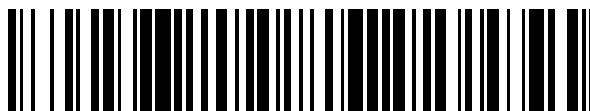


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 045**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/US2012/045070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006479**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12738674 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2726600**

54 Título: **Cultivo de células de mamífero**

30 Prioridad:

01.07.2011 US 201161503737 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2017

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA93120-1789, US**

72 Inventor/es:

**FOLLSTAD, BRIAN, D.;
MCCOY, REBECCA, E. y
MORRIS, ARVIA, E.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 625 045 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

Cultivo de células de mamífero

Campo de invención

5 La invención proporciona un método para cultivar células de mamífero que expresan una proteína recombinante. El método proporciona un mayor control sobre el crecimiento celular para conseguir cultivos celulares de alto título de producto.

Antecedentes de invención

10 A medida que aumenta la demanda de cantidades cada vez mayores de proteínas recombinantes terapéuticas, se buscan aumentos positivos en el crecimiento celular, la viabilidad y la producción de proteínas implementando nuevos métodos para mejorar el desarrollo celular, la optimización de los medios y los parámetros de control del procedimiento. Ahora se está poniendo mucho empeño en la optimización del procedimiento, particularmente en los métodos y estrategias para hacer crecer, alimentar y mantener cultivos celulares de producción.

15 Nuevos métodos de cultivo celular que incluso proporcionan mejoras graduales en la producción de proteínas recombinantes son valiosos, dados los gastos de los procedimientos de cultivo celular a gran escala y la creciente demanda de mayores cantidades y menores costes de productos biológicos.

20 Se necesitan mejoras de los procedimientos de cultivo celular, expresión de polipéptidos recombinantes, título y viabilidad celular que puedan conducir a niveles de producción más altos, reduciendo de ese modo los costes asociados con la fabricación de productos terapéuticos de proteína. La invención cumple estas necesidades proporcionando un método simple, fácil y económico de control del crecimiento celular al tiempo que se aumenta la producción de proteínas.

Sumario de la invención

25 La presente invención proporciona un método de cultivo de células de mamífero que expresan una proteína recombinante que comprende; establecer un cultivo de células de mamífero en un medio de cultivo libre de suero en un biorreactor inoculando el biorreactor con al menos de $0,5 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ células/ml en un medio de cultivo libre de suero; hacer crecer las células de mamífero durante una fase de crecimiento y complementar el medio de cultivo con alimentaciones por bolo de un medio de alimentación libre de suero, comenzar la perfusión del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 9 del cultivo celular, y mantener las células de mamífero durante una fase de producción mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero, en el que el volumen celular empaquetado durante la fase de producción es de menos del o igual al 35%.

30 En una realización relacionada la perfusión empieza del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 7 del cultivo celular. En una realización la perfusión empieza cuando las células han alcanzado una fase de producción. En otra realización el método comprende además inducir la detención del crecimiento celular mediante privación de L-asparagina seguido por perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos. En todavía otra realización el método comprende además inducir la detención del crecimiento celular mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos.

40 En una realización de la invención la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es de menos de o igual a 5 mM. En otra realización la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es de menos de o igual a 4,0 mM. En otra realización la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es de menos de o igual a 3,0 mM. En todavía otra realización la concentración de L-asparagina en medio de perfusión libre de suero es de menos de o igual a 2,0 mM. En todavía otra realización la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es de menos de o igual a 1,0 mM. En todavía otra realización la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es de 0 mM. En otra realización la perfusión se realiza a una velocidad que aumenta durante la fase de producción desde 0,25 volúmenes de trabajo al día hasta 1,0 volumen de trabajo al día durante el cultivo celular. En una realización relacionada la perfusión se realiza a una velocidad que alcanza 1,0 volumen de trabajo al día del día 9 al día 11 del cultivo celular. En otra realización relacionada la perfusión se realiza a una velocidad que alcanza 1,0 volumen de trabajo al día el día 10 del cultivo celular. En todavía otra realización las alimentaciones por bolo de medio de alimentación libre de suero empiezan el día 3 o el día 4 del cultivo celular. En otra realización de la invención el método comprende además un desplazamiento de temperatura de desde 36°C hasta 31°C. En otra realización el método comprende además un desplazamiento de temperatura de desde 36°C hasta 33°C. En una realización relacionada el desplazamiento de temperatura se produce en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización relacionada el desplazamiento de temperatura se produce durante la fase de producción.

55 En una realización de la invención la concentración de L-asparagina del medio de cultivo celular se monitoriza antes de y durante la privación de L-asparagina.

En una realización de la invención el volumen celular empaquetado es de menos del o igual al 30%.

En una realización de la invención la densidad de células viables del cultivo de células de mamífero en un volumen celular empaquetado de menos del o igual al 35% es de 10×10^6 células viables/ml a 80×10^6 células viables/ml. En una realización relacionada la densidad de células viables del cultivo de células de mamífero es de 20×10^6 células viables/ml a 30×10^6 células viables/ml.

En una realización de la invención la perfusión comprende perfusión continua.

En una realización de la invención la velocidad de perfusión es constante.

En una realización de la invención la perfusión se realiza a una velocidad de menos de o igual a 1,0 volumen de trabajo al día.

En una realización el cultivo de células de mamífero se establece inoculando el biorreactor con al menos de $0,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ células/ml en un medio de cultivo libre de suero.

En otra realización de la invención la perfusión se realiza mediante flujo tangencial alterno.

En otra realización de la invención el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos de 500 l a 2000 l. En aún otra realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos de 1000 l a 2000 l.

En otra realización de la invención las células de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO).

En otra realización de la invención la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citocina.

En otra realización de la invención cualquiera de los métodos anteriores comprende además una etapa de recogida de la proteína recombinante producida por el cultivo celular.

En otra realización de la invención la proteína recombinante producida por el cultivo celular se purifica y se formula para dar una formulación farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: inicio por lotes y alimentado: cuadrado negro (■) y círculo negro (●), inicio por lotes: cuadrado blanco (□) y círculo blanco (○).

Figura 1A: densidad de células viables, figura 1B: viabilidad, figura 1C: título

Figura 2: inicio por lotes: círculo blanco (○), inicio por lotes y alimentado con alta agitación: cuadrado blanco (□)

Figura 2A: densidad de células viables, figura 2B: viabilidad, figura 2C: título, figura 2D: concentración de asparagina

Figura 3: 1,0 volumen de perfusión de inicio, sin desplazamiento de temperatura: círculo negro. 1,0 volumen de perfusión de inicio, desplazamiento de temperatura: círculo blanco (○). 0,75 volúmenes de perfusión de inicio, sin desplazamiento de temperatura: cuadrado negro (■). 0,75 volúmenes de perfusión de inicio, desplazamiento de temperatura: cuadrado blanco (□).

Figura 3A: densidad de células viables, figura 3B: viabilidad, figura 3C: título

Figura 4: inicio por lotes con baja cantidad de asparagina: triángulo blanco (Δ). Inicio por lotes con cantidad de L-asparagina de control: triángulo negro (▲). Inicio por lotes y alimentado con baja cantidad de L-asparagina: rombo blanco (◇). Inicio por lotes y alimentado con cantidad de L-asparagina de control: rombo negro (◆). Burbujear con tubo perforado: línea negra. Burbujear con burbujeador sinterizado: línea discontinua.

Figura 4A: densidad de células viables, figura 4B: viabilidad, figura 4C: título ajustado para PCV

Figura 5: cultivos hechos crecer en medio que contiene L-asparagina 17,3 mM o 5 mM y L-glutamina 4,6 mM o 10 mM. L-asparagina 17,3 mM y L-glutamina 4,6 mM, rombo negro (◆) o L-asparagina 5 mM, L-glutamina 10 mM, rombo blanco (◇).

Figura 5A: densidad de células viables. Figura 5B: título. Figura 5C: volumen celular empaquetado (PCV). Figura 5D: título ajustado para PCV. Figura 5E: viabilidad.

Figura 6: cultivos a escala de laboratorio de 2 l y a escala piloto de 500 l, con L-asparagina 5 mM, L-glutamina 10 mM. El medio que contiene L-asparagina 5 mM, L-glutamina 10 mM a escala de laboratorio de 2 l se representa mediante el rombo negro (◆) y el de a escala piloto de 500 l se representa mediante el rombo blanco (◇)

Figura 6A: densidad de células viables. Figura 6B: título. Figura 6C: volumen celular empaquetado (PCV). Figura 6D: título ajustado para PCV. Figura 6E: viabilidad.

Descripción detallada de la invención

- 5 Durante la producción de proteínas recombinantes es deseable tener un sistema controlado en el que las células se hacen crecer hasta una densidad deseada y entonces se cambia el estado fisiológico de las células a crecimiento detenido, estado de alta productividad en el que las células usan energía y sustratos para producir la proteína recombinante de interés en lugar de producir más células. Los métodos para realizar este objetivo, tales como desplazamientos de temperatura e inductores de moléculas pequeñas, no siempre son satisfactorios y pueden tener efectos no deseados sobre la calidad del producto. Tal como se describe en el presente documento, el volumen celular empaquetado puede limitarse a un nivel deseado durante la fase de producción induciendo la detención del crecimiento celular en las células cultivadas mediante la exposición a condiciones de bajo contenido en L-asparagina. La detención de crecimiento celular puede conseguirse y mantenerse usando un medio de cultivo de perfusión que contiene una concentración limitante de L-asparagina y manteniendo una baja concentración de L-asparagina en el cultivo celular (5 mM o menos).
- 10 También se ha encontrado que las células en crecimiento detenido mostraron una productividad aumentada cuando se inició la detención de crecimiento mediante bajo contenido en L-asparagina o a través de privación de L-asparagina y las células en crecimiento detenido se mantuvieron posteriormente con el cultivo celular y el medio de perfusión que tenía una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos.
- 20 Puede conseguirse una fase de producción de alta productividad, con crecimiento detenido, manipulando la concentración de L-asparagina. Tal como se describe en el presente documento, la reducción de L-asparagina dio como resultado la detención del crecimiento. En un cultivo por lotes y alimentado, una vez que la densidad de células era suficientemente alta (por ejemplo $\geq 20 \times 10^6$ células viables/ml), se privó repetidamente al cultivo de L-asparagina a pesar de las alimentaciones repetidas debido al consumo de L-asparagina y/o a la conversión en L-aspartato. En un cultivo celular, la L-asparagina extracelular puede convertirse en L-aspartato y amoníaco. La reducción de L-asparagina dio como resultado detención del ciclo celular. Durante la alimentación por lotes, los periodos en los que la L-asparagina está presente en el cultivo dan como resultado productividad aumentada y los periodos en los que la L-asparagina se ha reducido dan como resultado productividad disminuida. En el sistema con perfusión, se suministra L-asparagina de manera constante, por tanto se evita la reducción total, y pueden mantenerse concentraciones más altas de L-asparagina, permitiendo por tanto que las células continúen multiplicándose y que no se expongan a un entorno con L-asparagina reducida o limitada. Controlar la concentración de L-asparagina a una concentración suficientemente baja (tal como concentraciones de 5 mM o menos) puede mantener las células en un estado de alta productividad mientras se mantiene la viabilidad y se limita el crecimiento. En un sistema que tiene alimentación por bolo y perfusión, el medio de alimentación puede cambiarse de una formulación que contiene un alto nivel (que promueve el crecimiento) de L-asparagina durante alimentaciones por bolo a un nivel más bajo (que detiene el crecimiento) de L-asparagina durante alimentación por perfusión. Los cultivos celulares a los que se les ha detenido el crecimiento limitando L-asparagina pueden estimularse para pasar a un estado de alta productividad volviendo a añadir niveles bajos de L-asparagina.
- 25 Para un cultivo celular a escala comercial y la fabricación de productos terapéuticos biológicos, sería muy deseable la capacidad de detener el crecimiento celular y poder mantener las células en un estado de crecimiento detenido durante la fase de producción. Tener células que también estuvieran inducidas para aumentar la productividad mientras están en el estado de crecimiento detenido y poder mantener esta productividad aumentada es ideal para fines de fabricación.
- 30 La invención proporciona un método de cultivo de células de mamífero que expresan una proteína recombinante que comprende;
- 35 establecer un cultivo de células de mamífero en un medio de cultivo libre de suero en un biorreactor inoculando el biorreactor con al menos de $0,5 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ células/ml en un medio de cultivo libre de suero;
- hacer crecer las células de mamífero durante una fase de crecimiento y complementar el medio de cultivo con alimentaciones por bolo de un medio de alimentación libre de suero
- comenzar la perfusión del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 9 del cultivo celular, y
- 40 mantener las células de mamífero durante una fase de producción mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero, en el que el volumen celular empaquetado durante la fase de producción es de menos del o igual al 35%.
- Los métodos descritos en el presente documento proporcionan un mayor control sobre el crecimiento celular a cultivos celulares de alto título de producto; y como tales pueden simplificar la estrategia de gasificación en comparación con procedimientos de alta perfusión de biomasa y minimizar la pérdida de producto durante la recogida y el procesamiento aguas abajo.
- 45
- 50
- 55

El método empieza con el establecimiento de un cultivo de células de mamífero en un biorreactor de producción. Preferiblemente se usan biorreactores de producción más pequeños, en una realización los biorreactores son de 500 l a 2000 l. En una realización preferida, se usan biorreactores de 1000 l - 2000 l. La densidad de células de siembra usada para inocular el biorreactor puede tener un impacto positivo sobre el nivel de proteína recombinante producida. El biorreactor se inocula con al menos desde $0,5 \times 10^6$ hasta $3,0 \times 10^6$ células viables/ml en un medio de cultivo libre de suero. En una realización preferida la inoculación es de $1,0 \times 10^6$ células viables/ml.

Las células de mamífero se someten entonces a una fase de crecimiento exponencial. El cultivo celular puede mantenerse sin alimentación complementaria hasta que se consigue una densidad de células deseada. En una realización se mantiene el cultivo celular durante hasta 3 días sin alimentación complementaria seguido por perfusión con un medio de perfusión libre de suero, que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos, para inducir y mantener la detención de crecimiento por bajo contenido en L-asparagina. En otra realización el cultivo puede inocularse a una densidad de células deseada para empezar la fase de producción sin una fase de crecimiento breve con detención de crecimiento celular iniciada inmediatamente tras la inoculación sometiendo a perfusión el cultivo celular con un medio de perfusión libre de suero que contenía L-asparagina 5 mM o menos para inducir y mantener la detención de crecimiento por bajo contenido en L-asparagina. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento el cambio de la fase de crecimiento a la fase de producción también puede iniciarse mediante privación de L-asparagina (sometiendo las células a un entorno de L-asparagina 0 mM) seguido por perfusión con un medio de cultivo celular que tiene una concentración de L-asparagina igual a o de menos de 5 mM y manteniendo la concentración de L-asparagina en el cultivo celular a ese nivel.

Sin tener en cuenta cómo se induce la detención de crecimiento por bajo contenido en L-asparagina, se observa productividad más alta en las células en crecimiento detenido que se mantienen sometiendo a perfusión con un medio de bajo contenido en L-asparagina y manteniendo el cultivo celular a un nivel de L-asparagina de 5 mM o menos.

Tal como se usa en el presente documento, “detención de crecimiento”, que también puede denominarse “detención de crecimiento celular”, es el punto en el que las células dejan de aumentar en número o cuando el ciclo celular ya no avanza. La detención de crecimiento puede monitorizarse determinando la densidad de células viables de un cultivo celular. Algunas células en un estado de crecimiento detenido pueden aumentar de tamaño pero no en número, de manera que puede aumentar el volumen celular empaquetado de un cultivo de crecimiento detenido. La detención de crecimiento puede invertirse en cierta medida, si las células no tienen salud en declive, añadiendo L-asparagina adicional al cultivo celular.

La detención de crecimiento se inicia mediante L-asparagina cuando la densidad de células del cultivo alcanza un nivel en el que la concentración de L-asparagina en el cultivo llega a ser limitativa para el crecimiento continuado o cuando el cultivo se priva de L-asparagina. La privación de L-asparagina se produce cuando la concentración de L-asparagina en un medio de cultivo celular está efectivamente a 0 mM. La privación puede dar como resultado la detención de crecimiento en el plazo de 24 horas. La privación durante más de 48 horas puede dañar la salud de las células. Para mantener células en el estado de crecimiento detenido, la concentración de L-asparagina en el cultivo celular debe mantenerse a 5 mM o menos. La concentración del medio de cultivo celular de L-asparagina requerida para detener el crecimiento celular depende de la capacidad de las células para fabricar su propia asparagina. Para cultivos en los que las células pueden fabricar su propia asparagina, puede requerirse una concentración menor, o incluso una eliminación de L-asparagina del medio para la detención de crecimiento. Para cultivos que no pueden fabricar su propia asparagina, por ejemplo, células que carecen de enzima asparagina sintetasa activa, pueden usarse concentraciones superiores a cero hasta 5 mM de L-asparagina para detener el crecimiento.

Tal como se usa en el presente documento, “volumen celular empaquetado” (PCV), también denominado “porcentaje de volumen celular empaquetado” (% de PCV), es la razón del volumen ocupado por las células, con respecto al volumen total de cultivo celular, expresada como porcentaje (véase Stettler, *et al.*, (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dec 20:95(6): 1228-33). El volumen celular empaquetado es una función de la densidad de células y el diámetro de las células; aumentos en el volumen celular empaquetado pueden surgir de aumentos en o bien la densidad de células o bien el diámetro de las células o ambos. El volumen celular empaquetado es una medida del contenido en sólidos en el cultivo celular. Los sólidos se eliminan durante la recogida y purificación aguas abajo. Más sólidos significan un mayor esfuerzo para separar el material sólido del producto deseado durante las etapas de recogida y purificación aguas abajo. Además, el producto deseado puede llegar a quedar atrapado en los sólidos y perderse durante el procedimiento de recogida, dando como resultado un rendimiento de producto disminuido. Puesto que las células huésped varían de tamaño y los cultivos celulares también contienen células muertas y agonizantes y otros residuos celulares, el volumen celular empaquetado es una manera más precisa de describir el contenido en sólidos de un cultivo celular que la densidad de células o la densidad de células viables. Por ejemplo, un cultivo de 2000 l que tiene una densidad de células de 50×10^6 células/ml tendrá volúmenes celulares empaquetados considerablemente diferentes dependiendo del tamaño de células. Además, algunas células, cuando estén en un estado de crecimiento detenido, aumentarán de tamaño, de manera que el volumen celular empaquetado antes de la detención de crecimiento y tras la detención de crecimiento será probablemente diferente, debido al aumento de biomasa como resultado del aumento del tamaño de célula.

