

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 097**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2019** **PCT/US2019/022530**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019** **WO19178508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2019** **E 19714056 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3765846**

54 Título: **Métodos para la mejora de la viabilidad celular en un biorreactor de producción**

30 Prioridad:

16.03.2018 US 201862644339 P
20.03.2018 US 201862645755 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2025

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.00%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

WANG, JONATHAN;
SHAH, NEHA;
WALTHER, JASON;
LU, JIUYI;
JOHNSON, TIMOTHY;
REN, YUKUN y
MCLARTY, JEAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 009 097 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la mejora de la viabilidad celular en un biorreactor de producción

5 **Campo técnico**

Esta divulgación está relacionada con los métodos de mejora de la viabilidad celular en un biorreactor de producción y los campos de la biotecnología y la biología celular.

10 **Antecedentes**

La intensificación de procesos proporciona muchas ventajas para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes. Una de las estrategias para la intensificación de procesos es mantener altas densidades celulares para mejorar la producción de proteínas recombinantes, lo que requiere además una alta demanda de oxígeno. La inyección de oxígeno en un biorreactor de producción conduce a la formación de espuma en el biorreactor de producción. La formación de espuma a menudo ocurre tanto en procesos intensificados de lotes alimentados como en procesos de perfusión. Por lo tanto, los agentes antiespumantes generalmente se añaden en estos procesos. Sin embargo, la adición y acumulación de agentes antiespumantes puede hacer que las células se vuelvan sensibles al cizallamiento, lo que lleva a un aumento de la muerte celular.

Ma et al (Biotechnol. Prog. 2004, 20, 1183-1191) investigaron el efecto de Pluronic F-68 en el cultivo celular sobre el daño celular en dependencia de la concentración de PF-68 y la concentración de células a granel.

En otros documentos anteriores del estado de la técnica se divulgan investigaciones similares utilizando el sensibilizador anifoam C, un agente antiespumante a base de polidimetilsiloxano (Schroeder et al; Biotechnology and Bioengineering, volumen 92, número 7, 30 de diciembre de 2005, páginas 920 a 933; US2016177361A1). Q7-2587, un agente antiespumante de simeticona (Hesse et al; Biotechnol. Prog. 2003, 19, 833-843; US2013131634A1).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un modelo para caracterizar las condiciones aceptables de cultivo celular en un biorreactor de producción entre varios parámetros de cultivo celular, por ejemplo, cizallamiento, componentes de medios y aditivos, y concentración de antiespumante.

35 **RESUMEN**

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas y se basa en la enseñanza general, incluyendo los diversos aspectos descritos a continuación.

40 **ANTECEDENTES TÉCNICOS**

La presente invención se basa, por ejemplo, en el descubrimiento de que los métodos actualmente reivindicados que utilizan datos obtenidos en un recipiente de cultivo de ensayo (por ejemplo, un matraz de agitación con deflectores) pueden utilizarse para predecir con precisión el efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción, seleccionar con precisión una condición que sea óptima para la viabilidad celular en un biorreactor de producción, predecir la viabilidad celular en un biorreactor de producción, e identificar con precisión un conjunto de condiciones que puedan utilizarse para cultivar una célula en un biorreactor de producción.

En un aspecto, la divulgación se relaciona con los métodos de predecir el efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción. Los métodos implican (a) determinación de la viabilidad celular en una pluralidad de condiciones de ensayo en un recipiente de cultivo de ensayo, en donde la pluralidad de condiciones de ensayo se define mediante un conjunto de parámetros, en donde la pluralidad de condiciones de ensayo se selecciona sobre la base de un cribado factorial completo y/o un diseño compuesto de centro inscrito; y (b) sobre la base de la viabilidad celular en el recipiente de cultivo de ensayo en la pluralidad de condiciones, predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción.

En algunas realizaciones, el conjunto de parámetros comprende la tensión de cizallamiento, la concentración del sensibilizador y la concentración de un protector.

En algunas realizaciones, el sensibilizador es un agente antiespumante.

En algunas realizaciones, el antiespumante es un antiespumante a base de polidimetilsiloxano, o simeticona.

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo tiene un volumen de alrededor de 5 mL a alrededor de 5 L, o tiene un volumen de alrededor de 10 mL a alrededor de 500 mL. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores.

5 En algunas realizaciones, el biorreactor de producción tiene un volumen de alrededor de 5 L a alrededor de 20.000 L, o tiene un volumen de alrededor de 50 L a alrededor de 10.000 L. En algunas realizaciones, el biorreactor de producción es un biorreactor de perfusión o un biorreactor alimentado por lotes.

10 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que tendrá una tasa de muerte celular específica de menos del 40 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

15 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que tendrá una tasa de muerte celular específica de menos del 20 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

20 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que dará lugar a una producción de LDH específica de la célula de menos de 150 nU/célula/día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que dará lugar a una producción de LDH específica de la célula de menos de 100 nU/célula/día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

25 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que dará lugar a una tasa de crecimiento aparente superior al 1 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

30 En algunas realizaciones, los métodos comprenden además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que dará lugar a una tasa de crecimiento aparente superior al 5 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

En algunas realizaciones, la célula contiene un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica recombinante.

35 En algunas realizaciones, la célula es una bacteria, una levadura o una célula de mamíferos.

En algunas realizaciones, la viabilidad celular se determina mediante medición de una concentración de ácido láctico deshidrogenasa (LDH) en el recipiente de cultivo de ensayo.

40 En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores y la pluralidad de condiciones de ensayo comprende una o más de:

(a) una agitación rotatoria de alrededor de 125 RPM a alrededor de 400 RPM;

45 (b) una concentración del sensibilizador de alrededor de 0 ppm a alrededor de 5000 ppm; y

(c) una concentración de un protector que es alrededor de 1 g/L a alrededor de 10 g/L.

50 En algunas realizaciones, el protector es un poloxámero, una poloxamina o un poliol plurónico.

En algunas realizaciones, el poloxámero es poloxámero-188, poloxámero-401, poloxámero-402 o poloxámero-407.

En algunas realizaciones, la poloxamina es poloxamina-904 o poloxamina-908.

