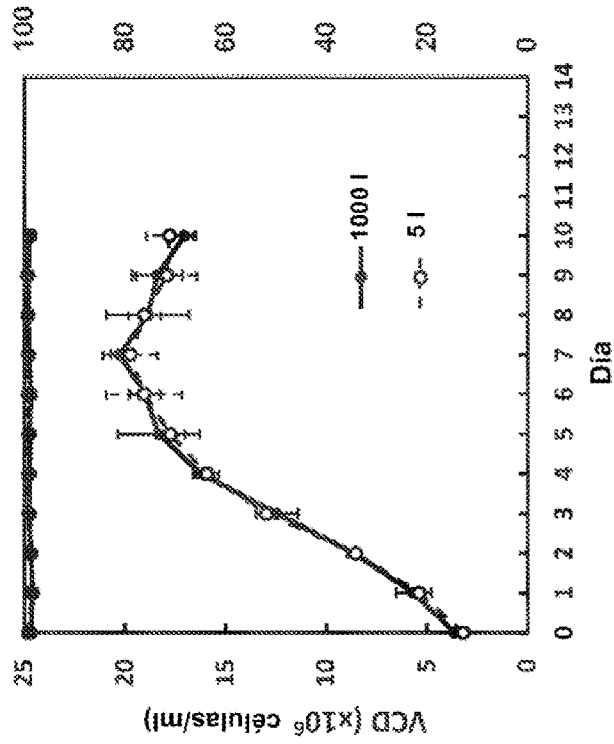


FIGURA 8A

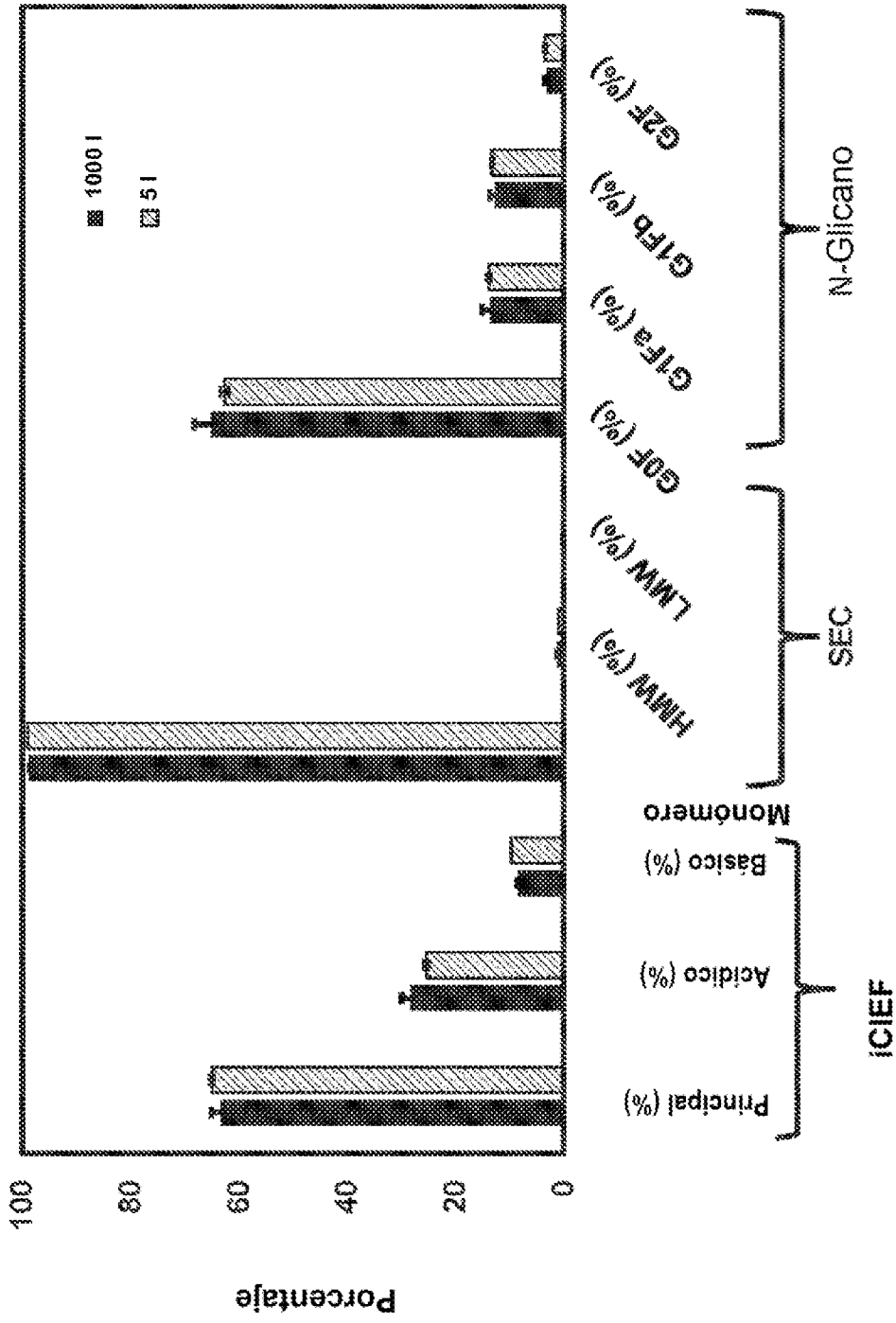


FIGURA 8C