En la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción, y durante la fase de producción, el porcentaje

de volumen celular empaquetado (% de PCV) es igual al o de menos del 35%. El volumen celular empaquetado deseado mantenido durante la fase de producción es igual al o de menos del 35%. En una realización preferida el volumen celular empaquetado es igual al o de menos del 30%. En otra realización preferida el volumen celular empaquetado es igual al o de menos del 20%. En otra realización preferida el volumen celular empaquetado es igual al o de menos del 15%. En todavía otra realización preferida el volumen celular empaquetado es igual al o de menos del 10%.

Tal como se usa en el presente documento, "densidad de células" se refiere al número de células en un volumen dado de medio de cultivo. "Densidad de células viables" se refiere al número de células vivas en un volumen dado de medio de cultivo, tal como se determina mediante ensayos de viabilidad convencionales (tales como método de exclusión por tinción con azul de tripano).

La densidad de células viables deseada en la transición entre las fases de crecimiento y producción y mantenida durante la fase de producción es la que proporciona un volumen celular empaquetado igual al o de menos del 35%. En una realización, la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 80×10^6 células viables/ml. En una realización la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 70×10^6 células viables/ml. En una realización la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 60×10^6 células viables/ml. En una realización la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 50×10^6 células viables/ml. En una realización la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 40×10^6 células viables/ml. En una realización preferida la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 30×10^6 células viables/ml. En otra realización preferida la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 10×10^6 células viables/ml a 20×10^6 células viables/ml. En otra realización preferida, la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 20×10^6 células viables/ml a 30×10^6 células viables/ml. En otra realización preferida la densidad de células viables es de al menos aproximadamente 20×10^6 células viables/ml a al menos aproximadamente 25×10^6 células viables/ml, más preferiblemente al menos de aproximadamente 20×10^6 células viables/ml.

Un volumen celular empaquetado más bajo durante la fase de producción ayuda a mitigar los problemas de burbujeo de oxígeno disuelto que pueden impedir cultivos de perfusión de densidad de células más alta. El volumen celular empaquetado más bajo también permite un volumen de los medios más pequeño lo que permite el uso de recipientes de almacenamiento de los medios más pequeños y puede combinarse con velocidades de flujo más lentas. Un volumen celular empaquetado más bajo también tiene menos impacto sobre la recogida y el procesamiento aguas abajo, en comparación con cultivos de biomasa de células más altos. Todo ello reduce los costes asociados con la fabricación de productos terapéuticos de proteína recombinante.

Normalmente se usan tres métodos en procedimientos comerciales para la producción de proteínas recombinantes mediante cultivo de células de mamífero: cultivo por lotes, cultivo por lotes y alimentado y cultivo por perfusión. Cultivo por lotes, método discontinuo en el que las células se hacen crecer en un volumen fijo de medios de cultivo durante un breve periodo de tiempo seguido por una recogida completa. Los cultivos hechos crecer usando el método por lotes experimentan un aumento de la densidad de células hasta que se alcanza una densidad de células máxima, seguido por una disminución de la densidad de células viables a medida que se consumen los componentes de los medios y se acumulan los niveles de subproductos metabólicos (tales como lactato y amoniaco). Normalmente la recogida se produce en el punto en el que se consigue la densidad de células máxima (normalmente de 5×10^6 a 10×10^6 células/ml, dependiendo de la formulación de los medios, línea celular, etc.). El procedimiento por lotes es el método de cultivo más simple, sin embargo la densidad de células viables está limitada por la disponibilidad de nutrientes y una vez que las células están a la máxima densidad, el cultivo disminuye y la producción disminuye. No hay capacidad de ampliar la fase de producción debido a la acumulación de productos residuales y reducción de nutrientes conducen rápidamente a la disminución del cultivo (normalmente alrededor de 3 a 7 días).

El cultivo por lotes y alimentado mejora el procedimiento por lotes proporcionando alimentaciones por medios continuos o por bolo para reponer los componentes de los medios que se han consumido. Puesto que los cultivos por lotes y alimentados reciben nutrientes adicionales durante todo el desarrollo, tienen posibilidad de conseguir densidades de células más altas (de >10 a 30×10^6 células/ml, dependiendo de la formulación de los medios, línea celular, etc.) y títulos aumentados de producto, en comparación con el método por lotes. A diferencia del procedimiento por lotes, puede crearse y mantenerse un cultivo bifásico manipulando las estrategias de alimentación y las formulaciones de medios para distinguir el periodo de proliferación celular para conseguir una densidad de células deseada (la fase de crecimiento) del periodo de crecimiento celular lento o suspendido (fase de producción). Como tales, los cultivos por lotes y alimentados tienen posibilidad de conseguir títulos más altos de producto en comparación con cultivos por lotes. Normalmente se usa un método por lotes durante la fase de crecimiento y se usa un método por lotes y alimentado durante la fase de producción, sin embargo una estrategia de alimentación alimentada por lotes puede usarse en todo el proceso completo. Sin embargo, a diferencia del procedimiento por lotes, el volumen del reactor es un factor limitante que limita la cantidad de alimentación. Además, como con el método por lotes, la acumulación de subproductos metabólicos conducirá a la disminución de cultivo, lo cual limita la duración de la fase de producción, aproximadamente de 1,5 a 3 semanas. Los cultivos por lotes y alimentados son discontinuos y normalmente la recogida se produce cuando los niveles de subproductos metabólicos o la viabilidad

del cultivo alcanzan niveles predeterminados.

Los métodos de perfusión ofrecen una posible mejora con respecto a los métodos por lotes y por lotes y alimentados añadiendo medios nuevos y eliminando simultáneamente medios gastados. Las estrategias de cultivo celular comercial a gran escala típicas luchan por alcanzar densidades de células altas, 60 - 90(+) $\times 10^6$ células/ml en las que casi de un tercio a más de la mitad del volumen del reactor es biomasa. Con cultivo por perfusión, se han conseguido densidades de células extremas de $>1 \times 10^8$ células/ml e incluso se prevén densidades más altas. Los cultivos de perfusión típicos empiezan con un arranque de cultivo por lotes que dura un día o dos seguido por adición continua, gradual y/o intermitente, de medios de alimentación nuevos al cultivo y eliminación simultánea de medios gastados con la retención de células y compuestos de alto peso molecular adicionales tales como proteínas (basándose en el punto de corte del peso molecular del filtro) durante todas las fases de crecimiento y producción del cultivo. Pueden usarse diversos métodos, tales como sedimentación, centrifugación o filtración, para eliminar los medios gastados, mientras se mantiene la densidad de células. Se han notificado velocidades de flujo de perfusión de desde una fracción de un volumen de trabajo al día hasta muchos volúmenes de trabajo múltiples al día. Una ventaja del procedimiento de perfusión es que el cultivo de producción puede mantenerse durante periodos más prolongados que los métodos de cultivo por lotes o por lotes y alimentado. Sin embargo, se necesitan preparación, uso, almacenamiento y evacuación de medios aumentados para mantener un cultivo por perfusión a largo plazo, particularmente aquellos con densidades de células altas, que también necesitan incluso más nutrientes, y todo esto aumenta incluso más los costes de producción, en comparación con los métodos por lotes y por lotes y alimentados. Además, densidades de células más altas pueden provocar problemas durante la producción, tales como el mantenimiento de niveles de oxígeno disuelto y problemas con la gasificación aumentada incluyendo suministro de más oxígeno y eliminación de más dióxido de carbono, lo que dará como resultado más formación de espuma y la necesidad de alteraciones en las estrategias antiespumantes; así como durante la recogida y el procesamiento aguas abajo en el que los esfuerzos requeridos para eliminar el material celular excesivo pueden dar como resultado la pérdida de producto, anulando el beneficio de título aumentado debido a masa celular aumentada.

También se proporciona una estrategia de cultivo celular a gran escala que combina la alimentación alimentada por lotes durante la fase de crecimiento seguido por perfusión continua durante la fase de producción. El método se dirige a una fase de producción en la que se mantiene el cultivo celular en un volumen celular empaquetado de menos del o igual al 35%. El método también proporciona el inicio y el mantenimiento de la detención de crecimiento celular debido a bajo contenido en asparagina.

El cultivo por lotes y alimentado es un método de cultivo puesto ampliamente en práctica para la producción a gran escala de proteínas a partir de células de mamífero. Véase por ejemplo Chu y Robinson (2001), Current Opin. Biotechnol. 12: 180-87. Un cultivo por lotes y alimentado de células de mamífero es aquél en el que el cultivo se alimenta, de manera o bien continua o bien periódica, con un medio de alimentación concentrado que contiene nutrientes. La alimentación puede producirse según una programación predeterminada de, por ejemplo, cada día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, etc. En comparación con un cultivo por lotes, en el que no se produce alimentación, un cultivo por lotes y alimentado puede producir mayores cantidades de proteína recombinante. Véase por ejemplo la patente estadounidense n.º 5.672.502.

En una realización, se usa un cultivo por lotes y alimentado con alimentaciones por bolo para mantener un cultivo celular durante la fase de crecimiento. Entonces puede usarse alimentación por perfusión durante una fase de producción. En una realización, la perfusión empieza cuando las células han alcanzado una fase de producción. La perfusión empieza del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 9 del cultivo celular. En una realización la perfusión empieza del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 7 del cultivo celular.

En otra realización el inicio de la detención de crecimiento celular en el cultivo por lotes y alimentado puede iniciarse sometiéndolo al cultivo por lotes y alimentado a un periodo de privación de L-asparagina seguido por perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos. En una realización se monitoriza la concentración de L-asparagina del medio de cultivo celular antes de y durante la privación de L-asparagina. En otra realización el inicio de la detención de crecimiento celular en el cultivo por lotes y alimentado puede conseguirse mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos.

El uso de alimentación por bolo durante la fase de crecimiento permite que las células pasen a la fase de producción, dando como resultado menos dependencia con respecto a un desplazamiento de temperatura como medio de inicio y control de la fase de producción, sin embargo puede tener lugar un desplazamiento de temperatura de 36°C a 31°C entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización preferida el desplazamiento es de desde 36°C hasta 33°C.

Tal como se describe en el presente documento, el biorreactor puede inocularse con al menos desde $0,5 \times 10^6$ hasta y por encima de $3,0 \times 10^6$ células viables/ml en un medio de cultivo libre de suero, preferiblemente $1,0 \times 10^6$ células viables/ml.

El cultivo por perfusión es uno en el que el cultivo celular recibe medio de alimentación por perfusión nuevo mientras

se elimina simultáneamente el medio gastado. La perfusión puede ser continua, gradual, intermitente o una combinación de cualquiera de ellas o todas. Las velocidades de perfusión pueden ser de menos de un volumen de trabajo hasta muchos volúmenes de trabajo al día. Preferiblemente las células se conservan en el cultivo y el medio gastado que se elimina está sustancialmente libre de células o tiene significativamente menos células que el cultivo.

Las proteínas recombinantes expresadas por el cultivo celular también pueden conservarse en el cultivo. La perfusión puede realizarse mediante varios medios incluyendo centrifugación, sedimentación o filtración, véase por ejemplo Voisard *et al.*, (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. Un método de filtración preferido es la filtración de flujo tangencial alterno. El flujo tangencial alterno se mantiene bombeando medio a través de módulos de filtro de fibra hueca. Véase por ejemplo la patente estadounidense n.º 6.544.424; Furey (2002) *Gen. Eng. News*. 22 (7), 62-63.

Tal como se usa en el presente documento, la "velocidad de flujo de perfusión" es la cantidad de medios que se hacen pasar a través (añadido y eliminado) de un biorreactor, normalmente expresada como una parte o múltiplo del volumen de trabajo, en un tiempo dado. "Volumen de trabajo" se refiere a la cantidad del volumen del reactor usada para cultivo celular. En una realización la velocidad de flujo de perfusión es un volumen de trabajo o menos al día. El medio de alimentación por perfusión puede formularse para maximizar la concentración de nutrientes por perfusión para minimizar la velocidad de perfusión.

Por "cultivo celular" o "cultivo" se entiende el crecimiento y propagación de células fuera de un organismo multicelular o tejido. En la técnica se conocen condiciones de cultivo adecuadas para células de mamífero. Véase por ejemplo *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, Nueva York (1992). Pueden cultivarse células de mamífero en suspensión o mientras están adheridas a un sustrato sólido. Pueden usarse biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, botellas rodantes, frascos de agitación o biorreactores de tanque con agitación, con o sin microsoportes. En una realización se usan biorreactores de 500 l a 2000 l. En una realización preferida, se usan biorreactores de 1000 l a 2000 l.

Para los fines de esta invención, el medio de cultivo celular es un medio adecuado para el crecimiento de células de animales, tales como células de mamífero, en cultivo celular *in vitro*. En la técnica se conocen bien formulaciones de medios de cultivo celular. Normalmente, los medios de cultivo celular se componen de tampones, sales, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas y oligoelementos esenciales. "Libre de suero" se aplica a un medio de cultivo celular que no contiene sueros animales, tales como suero bovino fetal. Diversos medios de cultivo tisular, incluyendo medios de cultivo definidos, están disponibles comercialmente, por ejemplo, puede usarse uno cualquiera o una combinación de los siguientes medios de cultivo celular: medio RPMI-1640, medio RPMI-1641, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial de Eagle, medio F-12K, medio F12 de Ham, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio 5A de McCoy, medio L-15 de Leibovitz, y medios libres de suero tales como EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), entre otros. También están disponibles versiones libres de suero de tales medios de cultivo. Los medios de cultivo celular pueden complementarse con concentraciones aumentadas o adicionales de componentes tales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, tampones, antibióticos, lípidos, oligoelementos y similares, dependiendo de los requisitos de las células que van a cultivarse y/o los parámetros de cultivo celular deseados.

Los cultivos celulares pueden complementarse con un medio de alimentación concentrado que contiene componentes, tales como nutrientes y aminoácidos, que se consumen durante el transcurso de la fase de producción del cultivo celular. El medio de alimentación concentrado puede basarse en prácticamente cualquier formulación de medios de cultivo celular. Un medio de alimentación concentrado de este tipo puede contener la mayoría de los componentes del medio de cultivo celular a, por ejemplo, aproximadamente 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, o incluso aproximadamente 1000X de su cantidad normal. A menudo se usan medios de alimentación concentrados en procedimientos de cultivo por lotes y alimentados.

El método según la presente invención puede usarse para mejorar la producción de proteínas recombinantes en procedimientos de cultivo de fase múltiple. En un procedimiento de etapas múltiples, se cultivan células en dos o más fases distintas. Por ejemplo, pueden cultivarse células en primer lugar en una o más fases de crecimiento, en condiciones ambientales que maximizan la proliferación y viabilidad celular, luego transferirse a una fase de producción, en condiciones que maximizan la producción de proteínas. En un procedimiento comercial para la producción de una proteína mediante células de mamífero, hay comúnmente múltiples, por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 fases de crecimiento que se producen en recipientes de cultivo diferentes que preceden a un cultivo de producción final. Las fases de crecimiento y producción pueden estar precedidas, o separadas, por una o más fases de transición. En procedimientos de fase múltiple, puede emplearse el método según la presente invención al menos durante el crecimiento y producción de la fase de producción final de un cultivo celular comercial, aunque también puede emplearse en una fase de crecimiento precedente. Puede llevarse a cabo una fase de producción a gran escala. Puede llevarse a cabo un procedimiento a gran escala en un volumen de al menos aproximadamente 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10.000, 15.000, 20.000 litros. En una realización preferida la producción se lleva a cabo en biorreactores de 500 l, 1000 l y/o 2000 l. Puede producirse una fase de crecimiento a una temperatura más alta que una fase de producción. Por ejemplo, puede producirse una fase de crecimiento a una primera temperatura de desde aproximadamente 35°C hasta aproximadamente 38°C, y una fase de producción puede producirse a una segunda temperatura de desde aproximadamente 29°C hasta

aproximadamente 37°C, opcionalmente desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 36°C o desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 34°C. Además, pueden añadirse inductores químicos de producción de proteínas, tales como, por ejemplo, cafeína, butirato y hexametilbenzacetamida (HMBA), al mismo tiempo, antes y/o después de un desplazamiento de temperatura. Si se añaden los inductores después de un desplazamiento de temperatura, pueden añadirse desde una hora hasta cinco días después del desplazamiento de temperatura, opcionalmente desde uno hasta dos días después del desplazamiento de temperatura. Los cultivos celulares pueden mantenerse durante días o incluso semanas mientras las células producen la(s) proteína(s) deseada(s).

Las muestras del cultivo celular pueden monitorizarse y evaluarse usando cualquiera de las técnicas analíticas conocidas en la técnica. Puede monitorizarse una variedad de parámetros incluyendo calidad y características del medio y proteína recombinante durante la duración del cultivo. Pueden tomarse muestras y monitorizarse de manera intermitente a una frecuencia deseada, incluyendo monitorización continua, en tiempo real o casi en tiempo real. En una realización la concentración de L-asparagina del medio de cultivo celular se monitoriza antes de y durante la privación de L-asparagina.

Normalmente se usan los cultivos celulares que preceden al cultivo de producción final (de N-x a N-1) para generar las células de siembra que se usarán para inocular el biorreactor de producción, el cultivo N-1. La densidad de células de siembra puede tener un impacto positivo sobre el nivel de proteína recombinante producida. Los niveles de producto tienden a aumentar con el aumento de la densidad de siembra. La mejora en el título está relacionada no sólo con una densidad de siembra más alta, sino que probablemente se ve influida por el estado del ciclo celular y metabólico de las células que se colocan en la producción.

Pueden producirse células de siembra mediante cualquier método de cultivo. Un método preferido es un cultivo por perfusión que usa filtración de flujo tangencial alterno. Un biorreactor N-1 puede hacerse funcionar usando filtración de flujo tangencial alterno para proporcionar células a alta densidad para inocular un biorreactor de producción. La etapa N-1 puede usarse para hacer crecer células hasta densidades de $>90 \times 10^6$ células/ml. El biorreactor N-1 puede usarse para generar cultivos de siembra por bolo o puede usarse como un cultivo madre de siembra rodante que puede mantenerse para sembrar múltiples biorreactores de producción a alta densidad de células en siembra. La duración de la etapa de crecimiento de producción puede oscilar entre 7 y 14 días y puede diseñarse de manera que se mantengan células en crecimiento exponencial antes de la inoculación del biorreactor de producción. Las velocidades de perfusión, formulación de medio y sincronización se optimizan para hacer crecer células y suministrarlas al biorreactor de producción en un estado que es el más propicio para optimizar su producción. Pueden conseguirse densidades de células en siembra de $>15 \times 10^6$ células/ml para sembrar biorreactores de producción. Densidades de células en siembra más altas en la inoculación pueden disminuir o incluso eliminar el tiempo necesario para alcanzar una densidad de producción deseada.