55 En otro aspecto, la divulgación está relacionada con métodos para mejorar la viabilidad celular en un biorreactor de producción. Los métodos implican

60 (a) determinación de la viabilidad celular en una pluralidad de condiciones de ensayo en un recipiente de cultivo de ensayo, en donde la pluralidad de condiciones se define mediante un conjunto de parámetros, en donde la pluralidad de condiciones de ensayo se selecciona sobre la base de un cribado factorial completo y/o un diseño compuesto de centro inscrito;

65 (b) sobre la base de la viabilidad celular en el recipiente de cultivo de ensayo en la pluralidad de condiciones, selección de una condición que sea óptima para la viabilidad celular en un biorreactor de producción; y

(c) cultivo de una célula en el biorreactor de producción en la condición seleccionada.

En algunas realizaciones, el conjunto de parámetros comprende la tensión de cizallamiento, la concentración de un sensibilizador y la concentración de un protector.

En algunas realizaciones, el sensibilizador es un agente antiespumante. En algunas realizaciones, el antiespumante es un antiespumante a base de polidimetilsiloxano o simeticona.

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo tiene un volumen de alrededor de 5 mL a alrededor de 5 L.

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo tiene un volumen de alrededor de 10 mL a alrededor de 500 mL. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores.

En algunas realizaciones, el biorreactor de producción tiene un volumen de alrededor de 5 L a alrededor de 20.000 L. En algunas realizaciones, el biorreactor de producción tiene un volumen de alrededor de 50 L a alrededor de 10.000 L. En algunas realizaciones, el biorreactor de producción es un biorreactor de perfusión o un biorreactor alimentado por lotes.

En algunas realizaciones, el paso (c) da lugar a una tasa específica de muerte celular de menos del 40 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones, el paso (c) da lugar a una tasa específica de muerte celular de menos del 20 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones, el paso (c) da como resultado una producción de LDH específica de la célula de menos de 150 nU/célula/día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones, el paso (c) da como resultado una producción de LDH específica de la célula de menos de 100 nU/célula/día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones, el paso (c) da lugar a una tasa de crecimiento aparente superior al 1 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. En algunas realizaciones, el paso (c) da lugar a una tasa de crecimiento aparente superior al 5 % por día durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

En algunas realizaciones, la célula contiene un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica recombinante.

En algunas realizaciones, la célula es una bacteria, una levadura o una célula de mamíferos. En algunas realizaciones, la viabilidad celular se determina mediante medición de una concentración de ácido láctico deshidrogenasa (LDH) en el recipiente de cultivo de ensayo.

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores y la pluralidad de condiciones de ensayo comprende una o más de:

(a) una agitación rotatoria de alrededor de 125 RPM a alrededor de 400 RPM;

(b) una concentración de un sensibilizador de alrededor de 0 ppm a alrededor de 5000 ppm; y

(c) una concentración de un protector que es alrededor de 1 g/L a alrededor de 10 g/L.

En algunas realizaciones, el protector es un poloxámero, una poloxamina o un poliol plurónico. En algunas realizaciones, el poloxámero es poloxámero-188, poloxámero-401, poloxámero-402 o poloxámero-407. En algunas realizaciones, la poloxamina es poloxamina-904 o poloxamina-908.

Como se usa en este documento, la palabra "un" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo particular. Por ejemplo, la frase "una célula" representa "una o más células".

El término "protector" significa un agente que disminuye la sensibilidad de una célula (por ejemplo, la sensibilidad de una célula de mamífero) a la tensión de cizallamiento durante el cultivo en un recipiente (por ejemplo, un recipiente de cultivo de ensayo o un biorreactor de producción). Algunos ejemplos no limitantes de protectores incluyen, por ejemplo, poloxámeros (por ejemplo, poloxámero-188, poloxámero-401, poloxámero-402 y poloxámero-407), poloxaminas (por ejemplo, poloxamina-904 o poloxamina-908) y polioles plurónicos. Ejemplos adicionales de protectores se describen aquí y se conocen en la técnica.

El término "sensibilizador" significa un agente que se añade y/o está presente en un medio de cultivo líquido de un cultivo de células (por ejemplo, un cultivo celular de mamíferos) que aumenta la sensibilidad de las células a la tensión de cizallamiento durante el cultivo en un recipiente (por ejemplo, un recipiente de cultivo de ensayo o un biorreactor de producción). Ejemplos no limitantes de sensibilizadores incluyen antiespumante (por ejemplo, un antiespumante a base de polidimetilsiloxano o simeticona). Ejemplos adicionales de sensibilizadores se describen aquí y se conocen en la técnica.

El término "célula de mamífero" significa cualquier célula procedente o derivada de cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca o un conejo). Por ejemplo, una célula de mamífero puede ser una célula inmortalizada. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula diferenciada. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula indiferenciada. En este documento se describen ejemplos no limitantes de células de mamífero. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de células de mamífero.

La expresión "cultivo" o "cultivo celular" significa el mantenimiento o proliferación de una célula de mamífero en un conjunto controlado de condiciones físicas.

El término "cultivo de células" o "cultivo celular" significa un medio de cultivo líquido que contiene una pluralidad de células que se mantiene o prolifera bajo un conjunto controlado de condiciones físicas.

El término "medio de cultivo líquido" significa un fluido que contiene suficientes nutrientes para permitir que una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) crezca o prolifere in vitro. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido puede contener uno o más de: aminoácidos (por ejemplo, 20 aminoácidos), una purina (por ejemplo, hipoxantina), una pirimidina (por ejemplo, timidina), colina, inositol, tiamina, ácido fólico, biotina, calcio, niacinamida, piridoxina, riboflavina, timidina, cianocobalamina, piruvato, ácido lipoico, magnesio, glucosa, sodio, potasio, hierro, cobre, zinc y bicarbonato de sodio. En algunas realizaciones, un medio de cultivo líquido puede contener suero de un mamífero. En algunas realizaciones, un medio de cultivo líquido no contiene suero u otro extracto de un mamífero (un medio de cultivo líquido definido). En algunas realizaciones, un medio de cultivo líquido puede contener oligoelementos, una hormona de crecimiento de mamíferos y/o un factor de crecimiento de mamíferos. Otro ejemplo de medio de cultivo líquido es el medio mínimo (por ejemplo, un medio que contiene solo sales inorgánicas, una fuente de carbono y agua). En este documento se describen ejemplos no limitantes de medio de cultivo líquido. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de medio de cultivo líquido y están disponibles en el mercado. Un medio de cultivo líquido puede contener cualquier densidad de células de mamíferos. Por ejemplo, como se usa en este documento, un volumen de medio de cultivo líquido retirado de un biorreactor puede estar sustancialmente libre de células de mamífero.