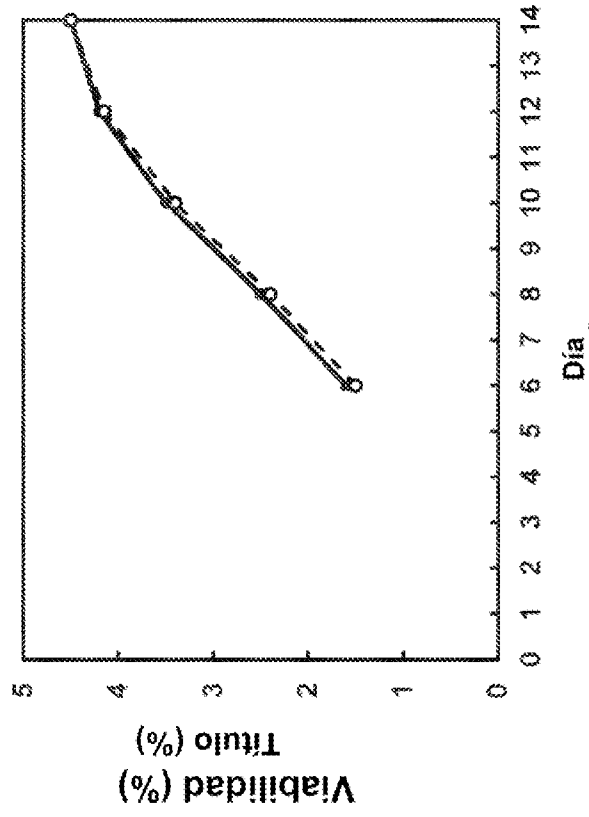


FIGURA 9B

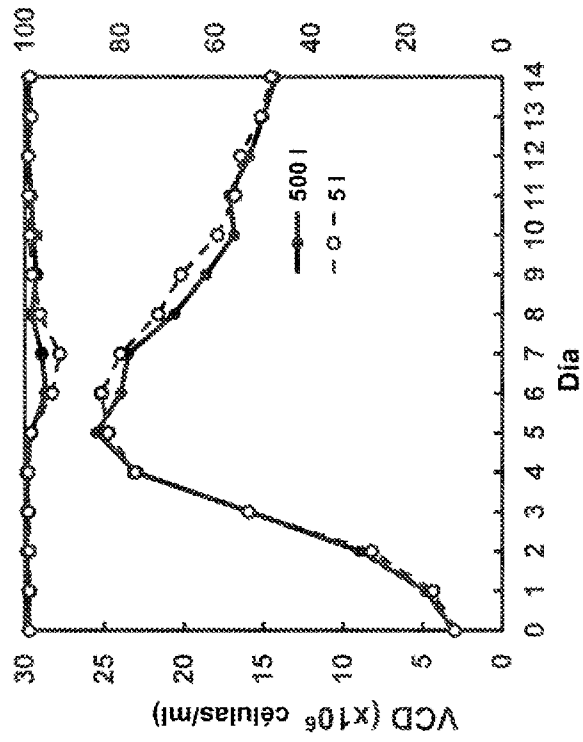


FIGURA 9A