La invención encuentra una utilidad particular en la mejora del crecimiento celular, viabilidad y/o producción de proteínas por medio de procedimientos de cultivo celular. Las líneas celulares (también denominadas "células huésped") usadas en la invención se modifican por ingeniería genética para expresar un polipéptido de interés científico o comercial. Las líneas celulares se derivan normalmente de un linaje que surge de un cultivo primario que puede mantenerse en cultivo durante un tiempo ilimitado. Modificar por ingeniería genética la línea celular implica transfectar, transformar o transducir las células con una molécula de polinucleótido recombinante, y/o alterar de otro modo (por ejemplo, mediante recombinación homóloga y activación génica o fusión de una célula recombinante con una célula no recombinante) para hacer que la célula huésped exprese un polipéptido recombinante deseado. Los expertos en la técnica también conocen métodos y vectores para líneas celulares y/o células modificadas por ingeniería genética para expresar un polipéptido de interés; por ejemplo, se ilustran diversas técnicas en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, ed. (Wiley & Sons, Nueva York, 1988, y actualizaciones trimestrales); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, págs. 15-69.

Líneas celulares de animales se derivan de células cuyos progenitores se derivaron de un animal multicelular. Un tipo de línea celular de animal es una línea celular de mamífero. Una amplia variedad de líneas celulares de mamífero adecuadas para el crecimiento en cultivo están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo (Manassas, Va.) y proveedores comerciales. Los ejemplos de líneas celulares usados comúnmente en la industria incluyen VERO, BHK, HeLa, CV1 (incluyendo Cos), MDCK, 293, 3T3, líneas celulares de mieloma (por ejemplo, NSO, NS1), PC12, células WI38, y células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO se usan ampliamente para la producción de proteínas recombinantes complejas, por ejemplo citocinas, factores de coagulación y anticuerpos (Brasel *et al.* (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman *et al.* (1988), *J. Biol Chem* 263:6352-6362; McKinnon *et al.* (1991), *J Mol Endocrinol* 6:231-239; Wood *et al.* (1990), *J. Immunol.* 145:3011-3016). Las líneas celulares mutantes deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub *et al.* (1980), *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216-4220), DXB11 y DG-44, son líneas de células huésped de CHO deseables debido a que el sistema de expresión génica ampliable y seleccionable de DHFR eficaz permite altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en estas células (Kaufman R.J. (1990), *Meth Enzymol* 185:537-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos en suspensión o adherentes y presentan una estabilidad genética relativamente buena. Las células de CHO y proteínas expresadas de manera recombinante en las mismas se han caracterizado ampliamente y las agencias reguladoras han aprobado su uso en la fabricación comercial clínica.

Los métodos de la invención pueden usarse para cultivar células que expresan proteínas recombinantes de interés. Las proteínas recombinantes expresadas pueden secretarse en el medio de cultivo del cual pueden recuperarse y/o recogerse. Además, las proteínas pueden purificarse, o purificarse parcialmente, a partir de tal cultivo o componente (por ejemplo, del medio de cultivo) usando procedimientos conocidos y productos disponibles de proveedores comerciales. Las proteínas purificadas pueden entonces "formularse", lo que quiere decir someterse a intercambio de tampón, esterilizarse, envasarse a granel y/o envasarse para un usuario final. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Tal como se usa en el presente documento "péptido," "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable a lo largo de todo el documento y se refieren a una molécula que comprende dos o más residuos de aminoácido unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Los péptidos, polipéptidos y proteínas también incluyen modificaciones incluyendo, pero sin limitarse a, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Los polipéptidos pueden ser de interés científico o comercial, incluyendo fármacos a base de proteínas. Los polipéptidos incluyen, entre otras cosas, anticuerpos, proteínas de fusión y citocinas. Se producen péptidos, polipéptidos y proteínas mediante líneas celulares de animales recombinantes usando métodos de cultivo celular y pueden denominarse "péptido recombinante", "polipéptido recombinante" y "proteína recombinante". La(s) proteína(s) expresada(s) puede(n) producirse de manera intracelular o secretarse en el medio de cultivo del que pueden recuperarse y/o recogerse.

Los ejemplos de polipéptidos que pueden producirse con los métodos de la invención incluyen proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas a sustancialmente similares a la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas: factor de necrosis tumoral (TNF), ligando flt3 (documento WO 94/28391), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, IL-2, angiopoyetina-2 (Maisonpierre *et al.* (1997), Science 277(5322): 55-60), ligando para activador de receptor de NF-kappa B (RANKL, documento WO 01/36637), ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, documento WO 97/01633), linfopoyetina estromal tímica, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, patente australiana n.º 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (patente estadounidense n.º 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos, RANTES, proteína similar a fibrinógeno humana 2 (FGL2; n.º de registro NCBI NM_00682; Rüegg y Pytela (1995), Gene 160:257-62), hormona de crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento de tipo insulina, hormona paratiroidea, interferones incluyendo α -interferones, γ -interferón e interferones de consenso (patentes estadounidenses n.ºs 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas de tipo sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas, factores estimulantes de colonias, linfoxina- β , factor inhibidor de leucemia y oncostatina-M. Pueden encontrarse descripciones de proteínas que pueden producirse según los métodos de la invención, por ejemplo, en Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, todos los volúmenes (Aggarwal and Gutterman, ed. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, ed., Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993); y The Cytokine Handbook. Volúmenes 1 y 2 (Thompson and Lotze ed., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Además los métodos de la invención serán útiles para producir proteínas que comprenden la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista de un receptor de este tipo o cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, y/o proteínas sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas de receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR, denominados p55 y p75, patente estadounidense n.º 5.395.760 y patente estadounidense n.º 5.610.279), receptores de interleucina-1 (IL-1) (tipos I y II; n.º de patente EP 0460846, patente estadounidense n.º 4.968.607, y patente estadounidense n.º 5.767.064), antagonistas de receptor de IL-1 (patente estadounidense n.º 6.337.072), antagonistas o inhibidores de IL-1 (patentes estadounidenses n.ºs 5.981.713, 6.096.728, y 5.075.222), receptores de IL-2, receptores de IL-4 (n.º de patente EP 0 367 566 y patente estadounidense n.º 5.856.296), receptores de IL-15, receptores de IL-17, receptores de IL-18, receptores de Fc, receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos, receptores para oncostatina-M y factor inhibidor de leucemia, activador de receptor de NF-kappa B (RANK, documento WO 01/36637 y patente estadounidense n.º 6.271.349), osteoprotegerina (patente estadounidense n.º 6.015.938), receptores para TRAIL (incluyendo receptores de TRAIL 1, 2, 3, y 4), y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como Fas o receptor inductor apoptosis (AIR).

Otras proteínas que pueden producirse usando la invención incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de los mismos. Tales antígenos se dan a conocer en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani *et al.*, ed., Kobe, Japón, 1996). Se dan a conocer proteínas CD similares en seminarios posteriores. Los ejemplos de tales antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos a los mismos (ligando de CD27, ligando de CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia de receptor de TNF, que también incluye 41BB y OX40. A menudo los ligandos son miembros de la familia de TNF, al igual que el ligando de 41BB y ligando de OX40.

También pueden producirse proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos usando la invención. Los ejemplos

incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a una de estas: una desintegrina y miembros de la familia de domino de metaloproteína incluyendo enzima convertidora de TNF-alfa, diversas cinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador tisular del plasminógeno, factor VIII, factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, antitripsina alfa-1, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente, y otras muchas enzimas y sus ligandos.

El término "anticuerpo" incluye referencias a inmunoglobulinas tanto glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase o a una región de unión a antígeno del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique de otro modo, incluyendo humano, humanizado, quimérico, multiespecífico, monoclonal, policlonal y oligómeros o fragmentos de unión a antígeno del mismo. También se incluyen proteínas que tienen una región o fragmento de unión a antígeno tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, Fd, dAb, maxicuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena simple, fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específica a un polipéptido diana. El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, los que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped transfectada para expresar el anticuerpo.

Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los que reconocen una cualquiera o una combinación de proteínas incluyendo, pero sin limitarse a, las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD 14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, subunidades de receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, receptor de IL-18, FGL2, PDGF- β y análogos del mismo (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.272.064 y 5.149.792), VEGF, TGF, TGF- β 2, TNF- β 1, receptor de EGF (véase la patente estadounidense n.º 6.235.883), receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulador de linfocitos B (BlyS, también conocidos como BAFF, THANK, TALL-1, y zTNF4; véase Do y Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con cáncer de pulmón), HER-2, HER-3, una glicoproteína asociada a tumor TAG-72, el antígeno SK-1, epítopos asociados a tumor que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o de páncreas, proteínas o epítopos asociados a cáncer expresados en células de cáncer de mama, de colon, de células escamosas, de próstata, de páncreas, de pulmón y/o de riñón y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores de TRAIL 1, 2, 3, y 4, RANK, ligando de RANK, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glicoproteína gp IIb/IIIa de plaquetas, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor de factor VIIa, factor tisular), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor de Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno de HLA-DR, esclerostina, L-selectina, virus respiratorio sincitial, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. Los ejemplos específicos de anticuerpos conocidos que pueden producirse usando los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, adalimumab, bevacizumab, infliximab, abcximab, alemtuzumab, bapineuzumab, basiliximab, belimumab, briakinumab, canakinumab, certolizumab pegol, cetuximab, conatumumab, denosumab, eculizumab, gemtuzumab, ozogamicina, golimumab, ibritumomab tiuxetan, labetuzumab, mapatumumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, muromonab-CD3, natalizumab, nimotuzumab, ofatumumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pemtumomab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, rovelizumab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizumab, zalutumumab y zanolimumab.

La invención también puede usarse para producir proteínas de fusión recombinantes que comprenden, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, pueden producirse proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas mencionadas anteriormente más un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucinas, una superhélice, una porción Fc de una inmunoglobulina, o una proteína sustancialmente similar, usando los métodos de la invención. Véase por ejemplo el documento WO94/10308; Lovejoy *et al.* (1993), Science 259:1288-1293; Harbury *et al.* (1993), Science 262:1401-05; Harbury *et al.* (1994), Nature 371:80-83; Håkansson *et al.* (1999), Structure 7:255-64. Entre tales proteínas de fusión recombinantes se incluyen específicamente proteínas en las que una porción de un receptor se fusiona a una porción Fc de un anticuerpo tal como etanercept (un p75 TNFR:Fc) y belatacept (CTLA4:Fc).

Aunque la terminología usada en esta solicitud es convencional en la técnica, en el presente documento se proporcionan definiciones de determinados términos para garantizar la claridad y la concisión al significado de las reivindicaciones. Unidades, prefijos y símbolos pueden indicarse en su forma del SI aceptada. En los intervalos numéricos mencionados en el presente documento se incluyen los números que definen el intervalo e incluyen y apoyan cada número entero dentro del intervalo definido. Los métodos y técnicas descritos en el presente documento se realizan generalmente según métodos convencionales que se conocen bien en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y comentan en toda la presente memoria descriptiva a menos que se indique de otro modo. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning:

A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Lo que se describe en una realización de la invención puede combinarse con otras realizaciones de la invención.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Este experimento compara diferentes condiciones de arranque usando métodos de alimentación por lotes o por lotes y alimentados seguidos por perfusión continua usando filtración de flujo tangencial alterno. Se comenzó la perfusión o bien de manera temprana durante la fase de crecimiento exponencial temprano (arranque "por lotes") sin alimentaciones adicionales antes de la perfusión o bien al final de la fase exponencial y entrando en la fase estacionaria o de producción (arranque "por lotes y alimentado") que recibe varias alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero antes de la perfusión.

El día 0 se inocularon células CHO que expresaban un anticuerpo recombinante en biorreactores de producción de 2 l a 1×10^6 células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml de un medio definido libre de suero para el inicio por lotes y alimentado y de 1800 ml para el inicio por lotes. Se mantuvieron los cultivos a 36°C, oxígeno disuelto (DO) al 30%, agitación a 215 RPM. Se mantuvo la glucosa por encima de 0 g/l y por debajo de 8 g/l.

Se comenzó la perfusión el día 4 (0,25 vol/día) para los cultivos por lotes y el día 7 (0,75 vol/día) para los cultivos por lotes y alimentados. Se realizó la perfusión usando un sistema de filtración y perfusión por flujo tangencial alterno (Refine Technologies, Hanover, NJ, filtro de fibra hueca de 50 kDa). Antes de comenzar la perfusión los cultivos por lotes y alimentados recibieron alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero concentrado el día 4 (el 7,5% del volumen de trabajo inicial) y el día 6 (el 10% del volumen de trabajo inicial). En la tabla 1 se proporcionan las velocidades de perfusión.

Tabla 1. Velocidad de perfusión

Día	Velocidad de perfusión (vol/día)
0 - 4*	0,00
4 - 6	0,25
6 - 7	0,50
7 - 10	0,75
10 -	1,00

Los valores se basan en volúmenes de trabajo dados a conocer anteriormente

*Día 0-7 para el inicio por lotes y alimentado

Durante el desarrollo del cultivo, se tomaron muestras diarias para evaluar el cultivo. Se determinaron la densidad de células viables (VCD) y la viabilidad usando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Se midió el título mediante análisis por HPLC. Se determinó el volumen celular empaquetado usando VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Alemania).

Se aplicó un desplazamiento de temperatura (de 36,0°C a 33,0°C) cuando la densidad de células viables excedió 20×10^6 células viables/ml lo que fue el día 7 y el día 11 para las condiciones de inicio por lotes o por lotes y alimentado respectivamente.

Para las condiciones de arranque por lotes, la densidad de células viables continuó aumentando después de iniciarse la perfusión; para condiciones de inicio por lotes y alimentado, la perfusión se inició después de que el cultivo alcanzara una fase estacionaria o meseta con poco crecimiento. El día 15, la densidad de células viables para la alimentación por lotes era de entre 27,7 y $30,7 \times 10^6$ células viables/ml mientras que la VCD del cultivo por lotes era de entre 22,5 y $27,4 \times 10^6$ células viables/ml (figura 1A). La viabilidad del cultivo por lotes y alimentado era de entre el 73,9 y el 77,5% mientras que la viabilidad del cultivo por lotes era de entre el 72,5 y el 83,1% (figura 1B). El título del cultivo por lotes y alimentado era de entre 15,3 y 16,1 g/l mientras que el título del cultivo por lotes era de entre 10,6 y 12,3 g/l (figura 1C). Puesto que los valores de densidad de células variable integrada (IVCD) eran similares para los cuatro cultivos el día 15 (aproximadamente 230×10^6 célula días/ml), la productividad específica era más alta en las condiciones de arranque por lotes y alimentado. Los cultivos por lotes y alimentados continuaron hasta el día 24. Se consiguió un título de 20 g/l a los 20 días.

La perfusión con flujo tangencial alterno con un arranque por lotes y alimentado dio como resultado productividad aumentada, manteniendo las células en un estado más productivo en comparación con el método de inicio por lotes.

Ejemplo 2

El día 0 se inocularon las células CHO que expresaban un anticuerpo recombinante en biorreactores de producción de 2 l a 1×10^6 células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml de un medio definido libre de suero para el

inicio por lotes y 1300 ml para el inicio por lotes y alimentado. Se mantuvieron los cultivos a 36°C, DO al 30%, agitación a 215 RPM para cultivos por lotes. Se agitó el cultivo por lotes y alimentado a 430 RPM. Se alimentó el cultivo por lotes y alimentado hasta 7 g/l de glucosa diariamente antes de la perfusión y se mantuvieron todos los cultivos a o por encima de 4 g/l de glucosa durante la perfusión. Se inició la perfusión (flujo tangencial alterno) el día 4 (0,25 vol/día) para los cultivos por lotes y el día 8 (0,75 vol/día) para el cultivo por lotes y alimentado. Antes de comenzar la perfusión, el cultivo por lotes y alimentado recibió alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero concentrado el día 4 (el 7,5% del volumen de trabajo inicial) y el día 6 (el 10% del volumen de trabajo inicial). En la tabla 2 se proporcionan ajustes de las velocidades de flujo de perfusión. Se mantuvieron los cultivos durante 21 días.

Tabla 2. Velocidad de perfusión

Día	Velocidad de perfusión (vol/día)
4 – 6	0,25
6 – 8	0,50
8 – 10	0,75
10 -	1,00

Los valores se basan en volúmenes de trabajo dados a conocer anteriormente

Durante el desarrollo del cultivo se tomaron muestras diarias tal como se describió anteriormente para evaluar el cultivo.

Se aplicó un desplazamiento de temperatura (de 36,0°C a 33,0°C) a los cultivos por lotes el día 6 cuando la densidad de células viables excedió 20×10^6 células viables/ml, como en el ejemplo 1. Se mantuvo el cultivo por lotes y alimentado a 36,0°C durante la duración del cultivo.

Los cultivos de métodos de arranque por lotes tuvieron resultados similares a los descritos anteriormente alcanzando las células aproximadamente de 20 a 25×10^6 células viables/ml sin crecimiento después del día 10. El cultivo por lotes y alimentado alcanzó casi 30×10^6 células viables/ml el día 20 tras pasar la mayor parte de la duración del cultivo por debajo de 20×10^6 células viables/ml, véase la figura 2A. Todas las viabilidades permanecieron por encima del 80% hasta el día 10 y después disminuyeron hasta aproximadamente el 40% en el día 20 para los cultivos de inicio por lotes y el 60% para el cultivo por lotes y alimentado, véase la figura 2B. El título alcanzó un máximo a casi 15 g/l para los cultivos de inicio por lotes, pero alcanzó más de 20 g/l para el cultivo por lotes y alimentado con alta agitación, véase la figura 2C. Se observó que los cultivos de inicio por lotes tenían una concentración de L-asparagina de aproximadamente 3 a 4 mM el día 3, y no experimentaron un entorno de cultivo limitado en asparagina. Sin embargo, el cultivo de inicio con perfusión por lotes y alimentado experimentó un entorno limitado en L-asparagina en el día 6 antes del inicio de la perfusión el día 7. Entonces se sometió el cultivo a perfusión con medio que contenía L-asparagina a una concentración de 2,0 g/l (o 13,3 mM) que dio como resultado no más limitaciones de L-asparagina tras el día 8 (figura 2D). Las concentraciones de glucosa se mantuvieron principalmente entre 4 y 10 g/l.

El arranque por lotes y alimentado con cultivo por perfusión con alta agitación consiguió el título más alto (más de 20 g/l) en 20 días, más de 5 g/l más alto que los cultivos de arranque por lotes, que era similar a los resultados descritos anteriormente. No se observaron efectos negativos de una velocidad de agitación más alta. El mantenimiento de una temperatura constante no pareció tener un impacto negativo sobre el cultivo por lotes y alimentado.

Ejemplo 3

Este experimento caracteriza los efectos de volumen de perfusión y desplazamientos de temperatura sobre una perfusión por flujo tangencial alterno con un arranque por lotes y alimentado tal como se describió anteriormente. Todos los cultivos eran con inicio por lotes y alimentado comenzando la perfusión el día 7. Se sometieron a prueba velocidades de flujo de perfusión que movían desde tres cuartos de volumen de trabajo hasta volumen completo o desde volumen de trabajo completo hasta tres cuartos del volumen de trabajo. También se sometió a prueba un desplazamiento de temperatura de desde 36°C hasta 33°C el día 14.