El término "medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animales" significa un medio de cultivo líquido que no contiene ningún componente (por ejemplo, proteínas o suero) derivado de un mamífero.

El término "medio de cultivo líquido libre de suero" significa un medio de cultivo líquido que no contiene suero de mamíferos.

El término "medio de cultivo líquido que contiene suero" significa un medio de cultivo líquido que contiene un suero de mamíferos.

La expresión "medio de cultivo líquido químicamente definido" es una expresión de la técnica y significa un medio de cultivo líquido en que todos los componentes químicos son conocidos. Por ejemplo, un medio de cultivo líquido químicamente definido no contiene suero fetal bovino, albúmina sérica bovina o albúmina sérica humana, ya que estas preparaciones suelen contener una mezcla compleja de albúminas y lípidos.

El término "medio de cultivo líquido libre de proteínas" significa un medio de cultivo líquido que no contiene ninguna proteína (por ejemplo, ninguna proteína detectable).

El término "biorreactor de perfusión" significa un biorreactor que contiene una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamíferos) en un primer medio de cultivo líquido, en donde el cultivo de las células presentes en el biorreactor incluye la eliminación periódica o continua del primer medio de cultivo líquido y al mismo tiempo o poco después añadiendo sustancialmente el mismo volumen de un segundo medio de cultivo líquido al biorreactor. En algunos ejemplos, el segundo medio de cultivo líquido puede ser el mismo que el primer medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos, hay un cambio incremental (por ejemplo, aumento o disminución) en el volumen del primer medio de cultivo el líquido retirado y añadido a lo largo de periodos incrementales (por ejemplo, un periodo de alrededor de 24 horas, un periodo entre alrededor de 1 minuto y alrededor de 24 horas o un periodo mayor que 24 horas) durante el periodo de cultivo (por ejemplo, la tasa de realimentación de medio de cultivo sobre una base diaria). La fracción de medio retirado y remplazado cada día puede variar dependiendo de las células particulares que se estén cultivando, la densidad de siembra inicial y la densidad celular en un momento particular. "RV" o "volumen de reactor" significa el volumen del medio de cultivo presente al inicio del proceso de cultivo (por ejemplo, el volumen total del medio de cultivo presente después de la siembra).

El término "biorreactor alimentado por lotes" es un término de la técnica y significa un biorreactor que contiene una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamíferos) en un primer medio de cultivo líquido, en donde el cultivo de las células presentes en el biorreactor incluye la adición periódica o continua de un segundo medio de cultivo líquido al primer medio de cultivo líquido sin la eliminación sustancial o significativa del primer medio de cultivo líquido o segundo medio de cultivo líquido del cultivo celular. El segundo medio de cultivo líquido puede ser el mismo que el primer medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos de cultivo alimentado por lotes, el segundo

medio de cultivo líquido es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos de cultivo alimentado por lotes, el segundo medio de cultivo líquido se añade como un polvo seco. En algunos ejemplos de cultivo alimentado por lotes, el segundo medio de cultivo líquido es una formulación completamente diferente en comparación con el primer medio de cultivo líquido.

El término "biorreactor concentrado alimentado por lotes" es un término de la técnica y significa un biorreactor que contiene una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamíferos) en un primer medio de cultivo líquido, en donde el cultivo de las células presentes en el biorreactor incluye la adición periódica o continua de un segundo medio de cultivo líquido al primer medio de cultivo líquido con la eliminación sustancial o significativa del primer medio de cultivo líquido o segundo medio de cultivo líquido del cultivo celular sin la eliminación del producto del biorreactor. El segundo medio de cultivo líquido puede ser el mismo que el primer medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos de cultivo concentrado alimentado por lotes, el segundo medio de cultivo líquido es una forma concentrada del primer medio de cultivo líquido. En algunos ejemplos de cultivo concentrado alimentado por lotes, el segundo medio de cultivo líquido se añade como polvo seco. En algunos ejemplos de cultivo concentrado alimentado por lotes, el segundo medio de cultivo líquido es una formulación completamente diferente del primer medio de cultivo líquido.

"Agitación rotatoria" es un término bien conocido en la técnica y se refiere al movimiento de un matraz de agitación de una manera generalmente circular, por ejemplo, en el sentido de las agujas del reloj o en el sentido contrario a las agujas del reloj, con el fin de, por ejemplo, aumentar la concentración de O₂ disuelto en un medio de cultivo líquido contenido en el mismo. La agitación se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, un instrumento que mueve el matraz de agitación en un movimiento circular o elipsoidal, como un agitador rotatorio. Los dispositivos ejemplares que se pueden utilizar para realizar la agitación rotatoria se describen en el presente documento.

Ejemplos adicionales de tales dispositivos también se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente.

El término "matraz de agitación" se refiere a un recipiente (por ejemplo, un recipiente estéril) que puede contener un volumen de medio de cultivo líquido que tiene al menos una superficie permeable al gas (por ejemplo, un extremo que tiene en un elemento permeable al gas, por ejemplo, una membrana, que también puede actuar como una barrera estéril) y/o al menos una tapa de ventilación, y al menos una parte de su forma es aproximadamente frustocónica. Por ejemplo, un matraz de agitación puede ser un matraz de agitación con deflectores o un matraz Erlenmeyer, o cualquier versión modificada del mismo reconocida por la técnica.

El término "biorreactor de producción" es un término de la técnica y significa un biorreactor a gran escala (por ejemplo, que tiene un volumen interno superior a 5 L, 1.000 L, 5.000 L, 10.000 L, 20.000 L, 50.000 L, o 100.000 L). Por ejemplo, un biorreactor de producción puede ser un biorreactor de perfusión.