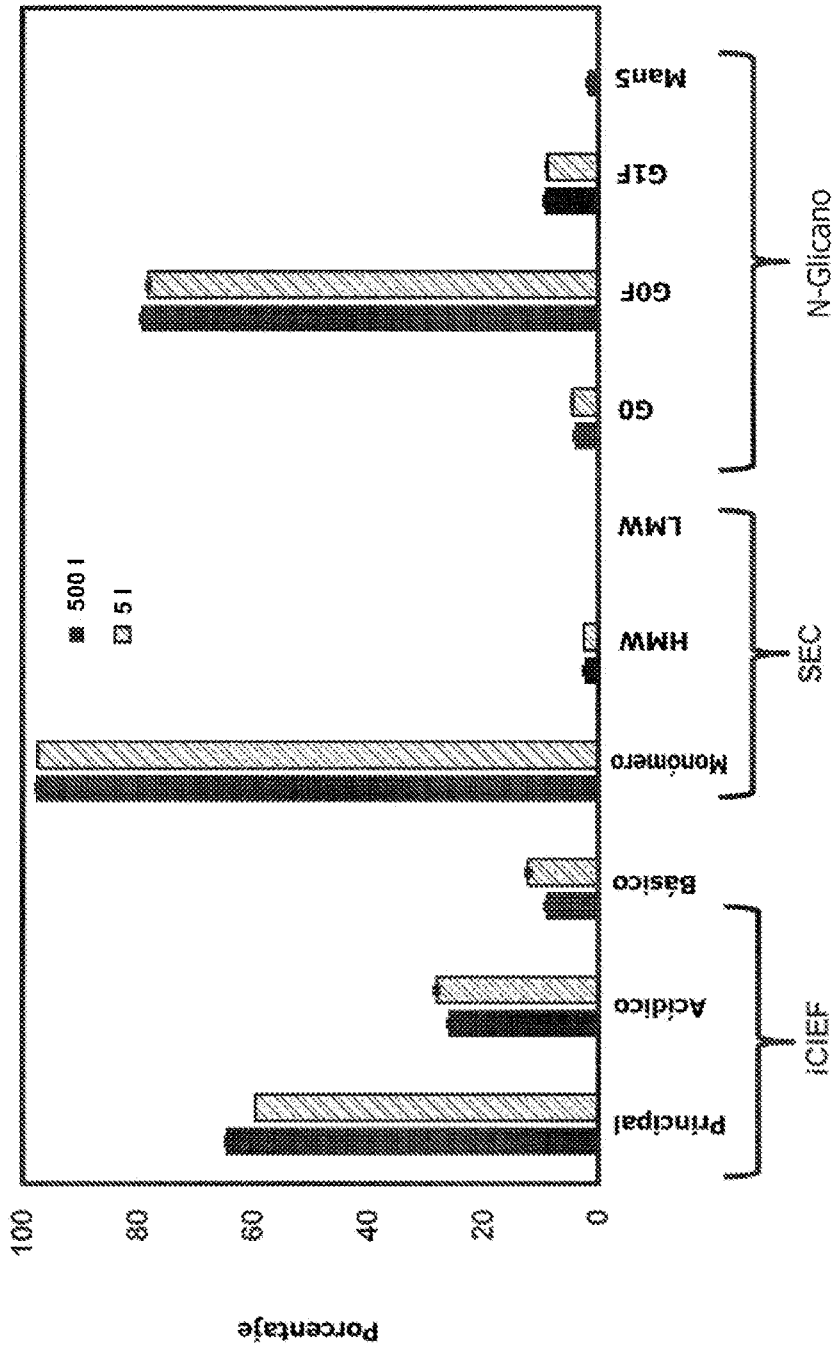


FIGURA 9C

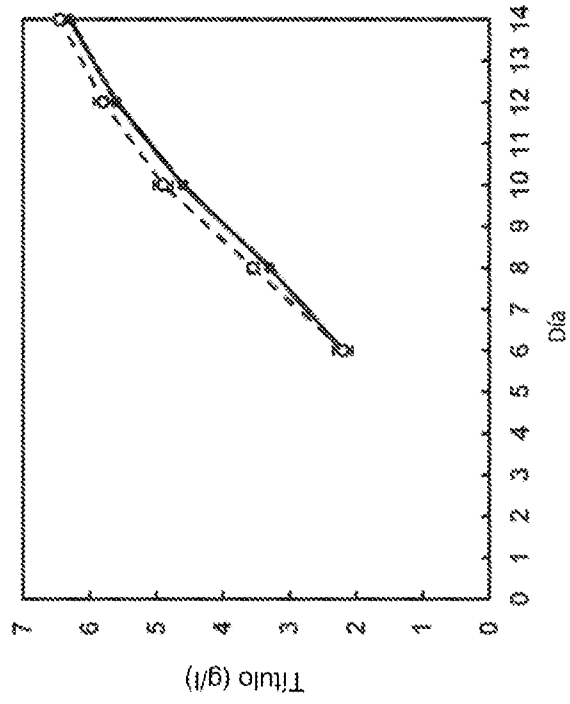


FIGURA 10B