El día 0 se inocularon células CHO que expresaban un anticuerpo recombinante en biorreactores de producción de 2 l a 1×10^6 células/ml en un volumen de trabajo de 1200 ml de un medio definido libre de suero. Se mantuvieron los cultivos a 36°C, DO al 30%. Antes de la perfusión, se alimentó glucosa hasta 7 g/l diariamente y durante la perfusión se mantuvo la glucosa por encima de 1 g/l. Se mantuvo el cultivo durante 20 días.

Los cultivos recibieron alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero concentrado el día 4 (el 7,5% del volumen de trabajo inicial) y el día 6 (el 10% del volumen de trabajo inicial). La perfusión empezó el día 8. En la tabla 3 se proporcionan velocidades de perfusión. Un cultivo de cada grupo tuvo un desplazamiento de temperatura de desde 36°C hasta 33°C el día 15, los otros cultivos permanecieron a 36°C durante la duración del experimento

Tabla 3. Velocidad de perfusión

Condición	Día	Velocidad de perfusión (vol/día)
Condición 1 (n=2)	8 – 12	0,75
	12 -	1,00
Condición 2 (n=2)	8 – 10	1,00
	10 -	0,75

Los valores se basan en volúmenes de trabajo dados a conocer anteriormente

El desplazamiento de temperatura y la velocidad de perfusión no tuvieron un impacto visible sobre la densidad de células viables, véase la figura 3A. Sin embargo, un desplazamiento de temperatura parece ayudar a conservar la viabilidad en puntos de tiempos posteriores en un cultivo. Parece haber una desviación entre las condiciones de desplazamiento de temperaturas a partir del día 15 en adelante. La viabilidad de los cultivos con desplazamiento de temperatura disminuyó más lentamente que los cultivos que permanecieron a 36°C, véase la figura 3B. En cuanto al título, tres cultivos mostraron títulos muy similares el día 15 (17,1-17,9 g/l) así como el día 20 (22-24 g/l), sin embargo un cultivo tuvo un título más alto el día 15 (21,58 g/l) así como el día 20 (28,33 g/l) (véase la figura 3C). Ni la temperatura ni las velocidades de perfusión parecieron tener ningún impacto sobre la producción de título, sugiriendo que los cultivos pueden mantenerse con diferentes velocidades de perfusión.

Ejemplo 4

Este experimento se diseñó para investigar los efectos de las concentraciones de asparagina en medio de perfusión y condiciones de inicio por perfusión con entornos de cultivos o bien limitados o bien no limitados en L-asparagina sobre la densidad de células viables durante la fase de producción.

El día 0 se inocularon células CHO que expresaban un anticuerpo recombinante en biorreactores de producción de 2 l a 1×10^6 células/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml para los métodos de inicio tanto por lotes y alimentado como por lotes. Se mantuvieron los cultivos a 36°C, oxígeno disuelto (DO) al 30%, agitación a 400 RPM. Se realizó burbujeo usando o bien un tubo perforado o bien un burbujeador sinterizado. Se mantuvo la glucosa por encima de 0 g/l y por debajo de 8 g/l.

Se inició la perfusión (flujo tangencial alterno) el día 3 (0,29 vol/día) para los “cultivos no limitados en asparagina” de inicio por lotes y el día 7 (0,48 vol/día) para los “cultivos limitados en asparagina” por lotes y alimentados. El medio de cultivo por lotes contenía L-asparagina 10 mM. Antes de comenzar la perfusión los cultivos por lotes y alimentados recibieron alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero concentrado los días 3 y 6 (el 7% del volumen de trabajo inicial) que contenía L-asparagina 113,4 mM. Las concentraciones de asparagina en el medio de perfusión fueron o bien una concentración de control (Asn 17,3 mM en medio de perfusión definido libre de suero) o bien una concentración baja (Asn 5 mM en medio de perfusión definido libre de suero). La perfusión se llevó a cabo tal como se describió anteriormente. En la tabla 4 se proporcionan velocidades de perfusión.

Tabla 4. Velocidades de perfusión

Condición	Día	Velocidad de perfusión (vol/día)
Día 3 Cultivo no limitado en asparagina de inicio por perfusión por lotes	3 – 4	0,29
	4 – 7	0,48
	7 – 9	0,48
	9 – 11	0,67
	11 – 20	0,96
Día 7 Cultivo limitado en asparagina de inicio por perfusión por lotes y alimentado	7 – 9	0,48
	9 – 11	0,67
	11 – 20	0,96

Durante el desarrollo del cultivo, se tomaron muestras diariamente para evaluar el cultivo. Se determinaron la densidad de células viables (VCD) y la viabilidad usando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Se midió el título mediante análisis por HPLC. Se mantuvieron todos los cultivos a 36,0°C.

Se consiguió reducción del crecimiento celular y productividad mejorada durante la fase de producción limitando la asparagina el medio de cultivo. El día 15, la densidad de células viables máxima era de aproximadamente $17,0 \times 10^6$ células viables/ml para los cultivos de inicio por lotes y alimentado con bajo contenido en asparagina (figura 4A). Cultivos con nivel de control de asparagina alcanzaron densidades de células viables que excedían 40×10^6 células viables/ml (>30% de volumen celular empaquetado). La viabilidad del cultivo por lotes y alimentado con bajo contenido en asparagina era del 67,1% mientras que la viabilidad del cultivo por lotes era del 55,1% y el control era del 69% (figura 4B). El título ajustado para el volumen celular empaquetado del cultivo por lotes y

alimentado con bajo contenido en asparagina era de 17,0 g/l (ajustado para el volumen celular empaquetado) mientras que el título del cultivo por lotes estaba entre 15,4 g/l (figura 4C). Los controles tuvieron títulos de 10,2 a 12,9 g/l (inicio por lotes) y de 14,2 a 15,9 g/l (inicio por lotes y alimentado).

- 5 El mantenimiento de los niveles de asparagina a 5 mM o menos durante la producción dio como resultado la detención de crecimiento, productividad estimulada y viabilidad mantenida durante la fase de producción.

Ejemplo 5

10 Este experimento compara condiciones de los medios durante la perfusión. En este experimento con biorreactor de 2 l, se inocularon células en un medio por lotes definido químicamente a un volumen de trabajo de 1,5 l, se cultivaron durante 3 días y entonces se sometieron a perfusión durante 12 días usando un medio de perfusión definido químicamente que contenía o bien L-asparagina 17,3 mM y L-glutamina 4,6 mM o bien L-asparagina 5 mM y L-glutamina 10 mM. Se realizó la perfusión usando un sistema de filtración y perfusión por flujo tangencial alterno (Refine Technologies, Hanover, NJ) con un filtro de fibra hueca de 30 kDa (GE Healthcare, Little Chalfont, R.U.). Se comenzó la perfusión el día 3 a una velocidad de 0,3 volúmenes de cultivo al día. La velocidad de perfusión aumentó los días 4, 9 y 11 tal como se indica a continuación en la tabla 6. Se mantuvieron los cultivos a 36°C, DO al 30%, pH a 7,0, y agitación a 400 rpm.

15 Durante el desarrollo del cultivo, se tomaron muestras diarias para evaluar el cultivo. Se determinaron la densidad de células viables (VCD) y la viabilidad usando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Se midió el título mediante análisis por HPLC. Se determinó el volumen celular empaquetado usando VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Alemania).

Tabla 5. Programación de velocidad de perfusión

Día	Velocidad de perfusión (vol/día)
3	0,30
4	0,50
9	0,67
11	0,96

- 20 La limitación en asparagina dio como resultado la acumulación de menos células y una productividad mejorada. Los cultivos sometidos a perfusión con medios que contenían asparagina 5 mM alcanzaron una VCD máxima de $8,16 \times 10^7$ - $8,54 \times 10^7$ células/ml mientras que los cultivos sometidos a perfusión con medios que contenían asparagina 17,3 mM alcanzaron $11,9 \times 10^7$ - $12,2 \times 10^7$ células/ml (figura 5A). Aunque los cultivos en asparagina 17,3 mM tenían más células, los cultivos en asparagina 5 mM produjeron más producto. Los cultivos sometidos a perfusión con medios que contenían asparagina 17,3 mM produjeron 6,89-7,18 g/l (4,33 - 4,67 g/l de volumen celular empaquetado ajustado) en comparación con 7,59-8,15 g/l (5,01 - 5,38 g/l de volumen celular empaquetado ajustado) para cultivos sometidos a perfusión con medios que contenían asparagina 5 mM (figuras 5B y 5D). El volumen celular empaquetado (PCV) final de los cultivos con asparagina 5 mM tendieron a ser ligeramente más bajos que los cultivos con asparagina 17,3 mM (figura 5C) y no hubo diferencia en la viabilidad del cultivo (figura 5E).
- 25 De manera interesante, en este ejemplo aumentar la concentración de glutamina en más de dos veces en la condición de bajo contenido en asparagina (glutamina 4,6 mM frente a 10 mM) no interfirió en la capacidad del medio con bajo contenido en asparagina para detener el crecimiento del cultivo.

Ejemplo 6

35 Este ejemplo compara el rendimiento de una línea de células CHO clonal que expresa anticuerpos cultivada en un procedimiento por perfusión con ATF usando limitación en asparagina para controlar el crecimiento a escala piloto y de laboratorio. El modelo de escala de laboratorio utilizó biorreactores de 2 l y en la escala piloto era de 500 l. A escala de laboratorio, se inocularon células en un medio por lotes definido químicamente a un volumen de trabajo de 1,5 l y a escala piloto el volumen de trabajo era de aproximadamente 378 l. Se cultivaron células durante 3 días en el medio por lotes y entonces se sometieron a perfusión durante 12 días usando un medio de perfusión definido químicamente que contenía L-asparagina 5 mM y L-glutamina 10 mM. Se realizó la perfusión usando un sistema de filtración y perfusión por flujo tangencial alterno (Refine Technologies, Hanover, NJ) con un filtro de fibra hueca de 30 kDa (GE Healthcare, Little Chalfont, R.U.). Se comenzó la perfusión el día 3 a una velocidad de 0,3 volúmenes de cultivo al día. Se aumentó la velocidad de perfusión los días 4, 9 y 11 tal como se indica a continuación en la tabla 7. Se mantuvieron los cultivos a 36°C, DO al 30% y pH 6,9.

- 45 Durante el desarrollo del cultivo, se tomaron muestras diarias para evaluar el cultivo. Se determinaron la densidad de células viables (VCD) y la viabilidad a escala de laboratorio usando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA) y a escala piloto usando un CEDEX (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Se midió el título mediante análisis por HPLC. Se determinó el volumen celular empaquetado usando VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Alemania).

Tabla 6. Programación de velocidad de perfusión

Día	Velocidad de perfusión (vol/día)
-----	----------------------------------

3	0,30
4	0,50
9	0,67
11	0,96

Se proporcionan datos de cuatro cultivos a escala de laboratorio y dos cultivos a escala piloto. Las curvas de VCD fueron similares a ambas escalas, se consiguió el control del crecimiento (figura 6A), y se mantuvo la masa de células total (volumen celular empaquetado) por debajo del 30% a ambas escalas (figura 6C). Aunque la VCD alcanzó una meseta alrededor del día 10 o día 11, el volumen celular empaquetado continuó aumentando hasta aproximadamente el día 13 ó 14 (figura 6C). La productividad también era similar entre escalas. Los cultivos sometidos a perfusión con medios que contenían asparagina 5 mM produjeron 14,2 - 15,7 g/l (10,7 - 11,4 g/l de volumen celular empaquetado ajustado) a escala de laboratorio de 2 l en comparación con 15,0 - 17,3 g/l (10,6 - 12,8 g/l de volumen celular empaquetado ajustado) a escala piloto de 500 l (figuras 6B y 6D). La viabilidad tendió a ser ligeramente más baja a escala piloto (figura 6E).

REIVINDICACIONES

1. Método de cultivo de células de mamífero que expresan una proteína recombinante que comprende;
 5 establecer un cultivo de células de mamífero en un medio de cultivo libre de suero en un biorreactor inoculando el biorreactor con al menos de $0,5 \times 10^6$ a $3,0 \times 10^6$ células/ml en un medio de cultivo libre de suero;
 hacer crecer las células de mamífero durante una fase de crecimiento y complementar el medio de cultivo con alimentaciones por bolo de un medio de alimentación libre de suero
 comenzar la perfusión del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 9 del cultivo celular, y
 10 mantener las células de mamífero durante una fase de producción mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero, en el que el volumen celular empaquetado durante la fase de producción es de menos del o igual al 35%.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la perfusión empieza del o de aproximadamente el día 5 al o a aproximadamente el día 7 del cultivo celular.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que la perfusión empieza cuando las células han alcanzado una fase de producción.
4. Método según la reivindicación 1, que comprende además (a) inducir la detención del crecimiento celular mediante privación de L-asparagina seguido por perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos, o (b) inducir la detención del crecimiento celular mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos.
 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es de menos de o igual a 5 mM, menos de o igual a 4,0 mM, menos de o igual a 3,0 mM, menos de o igual a 2,0 mM, menos de o igual a 1,0 mM, o es de 0 mM.
- 25 6. Método según la reivindicación 4(a), en el que la concentración de L-asparagina del medio de cultivo celular se monitoriza antes de y durante la privación de L-asparagina.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el volumen celular empaquetado es de menos del o igual al 30%.
8. Método según la reivindicación 1, en el que la densidad de células viables del cultivo de células de mamífero en un volumen celular empaquetado es de menos del o igual al 35% es de 10×10^6 células viables/ml a 80×10^6 células viables/ml, preferiblemente la densidad de células viables del cultivo de células de mamífero es de 20×10^6 células viables/ml a 30×10^6 células viables/ml.
 30 9. Método según la reivindicación 1, en el que perfusión comprende perfusión continua.
10. Método según la reivindicación 1, en el que la velocidad de perfusión es constante.
- 35 11. Método según la reivindicación 1, en el que perfusión se realiza (a) a una velocidad de menos de o igual a 1,0 volumen de trabajo al día o (b) a una velocidad que aumenta durante la fase de producción desde 0,25 volúmenes de trabajo al día hasta 1,0 volumen de trabajo al día durante el cultivo celular.
12. Método según la reivindicación 1, en el que la perfusión se realiza a una velocidad que alcanza 1,0 volumen de trabajo al día del día 9 al día 11 del cultivo celular, preferiblemente el día 10 del cultivo celular.
- 40 13. Método según la reivindicación 1, en el que las alimentaciones por bolo de medio de alimentación libre de suero empiezan el día 3 o el día 4 del cultivo celular.
14. Método según la reivindicación 1, en el que el cultivo de células de mamífero se establece inoculando el biorreactor con al menos de $0,5 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^6$ células/ml en un medio de cultivo libre de suero.
- 45 15. Método según la reivindicación 1, que comprende además un desplazamiento de temperatura de desde 36°C hasta 31°C o desde 36°C hasta 33°C .
16. Método según la reivindicación 15, en el que el desplazamiento de temperatura se produce en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción, o durante la fase de producción.
17. Método según la reivindicación 1, en el que la perfusión se realiza mediante flujo tangencial alterno.

18. Método según la reivindicación 1, en el que el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l, preferiblemente al menos de 500 l a 2000 l, o al menos de 1000 l a 2000 l.
19. Método según la reivindicación 1, en el que las células de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO).
- 5 20. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citocina.
21. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de recogida de la proteína recombinante producida por el cultivo celular.
- 10 22. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante producida por el cultivo celular se purifica y se formula para dar una formulación farmacéuticamente aceptable.