El término "recipiente de cultivo de ensayo" es un término de la técnica y significa un biorreactor a pequeña escala (por ejemplo, en relación con un biorreactor de producción) que tiene un volumen de alrededor de 2 mL a alrededor de 500 mL. En algunos ejemplos, la relación altura y anchura del recipiente de cultivo de ensayo corresponde a aproximadamente la relación altura y anchura del biorreactor de producción en los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación (por ejemplo, un matraz de agitación con deflectores). Ejemplos adicionales de un recipiente de cultivo de ensayo se describen aquí y se conocen en la técnica.

El término "cultivo por lotes" es un término de la técnica y significa un recipiente (por ejemplo, biorreactor) que contiene una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamíferos) en un medio de cultivo líquido, en donde el cultivo de las células presentes en el recipiente (por ejemplo, biorreactor) no incluye la adición de una cantidad sustancial o significativa de medio de cultivo líquido fresco al cultivo celular y no incluye la eliminación de una cantidad sustancial o significativa de medio de cultivo líquido del cultivo celular durante el cultivo.

El término "cultivo alimentado por lotes" es un término de la técnica y significa un recipiente (por ejemplo, un biorreactor de producción) que incluye una pluralidad de células (por ejemplo, células de mamíferos) en un medio de cultivo líquido, en donde el cultivo de las células presentes en el recipiente (por ejemplo, biorreactor de producción) incluye la adición periódica o continua de medio de cultivo líquido fresco al vaso sin la eliminación sustancial o significativa del medio de cultivo líquido del vaso durante el cultivo. El medio de cultivo líquido fresco puede ser el mismo que el medio de cultivo líquido presente en el recipiente al inicio del cultivo. En algunos ejemplos de cultivo alimentado por lotes, el medio de cultivo líquido fresco es una forma concentrada del medio de cultivo líquido presente en el recipiente al inicio del cultivo. En algunos ejemplos de cultivos alimentados por lotes, el medio de cultivo fresco se añade como polvo seco. En algunos ejemplos de cultivo alimentado por lotes, el medio de cultivo fresco es una formulación completamente diferente en comparación con el medio de cultivo líquido presente en el recipiente al inicio del cultivo.

Los métodos descritos en el presente documento ofrecen varias ventajas. Por ejemplo, puede alinear diferentes escalas, predecir Δ parámetros y optimizar el espacio de diseño existente. También puede aumentar la

previsibilidad/alineación del rendimiento a través de escalas, crear modelos a pequeña escala más representativos, aumentar la robustez del proceso, mejorar la tolerancia al cizallamiento para la intensificación del proceso y proporcionar orientación sobre la adición de sensibilizadores y protectores en diferentes perfiles de cizallamiento (FIG. 12).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen en el presente documento para su uso en la presente invención; también se pueden utilizar otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama que muestra cómo las burbujas en un medio de cultivo celular pueden causar la muerte celular.

La FIG. 2 es un diagrama que ilustra la adición de antiespumante (un sensibilizador ejemplar) puede mover las condiciones de funcionamiento fuera del espacio de operación aceptable.

La FIG. 3 es un diagrama que muestra la relación entre la producción específica de lactato deshidrogenasa (LDH) y la tasa de muerte celular.

La FIG. 4 es un diagrama que muestra la relación entre protectores, sensibilizadores y agitación rotatoria, y el impacto de protectores, sensibilizadores y agitación en la producción específica de LDH en un cultivo celular.

La FIG. 5 es un diagrama que muestra que la producción específica de LDH es una consecuencia de la concentración del sensibilizador, la concentración del protector y la agitación rotatoria (tensión de cizallamiento).

La FIG. 6 muestra un diseño factorial completo para los tres parámetros seleccionados: concentración de sensibilizador, concentración de protector y agitación rotatoria (tensión de cizallamiento). El panel superior muestra el diseño factorial completo (2^3), donde la respuesta es la producción específica de LDH (tasa de muerte) y los factores son cizallamiento, concentración de protector y concentración de sensibilizador. El panel central muestra que el fallo dio lugar a un valor extremo, hay un amplio rango entre el punto de fallo frente al resto de los datos, el punto de fallo es difícil de modelizar, y el valor extremo está excluido (región inoperable). El panel inferior muestra que los puntos centrales se predicen deficientemente (indicación de la curvatura, la respuesta probablemente no es lineal, y el aumento de RPM no se escala linealmente).

La FIG. 7 es un diagrama que muestra el diseño factorial completo combinado con el diseño compuesto de centro inscrito para los parámetros seleccionados de concentración de sensibilizador, concentración de protector y agitación rotatoria (tensión de cizallamiento).

La FIG. 8 es un diagrama que muestra las ventajas del diseño factorial completo combinado con el diseño compuesto de centro inscrito.

La FIG. 9 es un diagrama que ilustra que los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para identificar la región de rendimiento deficiente (sombreado claro) y la región de fallo de operación (sombreado oscuro).

La FIG. 10 es un diagrama que ilustra los métodos de normalización de la tensión de cizallamiento a través de la producción específica de LDH y los métodos de predicción de los efectos de los cambios de parámetros (Δ parámetro).

La FIG. 11 es un diagrama que ilustra cómo los modelos descritos en el presente documento pueden ser utilizados para optimizar las condiciones de funcionamiento de un biorreactor de producción. Los datos muestran que la condición de funcionamiento (rectángulo con cuadrados rellenos) funciona actualmente, pero puede optimizarse aún más (rectángulo sombreado claro a la derecha de la flecha grande) (por ejemplo, aumentar el rango de concentración de la tolerancia del sensibilizador en el proceso y mejorar la resiliencia a la espuma del recipiente).