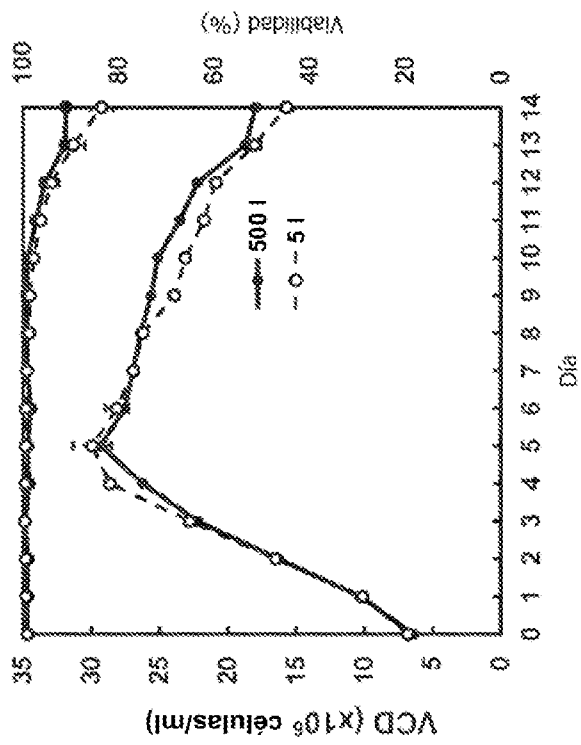


FIGURA 10A

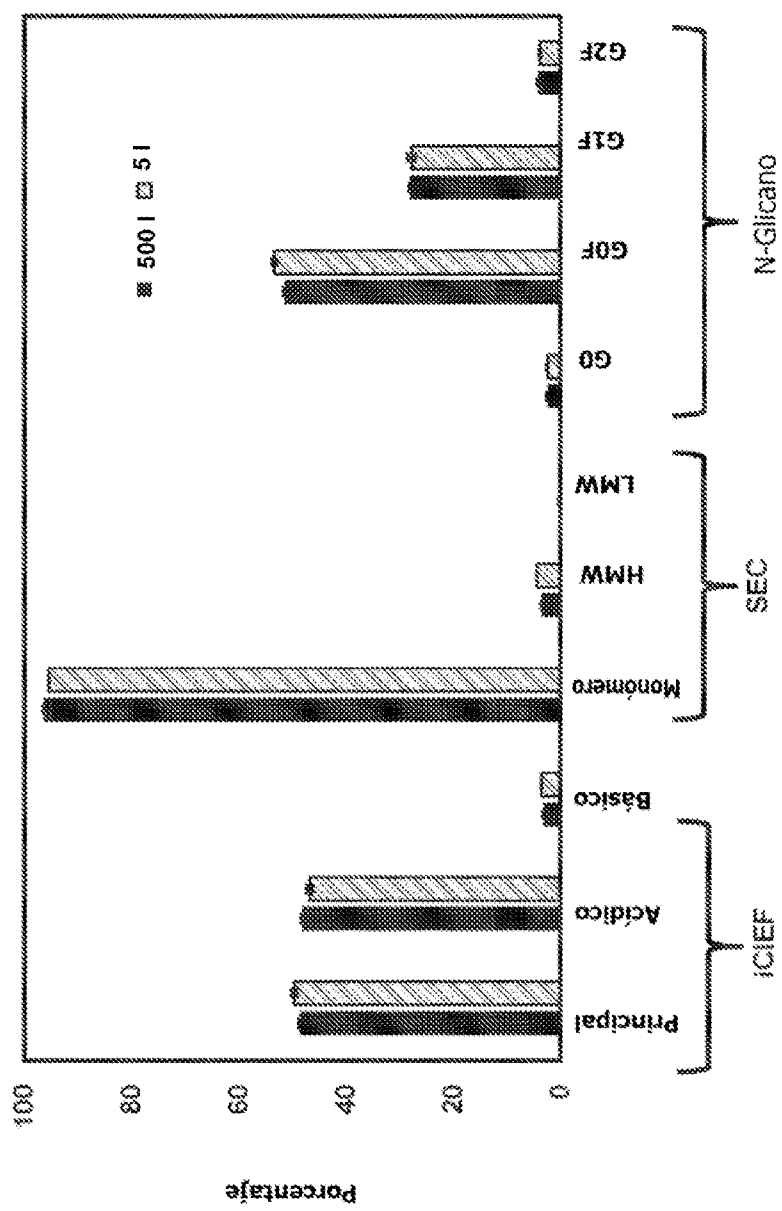


FIGURA 10C