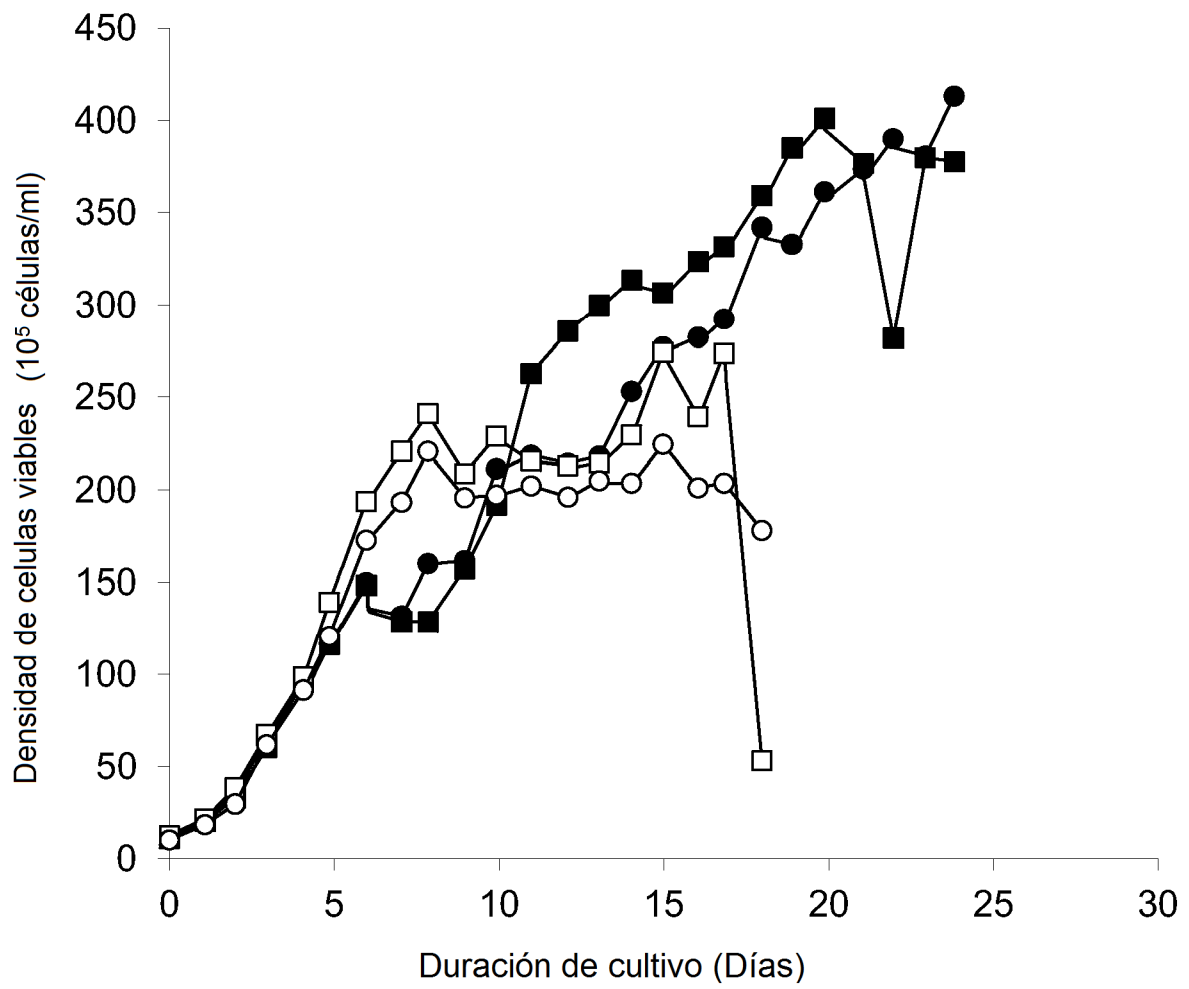


Figura 1A

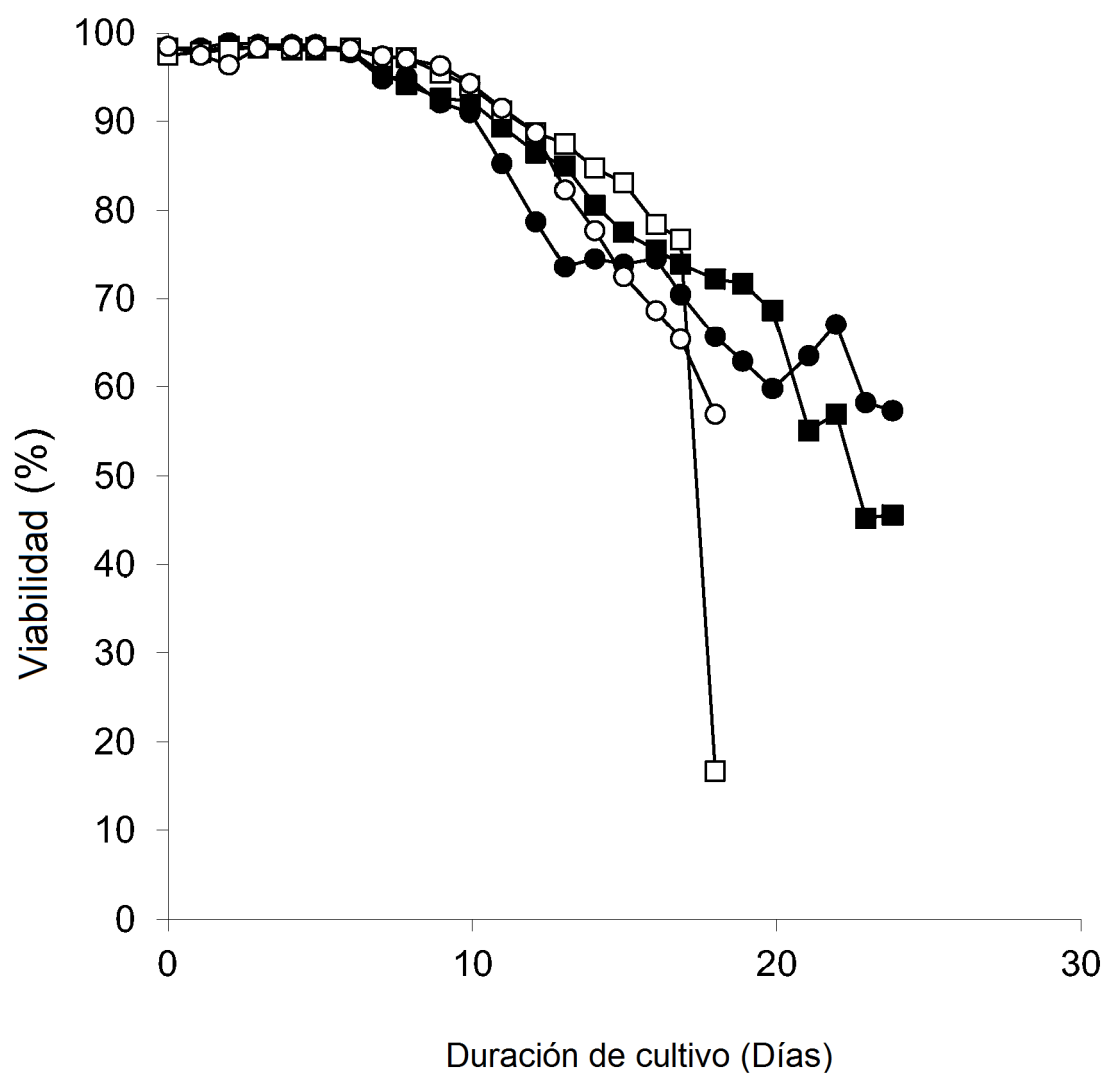


Figura 1B

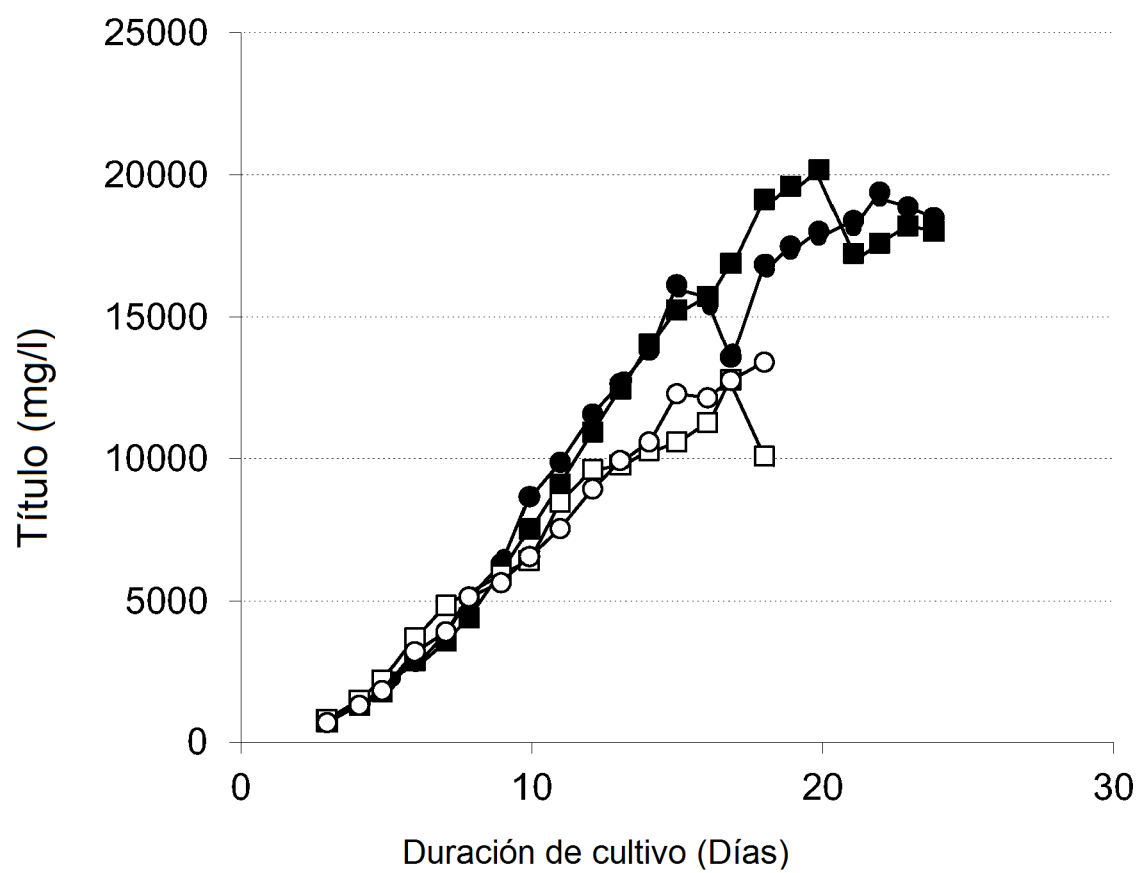


Figura 1C

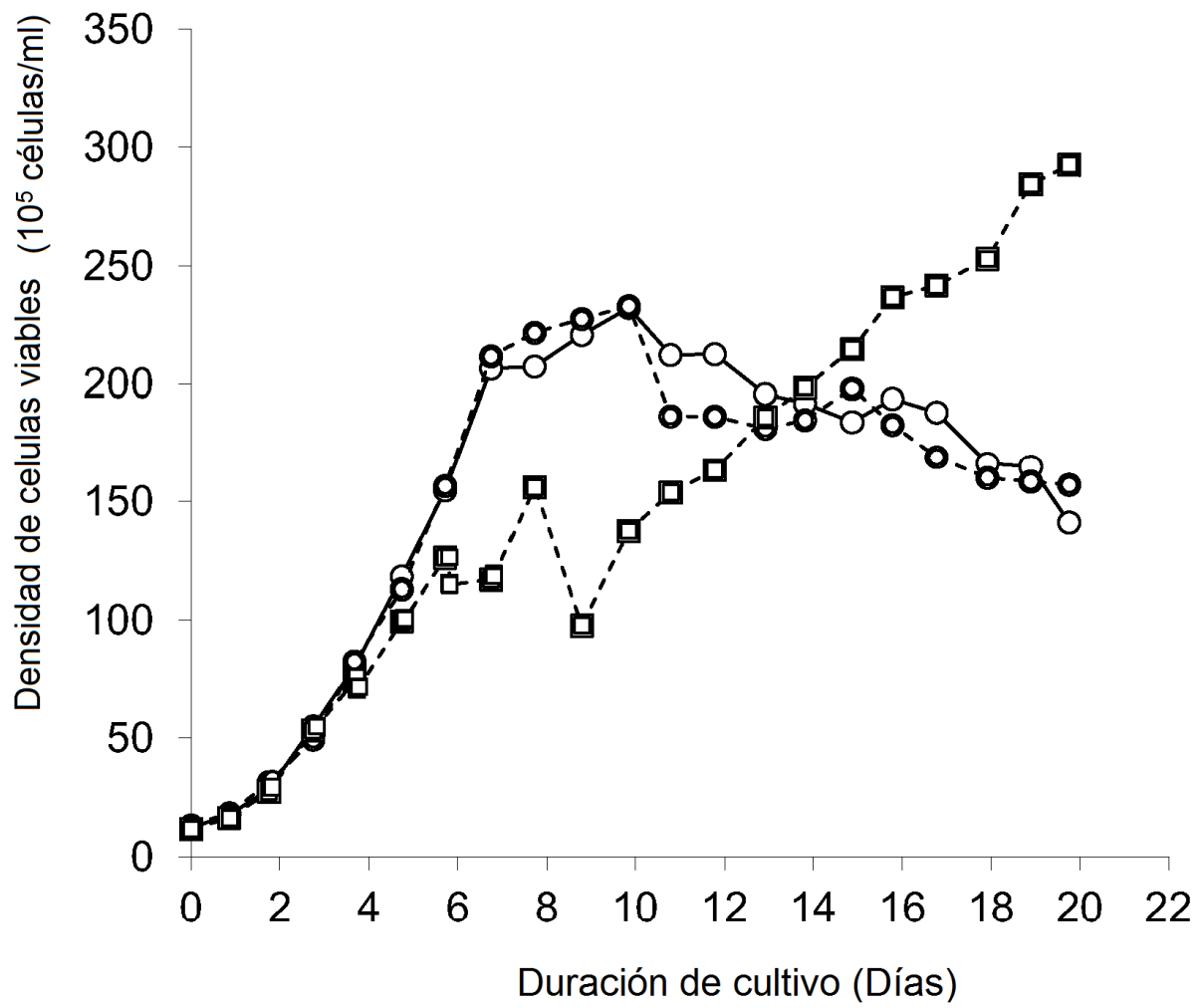


Figura 2A

ES 2 625 045 T3

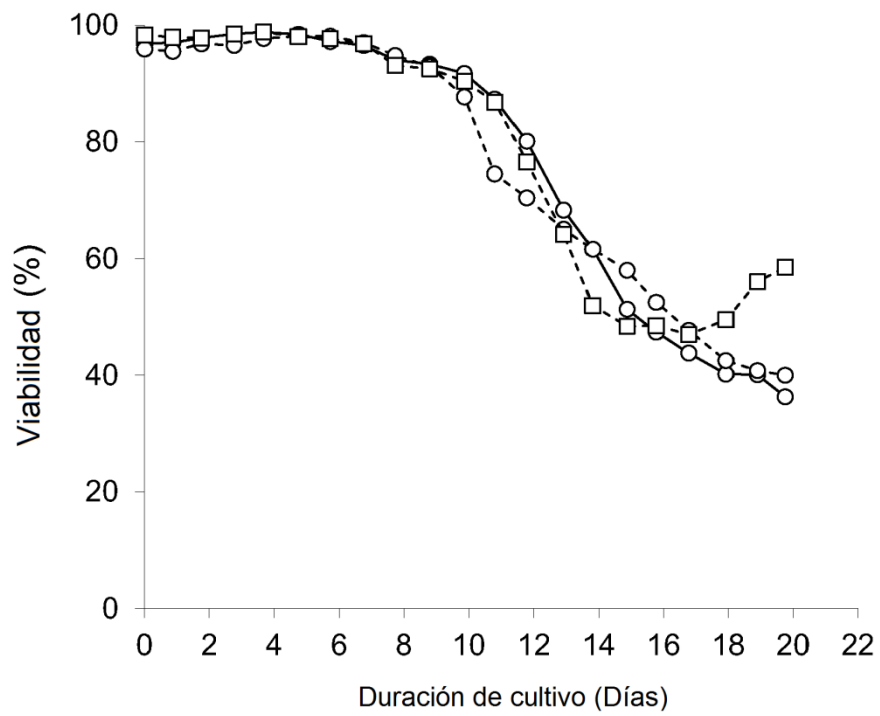


Figura 2B

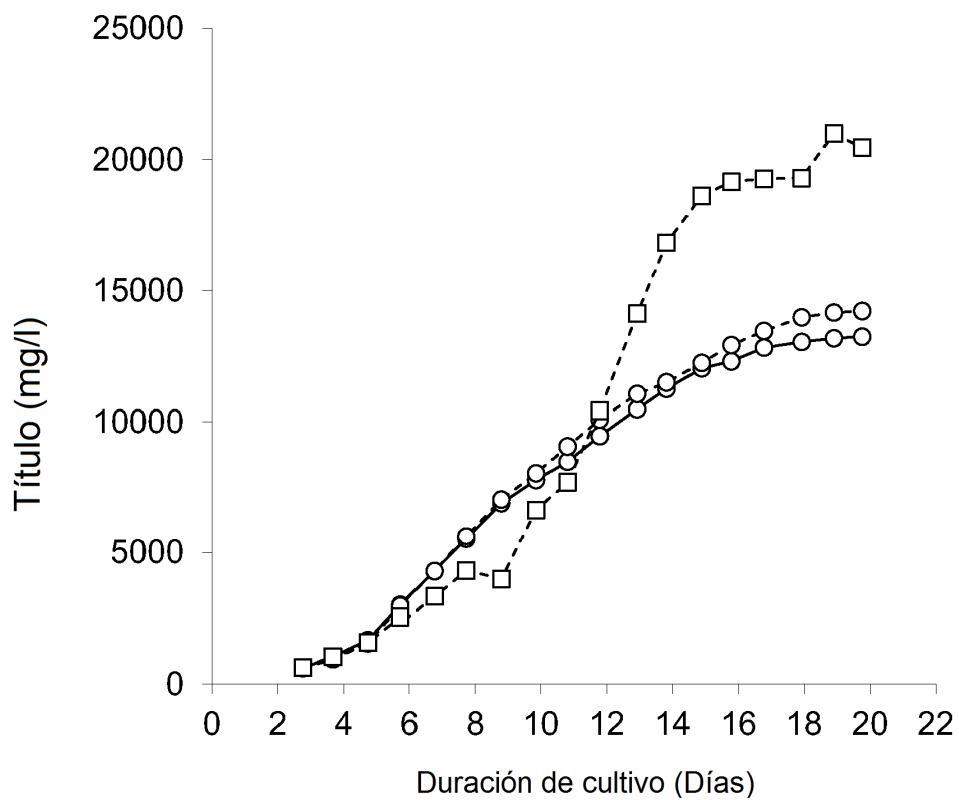