La FIG. 12 enumera las capacidades y utilidades de los modelos descritos en el presente documento. El modelo es capaz de alinear diferentes escalas, predecir cambios en los parámetros y optimizar los

espacios de diseño existentes. El modelo también prevé un aumento en la previsibilidad/alineación del rendimiento a través de escalas (por ejemplo, crear modelos más representativos a pequeña escala y aumentar la comprensión del cizallamiento a través de la escala sobre las metodologías tradicionales). El modelo también prevé una mayor robustez del proceso (por ejemplo, una mayor tolerancia al cizallamiento para la intensificación del proceso y una mejor orientación sobre la concentración de sensibilizador y la concentración de adición de protector en diferentes perfiles de cizallamiento).

La FIG. 13A es un gráfico que compara los valores de producción de LDH específicos observados en los recipientes de sobremesa probados con los valores de producción de LDH específicos previstos.

La FIG. 13B representa datos del experimento descrito en el Ejemplo 2.

La FIG. 13C enumera los valores de producción de LDH específicos observados con los valores previstos.

La FIG. 14 compara los efectos observados de los antiespumantes en la producción específica de LDH y los efectos previstos de los antiespumantes en la producción específica de LDH.

La FIG. 15A es un gráfico que compara los valores específicos de producción de LDH observados en los biorreactores de producción probados con los valores previstos.

La FIG. 15B enumera los valores específicos de producción de LDH observados en los biorreactores de producción probados con los valores previstos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta divulgación se refiere a los métodos de optimización de la intensificación del proceso para la producción de proteínas o polipéptidos. En un aspecto, la divulgación está relacionada con un modelo de recipiente de cultivo de ensayo a pequeña escala (por ejemplo, matraz de agitación con deflectores) que puede caracterizar un espacio de operación definido por varios parámetros de operación, por ejemplo, concentración de protector (por ejemplo, poloxámero-188), sensibilizador (por ejemplo, antiespumante), tensión de cizallamiento (por ejemplo, velocidad de agitación o velocidad de inyección de oxígeno), componentes de medios y aditivos, pH y tiempo, etc. En particular, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para predecir el efecto de estos parámetros de operación sobre el crecimiento y la viabilidad del cultivo celular en un biorreactor de producción. Se han utilizado enfoques ortogonales para correlacionar la tensión de cizallamiento entre modelos a pequeña escala y a mayor escala, y el espacio de operación previsto ha sido validado por los datos a escala de sobremesa y a escala de producción.

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan métodos de predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción. Los aspectos no limitantes de estos métodos se describen en el presente documento, y pueden combinarse sin limitación.

Intensificación del proceso

La intensificación del proceso se refiere a mejoras en la fabricación y el procesamiento mediante la optimización de los esquemas de operación existentes para que el proceso de fabricación pueda ser más preciso y más eficiente. Estas mejoras pueden traer varias ventajas, por ejemplo, aumentar la biomasa, mejorar la productividad volumétrica, optimizar la utilización de la capacidad de las instalaciones, reducir el coste de los bienes, mantener o mejorar la consistencia de la calidad del producto, reducir la huella de las instalaciones y/o reducir las operaciones de las unidades. A nivel molecular, la intensificación del proceso también puede implicar mejorar la mezcla, mejorar la cinética de la reacción y/o aumentar los rendimientos y la especificidad.

La presente divulgación está relacionada con la intensificación del proceso para la producción de proteínas o polipéptidos (por ejemplo, proteínas terapéuticas recombinantes, proteínas recombinantes o polipéptidos recombinantes). Una estrategia para aumentar la producción terapéutica recombinante de proteínas o polipéptidos es aumentar las densidades celulares. Las altas densidades celulares suelen requerir un alto consumo de oxígeno, y la inyección de oxígeno requerida frecuentemente conduce a problemas de formación de espuma (*es decir*, burbujas). Como se muestra en la FIG. 1, las burbujas pueden conducir a la muerte celular, por ejemplo, a través del contacto de la célula-burbuja, la adhesión célula burbuja, o la fuerza letal de la ruptura de la burbuja. La Fórmula 1 muestra la relación entre la tasa de muerte celular, la aireación volumétrica y el tamaño de la burbuja.

$$\text{Tasa de muerte} \propto \frac{(\text{Aireación volumétrica})}{(\text{Tamaño de burbuja})^2} \quad (\text{Fórmula 1})$$

Por lo tanto, los agentes antiespumantes a menudo se añaden al proceso de cultivo celular. Sin embargo, la adición y/o acumulación de agentes antiespumantes puede causar un impacto negativo en el rendimiento del cultivo celular (por ejemplo, el rendimiento del cultivo celular de mamíferos). En algunos casos, la adición y la acumulación de agentes antiespumantes puede conducir a un aumento de la tasa de muerte celular, particularmente a escala de producción (escala de biorreactores de producción). Por lo tanto, es importante evaluar los efectos de los parámetros de operación o los cambios en estos parámetros de operación (por ejemplo, agentes antiespumantes u otros parámetros) a escala de producción (escala de biorreactores de producción).

Sensibilizadores, agitación y protectores

Debido a que es prohibitivamente costoso probar los efectos de varios parámetros de operación a escala de producción (escala de biorreactores de producción), los experimentos piloto generalmente se realizan en recipientes de cultivo de ensayo (por ejemplo, matraces de agitación, fermentadores de laboratorio o fermentadores piloto) en primer lugar. Estos recipientes de cultivo de ensayo se pueden operar para probar los efectos de diversos parámetros, por ejemplo, agitación, concentración de sensibilizador, concentración de protector, temperatura, pH, composición de nutrientes, carga de biomasa y estrategia de alimentación a pequeña escala, y correlacionan los efectos observados con los efectos a escala de producción (escala de biorreactores de producción). En muchos métodos tradicionales, la potencia/volumen (P/V), el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (kLa), la velocidad de la punta, el tiempo de mezcla, la modelización de la dinámica de fluidos computacional (CFD) se utilizan a menudo para correlacionar los resultados en recipientes de cultivo de ensayo con los efectos a escala de producción (escala de biorreactor de producción).

Entre estos diversos parámetros, la concentración de sensibilizador es especialmente difícil de escalar. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en este documento, un sensibilizador puede ser un agente antiespumante (por ejemplo, simeticona, emulsión de simeticona, o un aceite a base de polidimetilsiloxano (PDMS)). Se puede encontrar una descripción de los agentes antiespumantes, por ejemplo, en Brečević et al. "Mechanism of antifoaming action of simethicone," J. Appl. Toxicol. 14(3):207-211, 1994; y Bergeron, et al. "Polydimethylsiloxane (PDMS)-based antifoams," Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 122(1-3):103-120, 1997.