Figura 2C

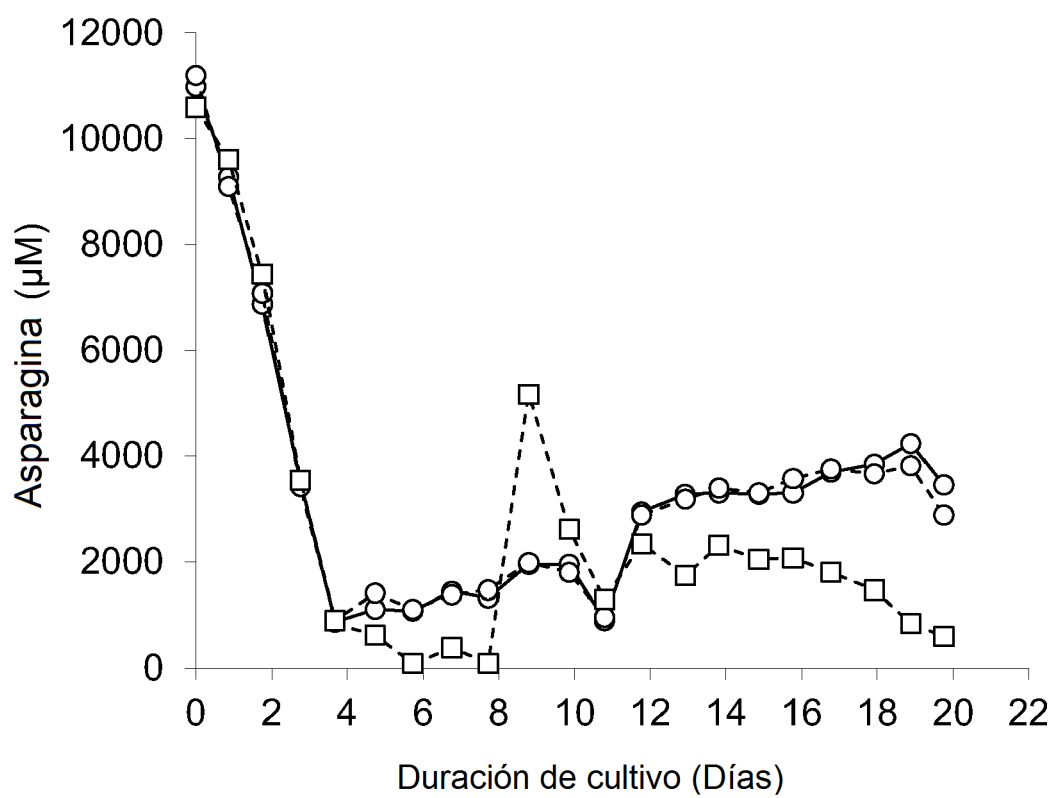


Figura 2D

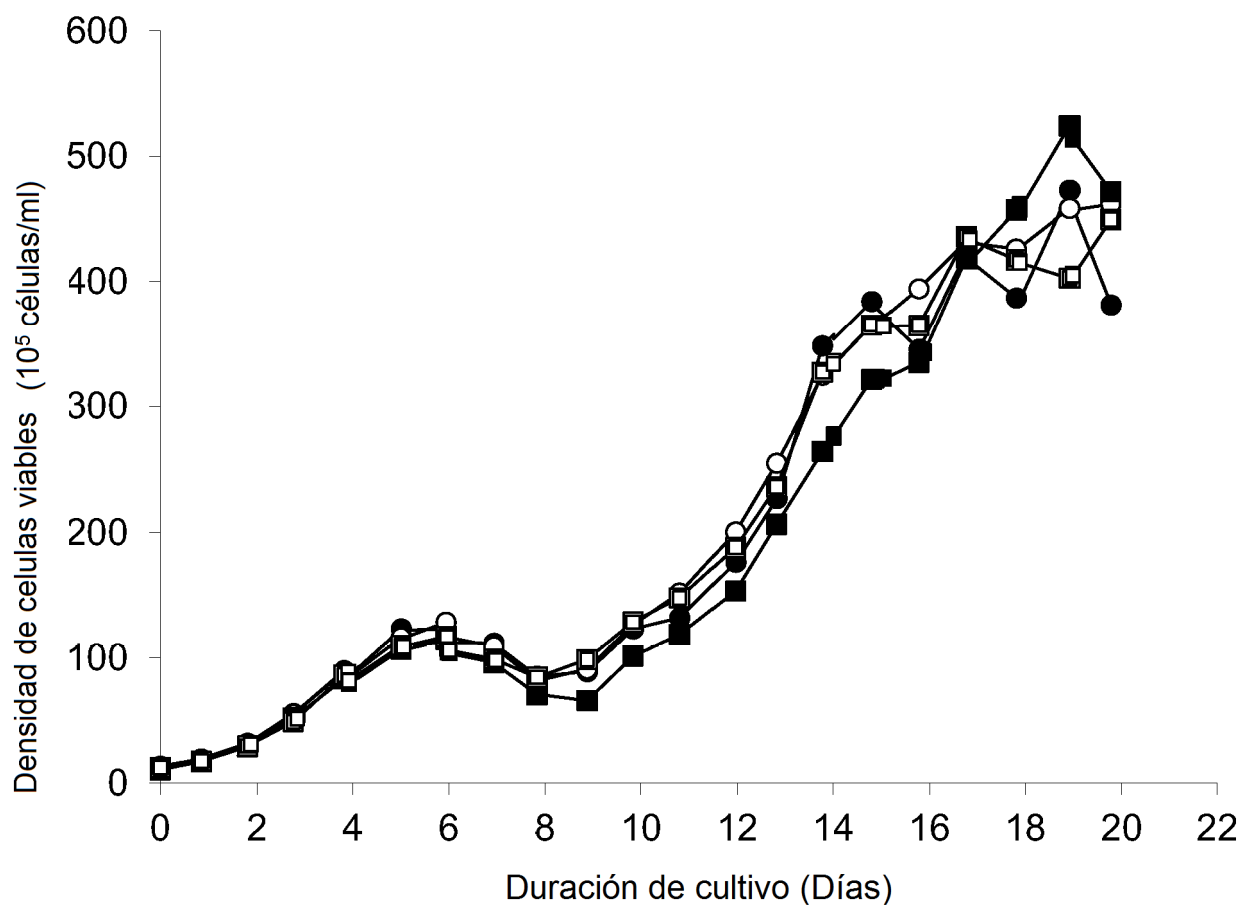


Figura 3A

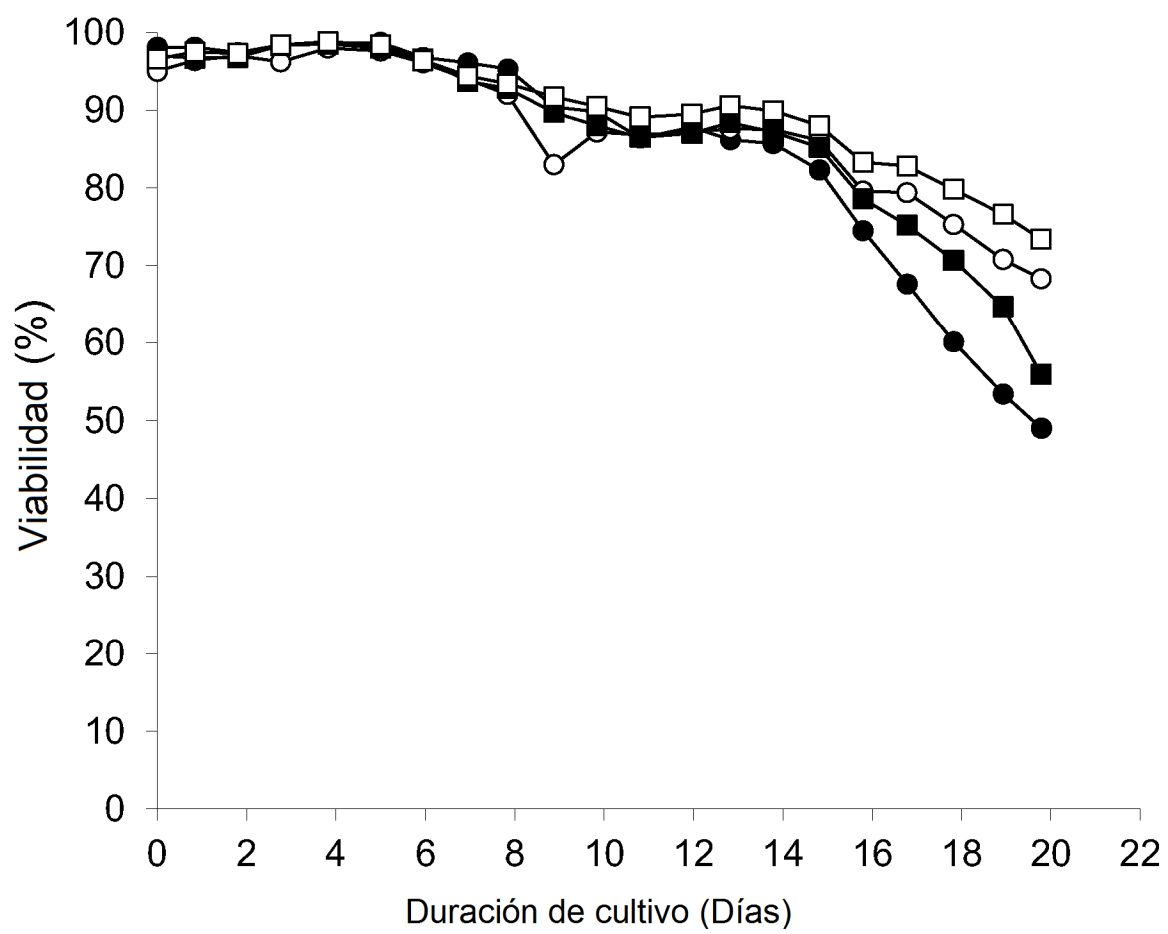


Figura 3B

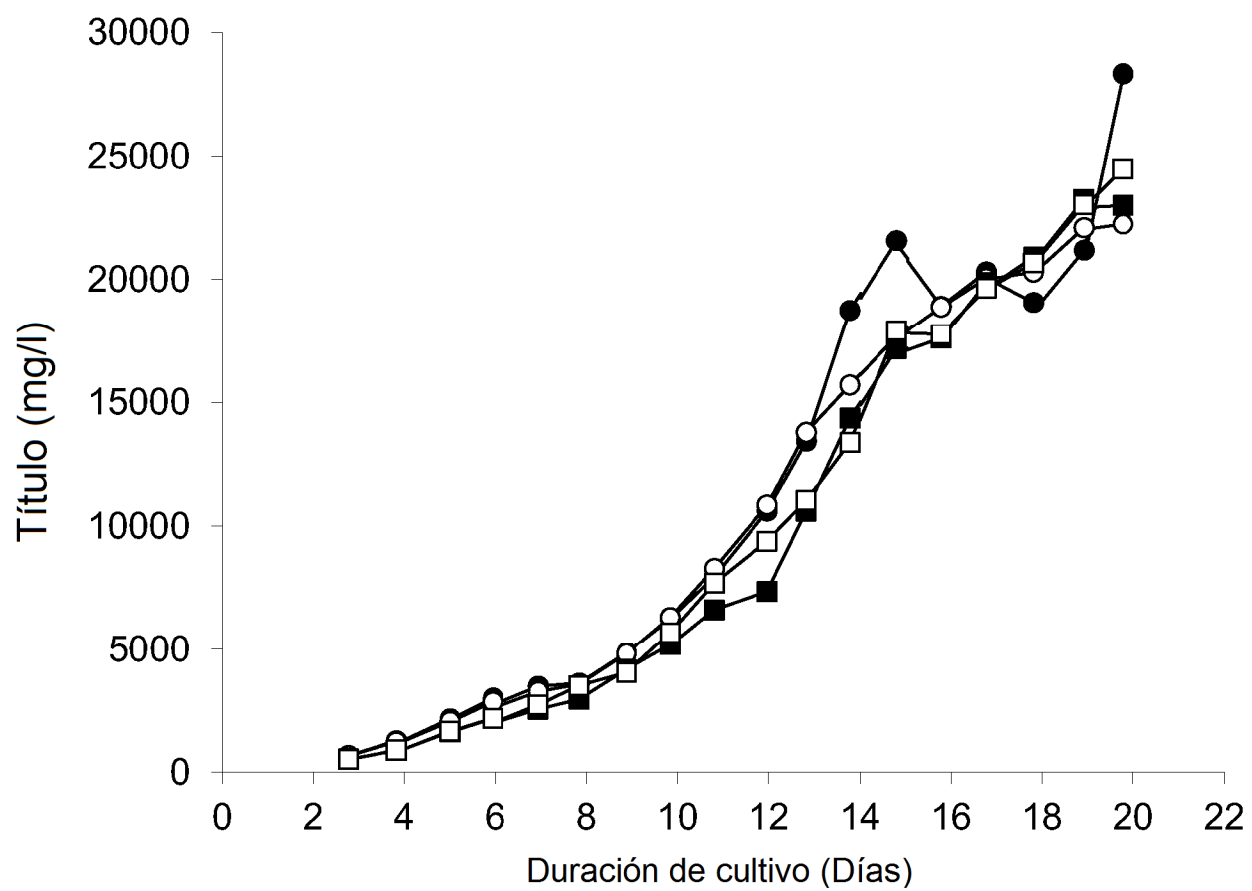


Figura 3C

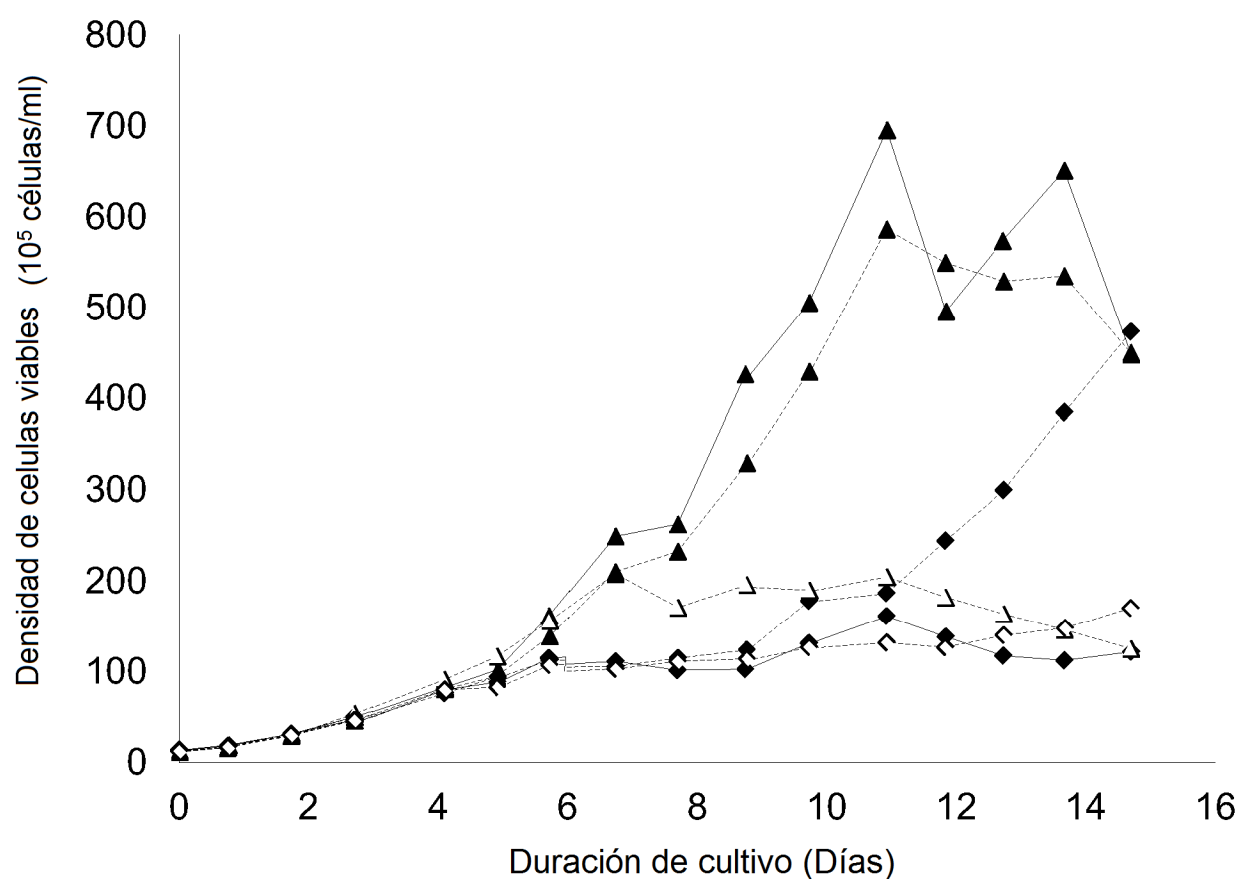


Figura 4A

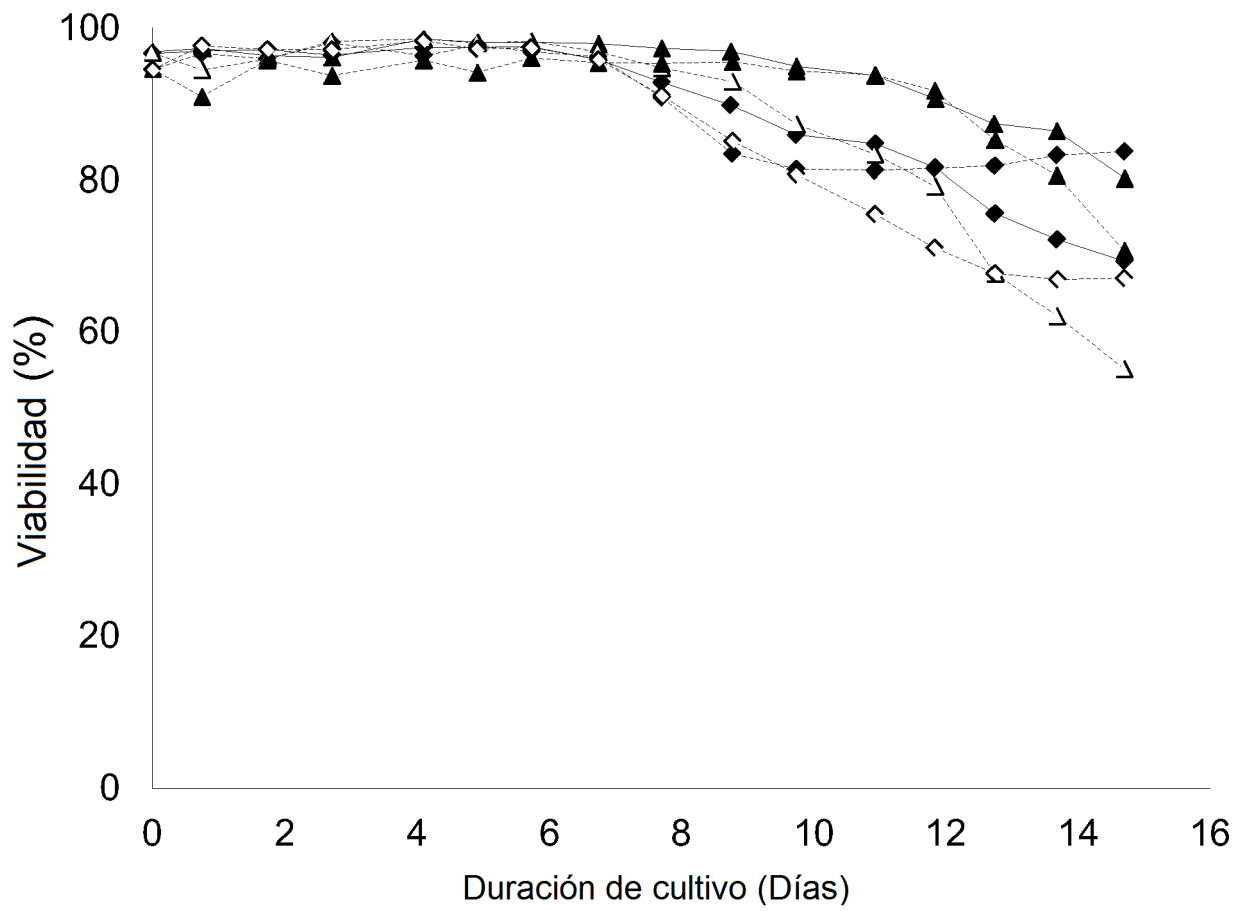


Figura 4B

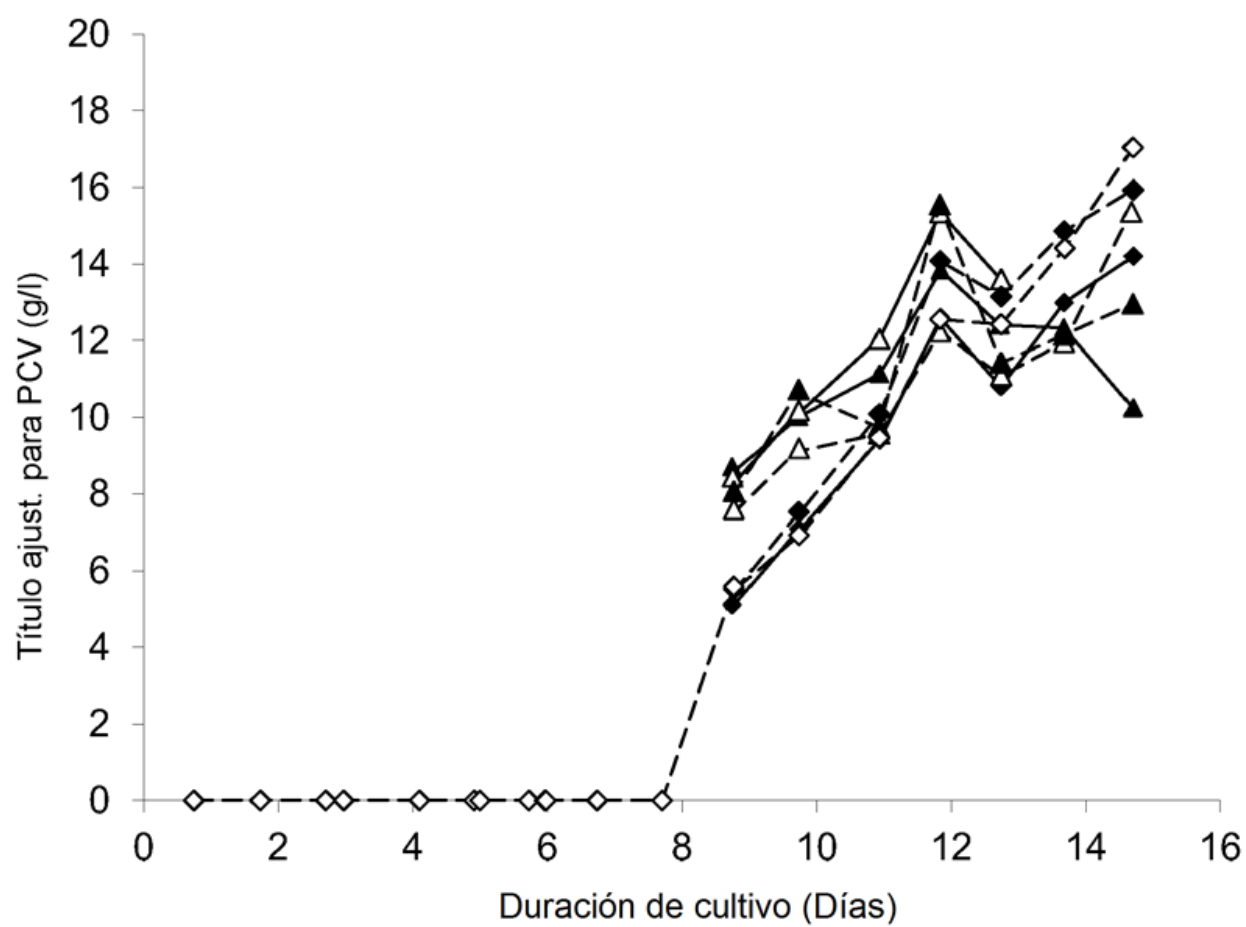


Figura 4C

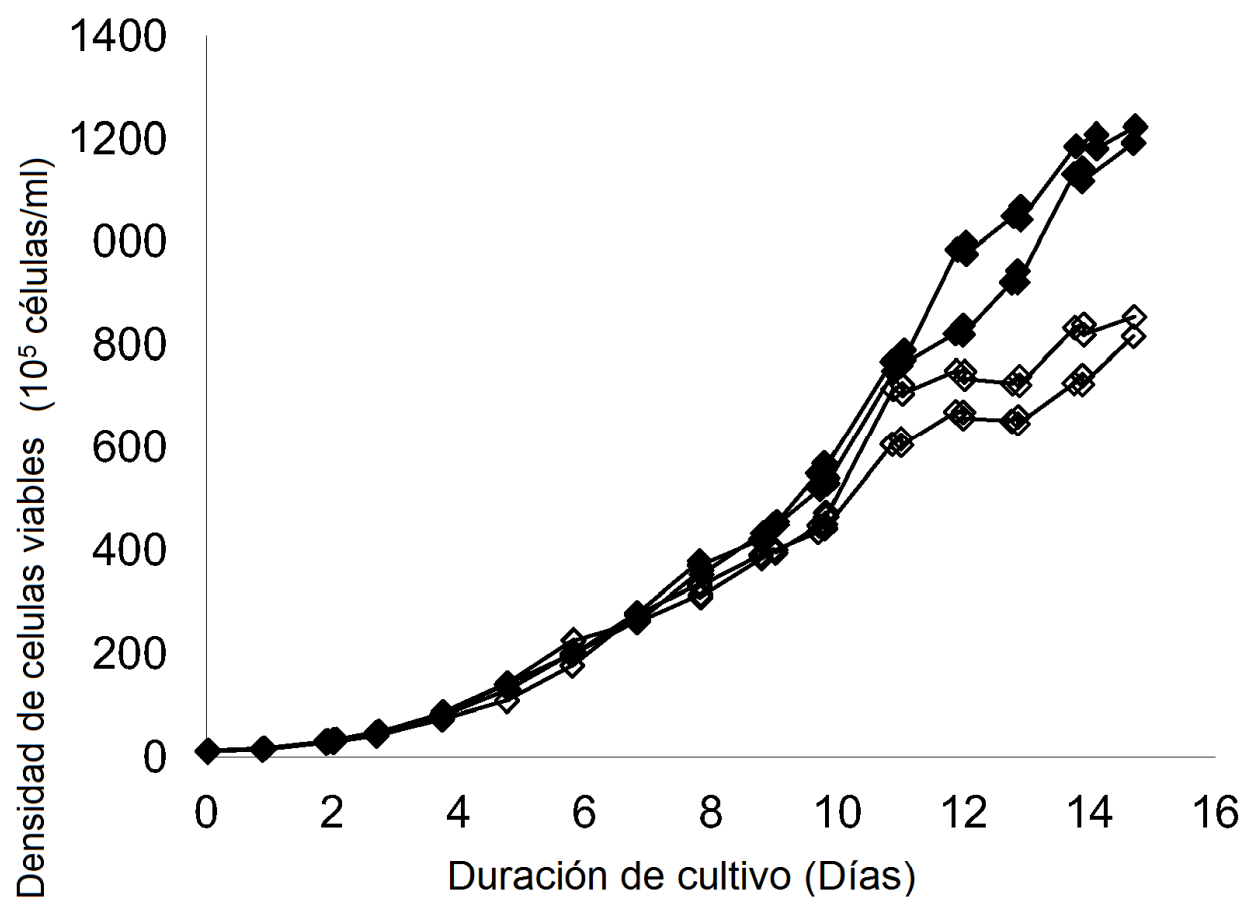


Figura 5A

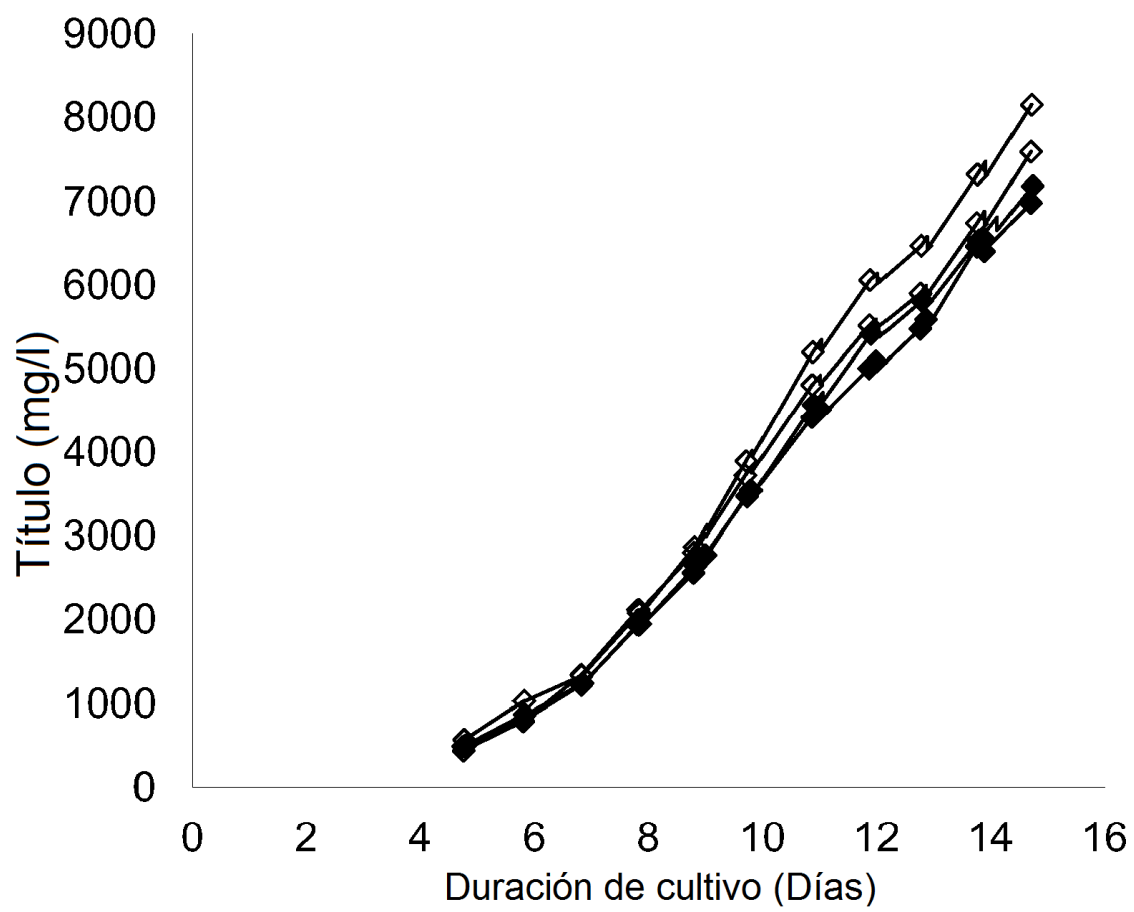


Figura 5B

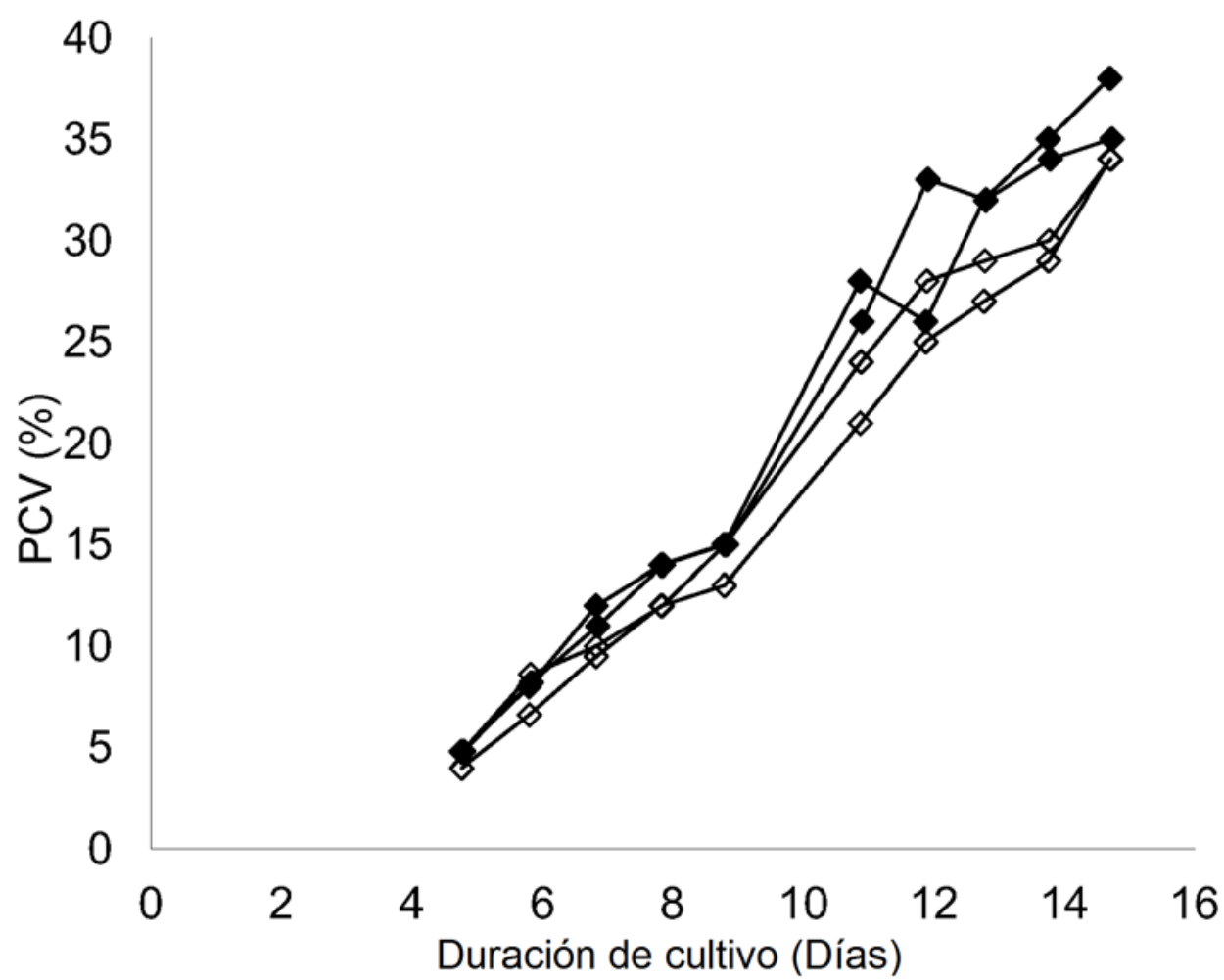


Figura 5C

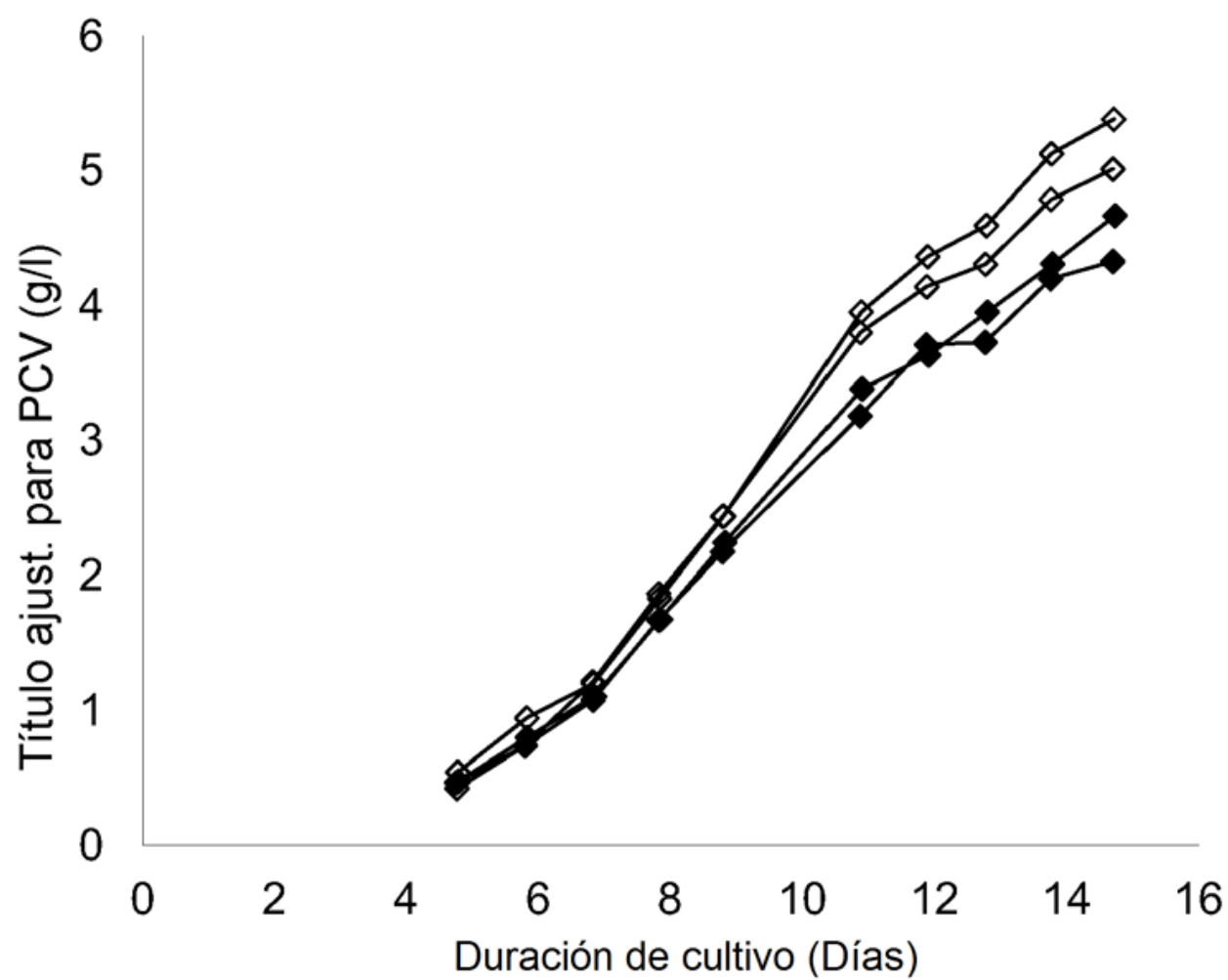


Figura 5D