Otros ejemplos de sensibilizadores incluyen, por ejemplo, sensibilizadores a base de aceite orgánico, sensibilizadores a base de aceite de silicona y sensibilizadores mixtos de mezcla líquido-sólida/emulsionados (por ejemplo, sílice pirogénica, antiespumantes combinados de aceite). Un sensibilizador puede ser un agente de control de espuma de silicona, por ejemplo, compuesto antiespumante XIAMETER® ACP-0100, compuesto antiespumante XIAMETER® ACP-1500, emulsión antiespumante XIAMETER® AFE-1510, emulsión antiespumante XIAMETER® AFE-1520, emulsión antiespumante XIAMETER® AFE-1530, compuesto antiespumante XIAMETER® ACP-1400, emulsión antiespumante XIAMETER® AFE-0700, antiespumante en polvo XIAMETER® ACP-1920, y fluido de silicona XIAMETER® PMX-200. Otros ejemplos de sensibilizadores incluyen la emulsión Dow Corning® antifoam C, Antifoam 204 (Sigma Aldrich), Antifoam A (Sigma Aldrich), emulsión Antifoam B (Sigma Aldrich), emulsión Antifoam C (Sigma Aldrich), emulsión Antifoam Y-30 (Sigma Aldrich), Antifoam O-30 (Sigma Aldrich), y Antifoam SE-15 (Sigma Aldrich). Un ejemplo no limitante de un sensibilizador orgánico de polipropileno a base de poliéter no silicona es antifoam 204. Un ejemplo no limitante de una emulsión de simeticona es Antifoam EX-Cell. Ejemplos no limitantes de antiespumantes mixtos sólidos-líquidos incluyen aceite de silicona (PDMS), compuesto A, CA modificada (MCA), emulsión A (EA) y análogo de EA (AEA) descritos en Marinova et al., Langmuir 17:2426-2436, 2001. Ejemplos no limitantes de antiespumantes a base de polidimetilsiloxano (PMSA) se describen en Bergeron et al., Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 122:103-120, 1997.

En la técnica se conocen ejemplos adicionales de sensibilizadores. Véase, por ejemplo, Rashmika et al., Biotechnol. Prog. 34(1):262-270, 2018.

Algunos otros parámetros, por ejemplo, deflectores, tamaño del matraz, agitación, también tienen un impacto en la sensibilidad de la célula al cizallamiento. Debido a las interacciones con otros parámetros, estos parámetros sensibilizadores (por ejemplo, la concentración de un agente antiespumante) tienen frecuentemente una relación no lineal en el proceso de escalado y no están relacionados geoméricamente a través de diferentes escalas. Por lo tanto, los modelos tradicionales suelen ser impotentes en términos de predicción de los efectos de los parámetros sensibilizadores a escala de producción.

Lo que hace que la predicción sea aún más desafiante es que el parámetro sensibilizador puede cambiar en todo el periodo de producción. Por ejemplo, durante el proceso de producción (por ejemplo, el cultivo de una célula en un biorreactor de producción), la densidad celular aumenta, y se requiere una mayor inyección de oxígeno. Por lo tanto, se requieren más agentes antiespumantes y se añaden al biorreactor de producción. La mayor concentración de agentes antiespumantes hace que las células sean aún más sensibles al esfuerzo de cizallamiento, y mueve la condición de funcionamiento rápidamente fuera del espacio de operación aceptable (FIG. 2).

Además, los protectores pueden proteger las células del aumento de la tensión de cizallamiento y se añaden frecuentemente al medio de cultivo líquido. El aumento de la concentración de protector puede ser necesario para

mitigar los impactos negativos de los sensibilizadores, pero la interacción de los protectores con otros parámetros hace difícil determinar la cantidad exacta de protector que se necesita. Algunos protectores comunes incluyen, por ejemplo, poloxámero, poloxamina y/o poliol plurónico. En algunas realizaciones, el protector es un poloxámero (por ejemplo, poloxámero-188, poloxámero-401, poloxámero-402 o poloxámero-407). En algunas otras realizaciones, el protector es una poloxamina (por ejemplo, poloxamina-904 o poloxamina-908). En algunas realizaciones adicionales, el protector es un poliol plurónico (por ejemplo, L-61, L-121, P-103, P-123, P-84, P-104, P-65, P-105, L-35, F-127, F-38, F-68, o F-108) o un poliol plurónico inverso (por ejemplo, 25 R-2, 25 R-4, 25 R-5, 25 R-8, 10 R-5, o 10 R-8). Una descripción detallada de protectores ejemplares se puede encontrar, por ejemplo, en Moghimi et al., "Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine," Trends in Biotechnology 18(10):412-420, 2000; Murhammer et al., "Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors," Biotechnology Progress 6(2):142-148, 1990; Murhammer, "Pluronic polyols, cell protection," Encyclopedia of Bioprocess Technology (1999).

Modelización basada en Diseño Factorial y Diseño Compuesto de Centro

La divulgación proporciona métodos de modelización para capturar los efectos (por ejemplo, viabilidad celular, tasa de muerte celular, producción de proteínas terapéuticas recombinantes, o rendimiento) de diversos parámetros de operación, por ejemplo, protectores (componente de medios/aditivo, por ejemplo, plurónico), sensibilizadores (por ejemplo, agentes antiespumantes) y esfuerzo de cizallamiento (agitación) con el fin de optimizar los reactores a cualquier escala en función de los resultados de los modelos de recipientes de cultivo de ensayo.

Aquí se proporcionan métodos de predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción. Los métodos implican determinar la viabilidad celular bajo una pluralidad de condiciones de ensayo en un recipiente de cultivo de ensayo, donde la pluralidad de condiciones de ensayo se define por un conjunto de parámetros, en los que la pluralidad de condiciones de ensayo se selecciona sobre la base de un cribado factorial completo y/o diseño compuesto de centro inscrito; y sobre la base de la viabilidad celular en el recipiente de cultivo de ensayo bajo la pluralidad de condiciones, predecir el efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción.

El recipiente de cultivo de ensayo puede ser un tubo de centrifugación (por ejemplo, tubo de centrifugación con deflectores), un matraz (por ejemplo, un matraz de agitación con un volumen de alrededor de 3 L) (por ejemplo, un matraz de agitación con deflectores), un fermentador de laboratorio automático (Ambr 15 y Amber 250 de Sartorius), un fermentador de laboratorio o un fermentador piloto. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo puede tener un volumen de menos de 5 L, menos de 3 L, menos de 1 L, menos de 500 ml o menos de 100 ml (por ejemplo, menos de 1 L, o de 50 ml a 500 ml). En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo tiene un volumen (un volumen interior) de alrededor de 5 mL a alrededor de 5 L (por ejemplo, alrededor de 10 mL a alrededor de 500 mL, o alrededor de 2,5 L a alrededor de 3,5 L). Por ejemplo, un recipiente de cultivo de ensayo puede tener un volumen (un volumen interior) de alrededor de 5 mL a alrededor de 5 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 4,5 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 4,0 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 5 mL a alrededor de 900 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 800 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 700 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 600 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 500 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 450 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 400 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 350 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 300 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 250 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 200 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 150 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 100 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 80 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 60 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 50 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 40 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 30 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 25 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 20 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 15 mL, alrededor de 5 mL a alrededor de 10 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 5 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 4,5 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 4,0 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 10 mL a alrededor de 900 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 800 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 700 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 600 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 500 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 450 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 400 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 350 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 300 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 250 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 200 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 150 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 100 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 80 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 60 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 50 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 40 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 30 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 25 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 20 mL, alrededor de 10 mL a alrededor de 15 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 5 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 4,5 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 4,0 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 15 mL a alrededor de 900 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 800 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 700 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 600 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 500 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 450 mL, alrededor de 15 mL a alrededor de 400 mL,

[illegible]

[illegible]

de 4,0 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 600 mL a alrededor de 900 mL, alrededor de 600 mL a alrededor de 800 mL, alrededor de 600 mL a alrededor de 700 mL, alrededor de 700 mL a alrededor de 5 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 4,5 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 4,0 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 700 mL a alrededor de 900 mL, alrededor de 700 mL a alrededor de 800 mL, alrededor de 800 mL a alrededor de 5 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 4,5 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 4,0 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 800 mL a alrededor de 900 mL, alrededor de 900 mL a alrededor de 5 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 4,5 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 4,0 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 3,5 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 3,0 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 2,5 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 2 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 1,5 L, alrededor de 900 mL a alrededor de 1 L, alrededor de 1 L a alrededor de 5 L, alrededor de 1 L a alrededor de 4,5 L, alrededor de 1 L a alrededor de 4,0 L, alrededor de 1 L a alrededor de 3,5 L, alrededor de 1 L a alrededor de 3,0 L, alrededor de 1 L a alrededor de 2,5 L, alrededor de 1 L a alrededor de 2 L, alrededor de 1 L a alrededor de 1,5 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 5 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 4,5 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 4,0 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 3,5 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 3,0 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 2,5 L, alrededor de 1,5 L a alrededor de 2 L, alrededor de 2 L a alrededor de 5 L, alrededor de 2 L a alrededor de 4,5 L, alrededor de 2 L a alrededor de 4,0 L, alrededor de 2 L a alrededor de 3,5 L, alrededor de 2 L a alrededor de 3,0 L, alrededor de 2 L a alrededor de 2,5 L, alrededor de 2,5 L a alrededor de 5 L, alrededor de 2,5 L a alrededor de 4,5 L, alrededor de 2,5 L a alrededor de 4,0 L, alrededor de 2,5 L a alrededor de 3,5 L, alrededor de 2,5 L a alrededor de 3,0 L, alrededor de 3,0 L a alrededor de 5 L, alrededor de 3,0 L a alrededor de 4,5 L, alrededor de 3,0 L a alrededor de 4,0 L, alrededor de 3,0 L a alrededor de 3,5 L, alrededor de 3,5 L a alrededor de 5 L, alrededor de 3,5 L a alrededor de 4,5 L, alrededor de 3,5 L a alrededor de 4,0 L, alrededor de 4,0 L a alrededor de 5 L, alrededor de 4,0 L a alrededor de 4,5 L, o alrededor de 4,5 L a alrededor de 5,0 L. En algunas realizaciones, la relación de la altura respecto a la anchura del recipiente de cultivo de ensayo es aproximadamente la misma que el radio de la altura respecto a la anchura del biorreactor de producción.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación, por ejemplo, un matraz de agitación con deflectores. Un matraz de agitación puede tener un volumen, por ejemplo, de alrededor de 250 mL a alrededor de 300 mL, alrededor de 300 mL a alrededor de 400 mL, o alrededor de 400 mL a aproximadamente 500 mL. El matraz de agitación puede incluir al menos una superficie permeable al gas (por ejemplo, al menos una superficie con una membrana permeable al gas que también puede actuar como una barrera estéril) y/o al menos una tapa ventilada. Un matraz de agitación puede tener en su superficie exterior una estructura que permita que el matraz de agitación se coloque de forma estable en una incubadora de cultivo tisular (por ejemplo, una incubadora rotatoria).

La superficie interior de un matraz de agitación puede tener al menos un revestimiento (por ejemplo, al menos un revestimiento de gelatina, colágeno, poli-L-ornitina, poliestireno y laminina). Los matraces de agitación ejemplares que se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento se pueden adquirir en Corning Inc. (Tewsbury, MA), Presens (Brøndby, Dinamarca), Nalge-Nunc International (Rochester, NY). Los matraces de agitación ejemplares incluyen matraces de agitación con deflectores o matraces de Erlenmeyer, o cualquier versión modificada reconocida por la técnica de los mismos. Otros ejemplos de matraces de agitación (por ejemplo, diferentes formas y dimensiones de matraces de agitación) y revestimientos de la superficie interior de matraces de agitación se conocen en la técnica y se pueden utilizar en los métodos actuales.