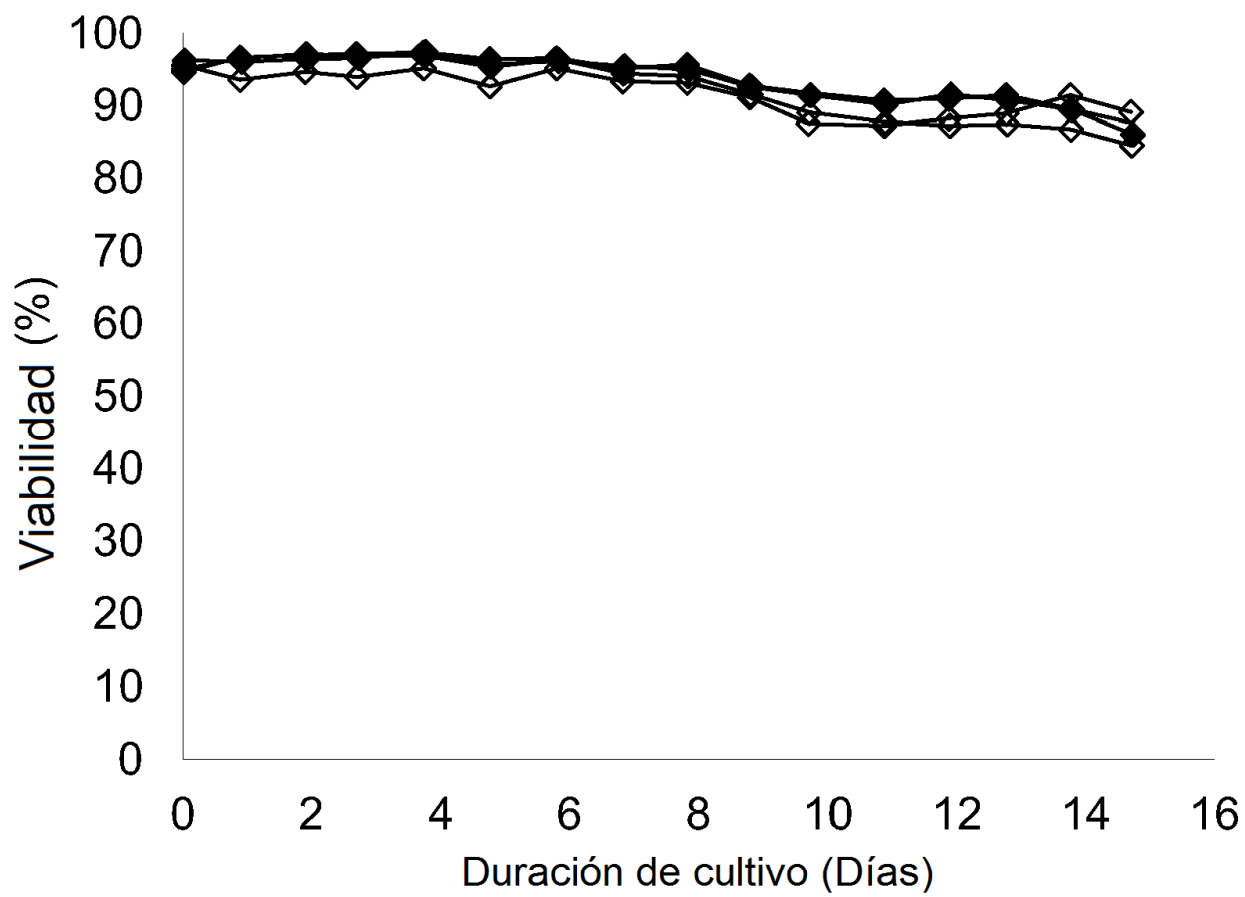


Figura 5E

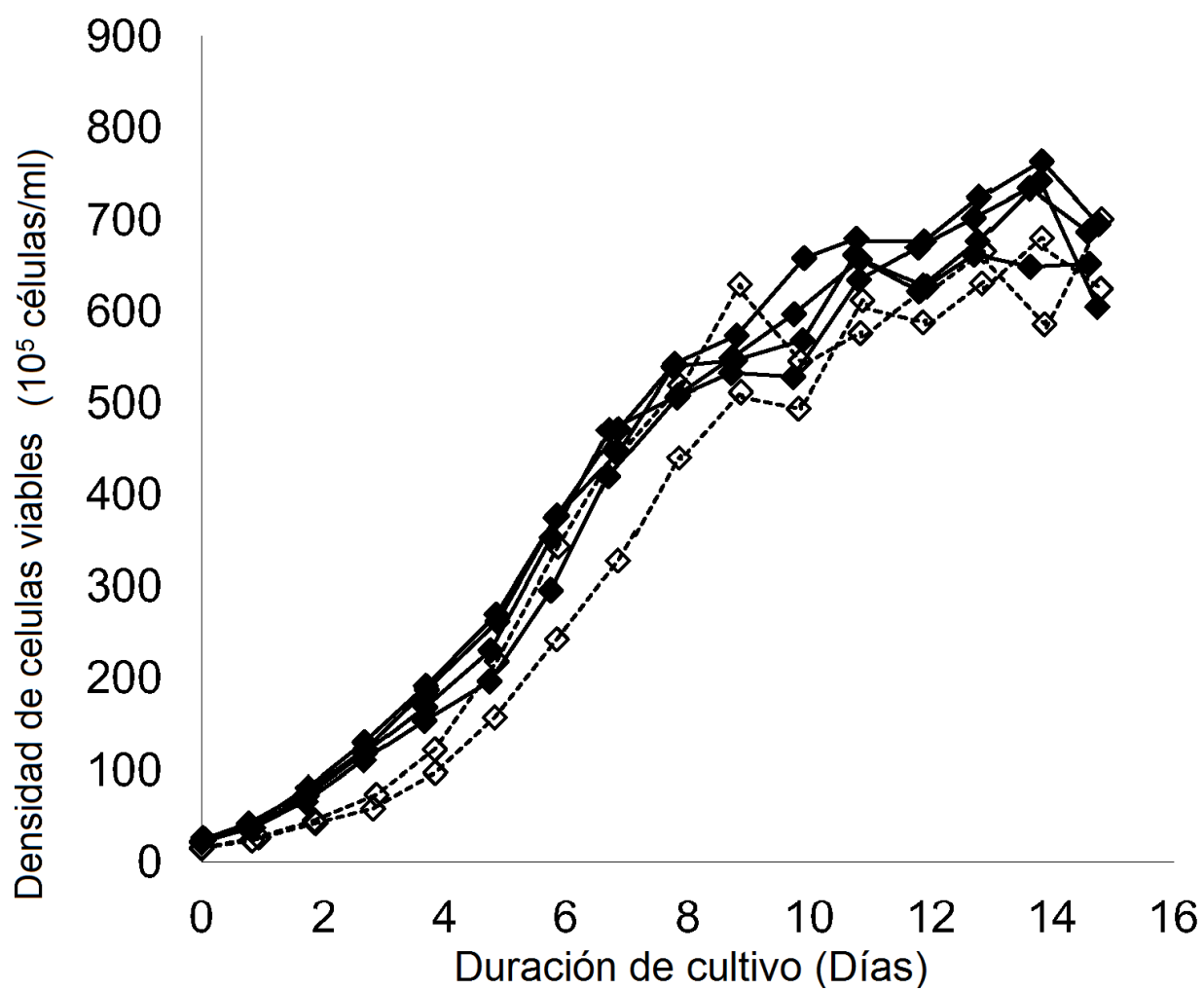


Figura 6A

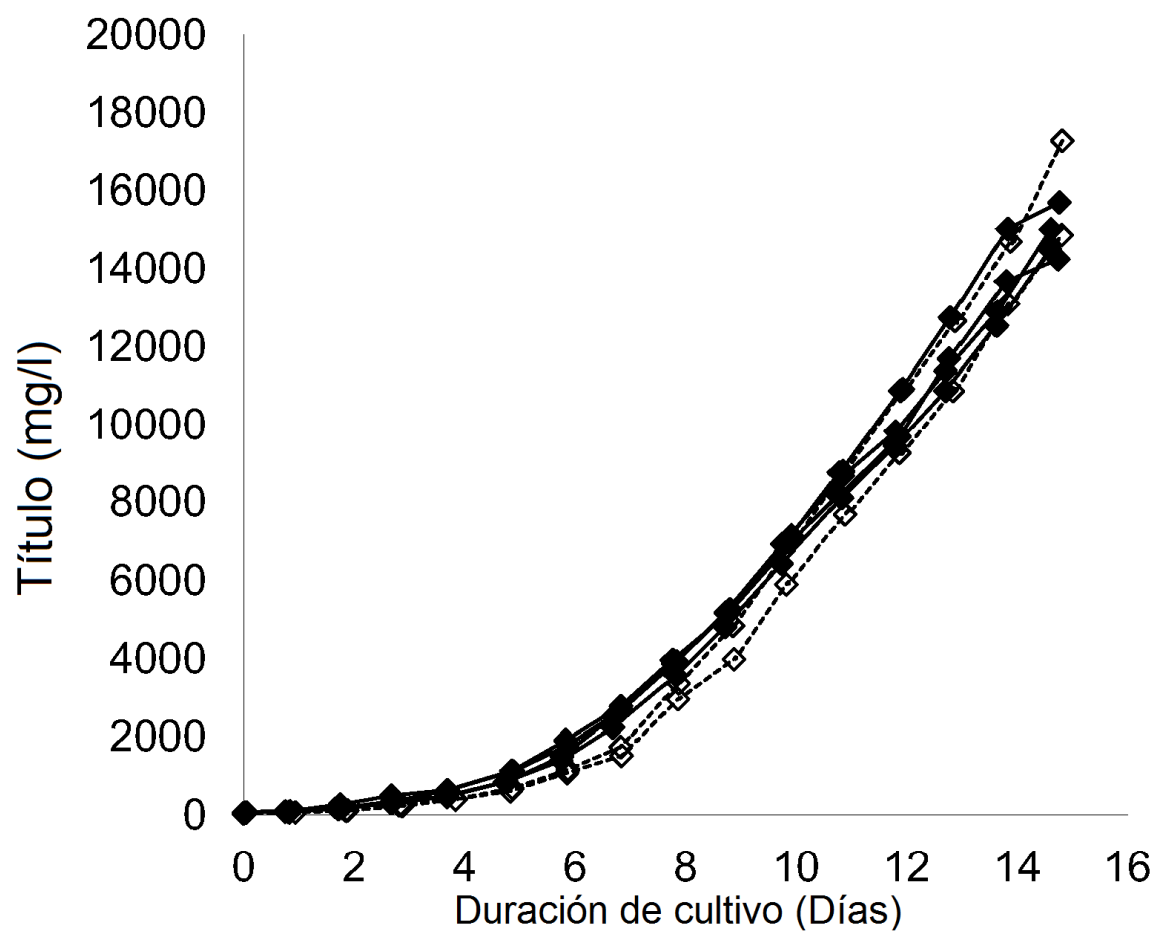


Figura 6B

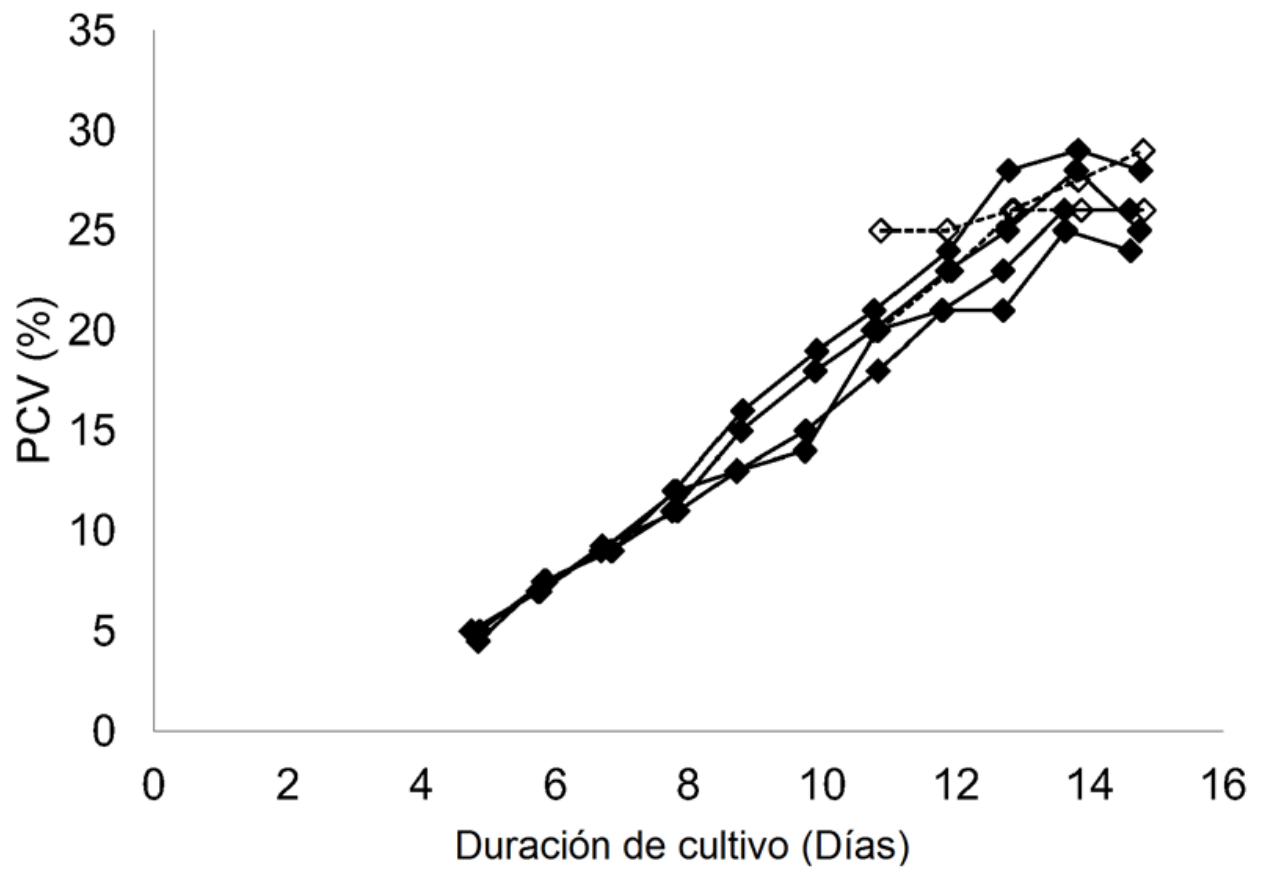


Figura 6C

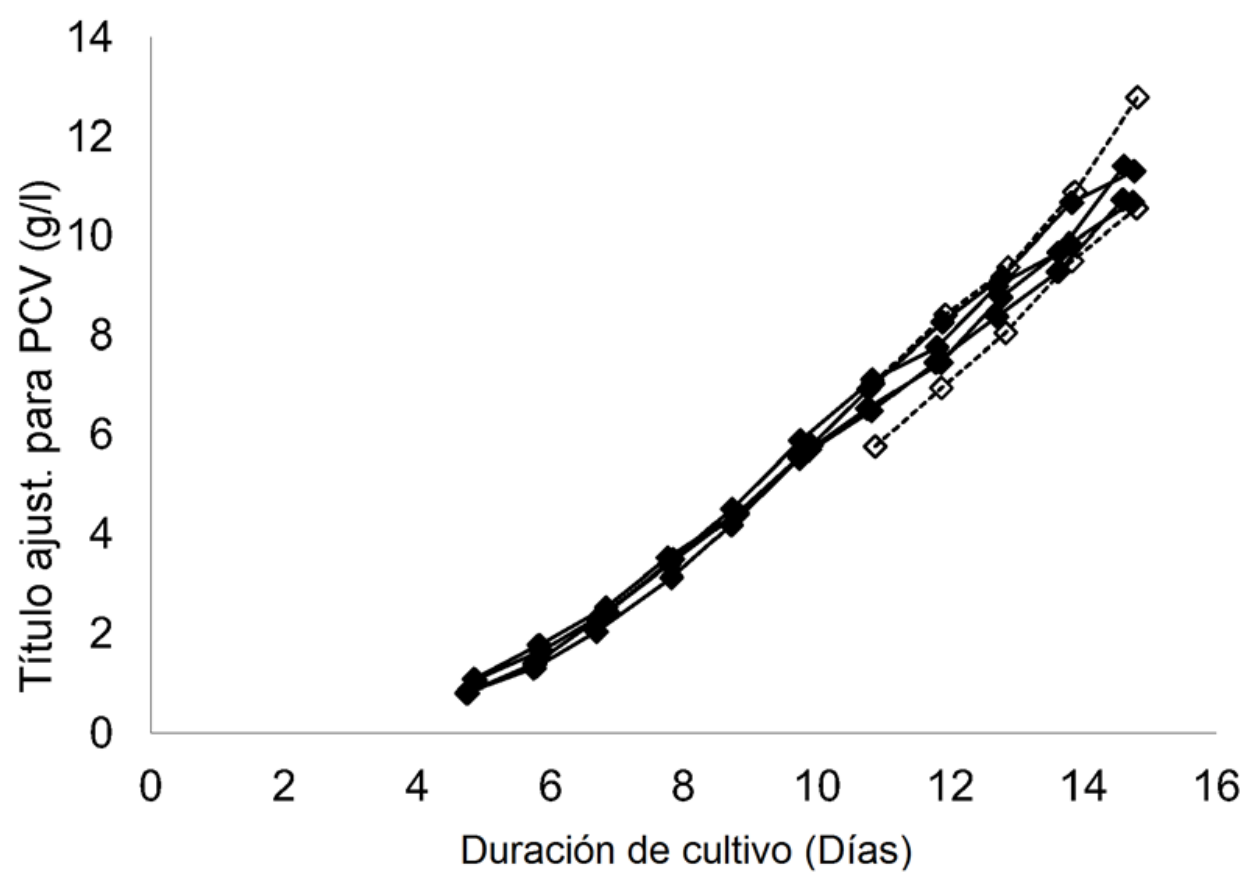


Figura 6D

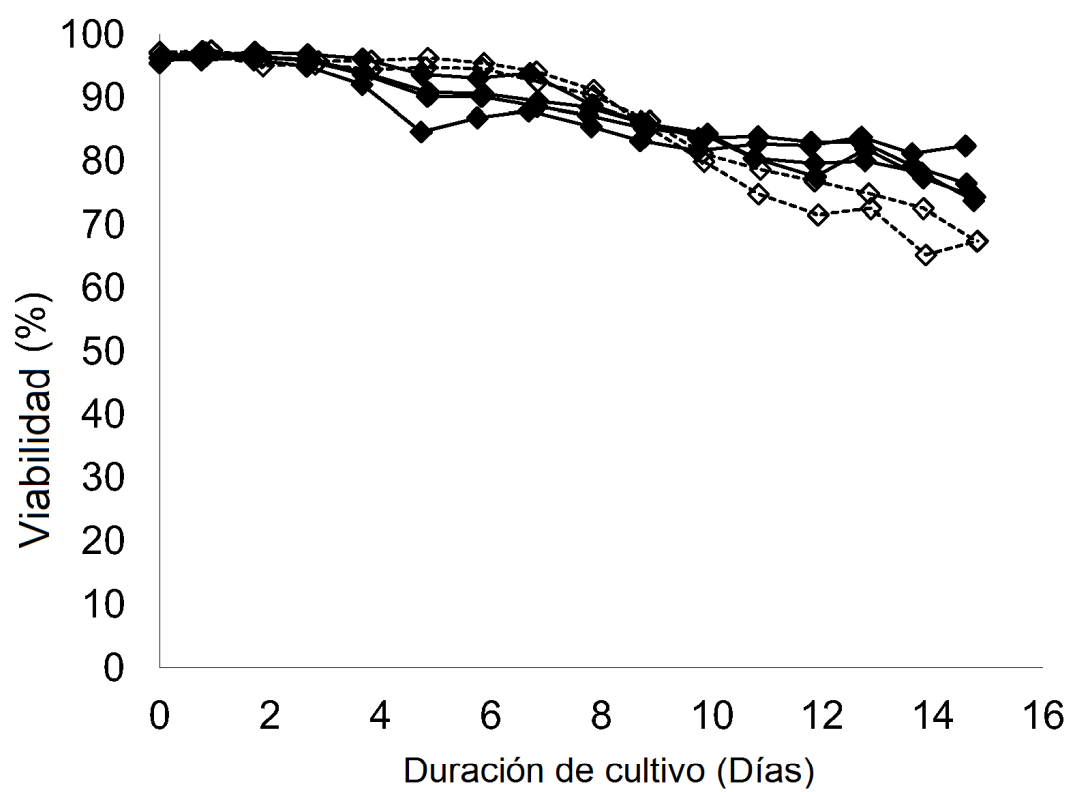


Figura 6E