[illegible]

En algunas realizaciones, la agitación rotatoria del recipiente de cultivo de ensayo puede realizarse utilizando una incubadora rotatoria con un diámetro de tiro (órbita) de entre alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo puede tener una concentración de un sensibilizador de alrededor de 0 ppm a alrededor de 5.000 ppm (por ejemplo, alrededor de 0 ppm a alrededor de 120 ppm, alrededor de 30 ppm a alrededor de 120 ppm, o alrededor de 50 ppm a alrededor de 100 ppm). En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo puede tener una concentración de sensibilizador (por ejemplo, un antiespumante, por ejemplo, cualquiera de los antiespumantes descritos en el presente documento) de 0 ppm a alrededor de 200 ppm, 0 ppm a alrededor de 190 ppm, 0 ppm a alrededor de 180 ppm, 0 ppm a alrededor de 170 ppm, 0 ppm a alrededor de 160 ppm, 0 ppm a alrededor de 150 ppm, 0 ppm a alrededor de 140 ppm, 0 ppm a alrededor de 130 ppm, 0 ppm a alrededor de 120 ppm, 0 ppm a alrededor de 110 ppm, 0 ppm a alrededor de 100 ppm, 0 ppm, a alrededor de 90 ppm, 0 ppm a alrededor de 80 ppm, 0 ppm a alrededor de 70 ppm, 0 ppm a alrededor de 60 ppm, 0 ppm a alrededor de 50 ppm, 0 ppm a alrededor de 40 ppm, 0 ppm a alrededor de 30 ppm, 0 ppm a alrededor de 20 ppm, 0 ppm a alrededor de 10 ppm, alrededor de 10 ppm a alrededor de 200 ppm, alrededor de 10 ppm a alrededor de 190 ppm, alrededor de 10 ppm a alrededor de 180 ppm, alrededor de 10 ppm a alrededor de 170 ppm, alrededor de 10 ppm a alrededor de 160 ppm, alrededor de 10 ppm a alrededor de 150 ppm, alrededor de 10

[illegible]

de 140 ppm, alrededor de 140 ppm a alrededor de 200 ppm, alrededor de 140 ppm a alrededor de 190 ppm, alrededor de 140 ppm a alrededor de 180 ppm, alrededor de 140 ppm a alrededor de 170 ppm, alrededor de 140 ppm a alrededor de 160 ppm, alrededor de 140 ppm a alrededor de 150 ppm, alrededor de 150 ppm a alrededor de 200 ppm, alrededor de 150 ppm a alrededor de 190 ppm, alrededor de 150 ppm a alrededor de 180 ppm, alrededor de 150 ppm a alrededor de 170 ppm, alrededor de 150 ppm a alrededor de 160 ppm, alrededor de 160 ppm a alrededor de 200 ppm, alrededor de 160 ppm a alrededor de 190 ppm, alrededor de 160 ppm a alrededor de 180 ppm, alrededor de 160 ppm a alrededor de 170 ppm, alrededor de 170 ppm a alrededor de 200 ppm, alrededor de 170 ppm a alrededor de 190 ppm, alrededor de 170 ppm a alrededor de 180 ppm, alrededor de 180 ppm a alrededor de 200 ppm, alrededor de 180 ppm a alrededor de 190 ppm, o alrededor de 190 ppm a alrededor de 200 ppm (donde el sensibilizador está presente en un medio de cultivo líquido dispuesto en el recipiente de cultivo de ensayo, por ejemplo, un periodo de tiempo durante el cultivo).

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

alrededor de 10,0 g/L, alrededor de 7,0 g/L a alrededor de 9,5 g/L, alrededor de 7,0 g/L a alrededor de 9,0 g/L, alrededor de 7,0 g/L a alrededor de 8,5 g/L, alrededor de 7,0 g/L a alrededor de 8,0 g/L, alrededor de 7,0 g/L a alrededor de 7,5 g/L, alrededor de 7,5 g/L a alrededor de 10,0 g/L, alrededor de 7,5 g/L a alrededor de 9,5 g/L, alrededor de 7,5 g/L a alrededor de 9,0 g/L, alrededor de 7,5 g/L a alrededor de 8,5 g/L, alrededor de 7,5 g/L a alrededor de 8,0 g/L, alrededor de 8,0 g/L a alrededor de 10,0 g/L, alrededor de 8,0 g/L a alrededor de 9,5 g/L, alrededor de 8,0 g/L a alrededor de 9,0 g/L, alrededor de 8,0 g/L a alrededor de 8,5 g/L, alrededor de 8,5 g/L a alrededor de 10,0 g/L, alrededor de 8,5 g/L a alrededor de 9,5 g/L, alrededor de 8,5 g/L a alrededor de 9,0 g/L, alrededor de 9,0 g/L a alrededor de 10,0 g/L, alrededor de 9,0 g/L a alrededor de 9,5 g/L, o alrededor de 9,5 g/L a alrededor de 10,0 g/L (donde el protector está presente en un medio de cultivo líquido dispuesto en el recipiente de cultivo de ensayo, por ejemplo, un período de tiempo durante el cultivo).

[illegible]

[illegible]

ES 3 009 097 T3

[illegible]

ES 3 009 097 T3

[illegible]

ES 3 009 097 T3

[illegible]

L, alrededor de 10.000 L a alrededor de 12.000 L, alrededor de 12.000 L a alrededor de 20.000 L, alrededor de 12.000 L a alrededor de 18.000 L, alrededor de 12.000 L a alrededor de 16.000 L, alrededor de 12.000 L a alrededor de 14.000 L, alrededor de 14.000 L a alrededor de 20.000 L, alrededor de 14.000 L a alrededor de 18.000 L, alrededor de 14.000 L a alrededor de 16.000 L, alrededor de 16.000 L a alrededor de 20.000 L, alrededor de 16.000 L a alrededor de 18.000 L, o alrededor de 18.000 L a alrededor de 20.000 L.

En algunas realizaciones, los parámetros de operación pueden ser cualquier parámetro que esté relacionado con la viabilidad celular o la muerte celular (por ejemplo, tensión de cizallamiento, concentración de un sensibilizador, concentración de un protector, temperatura, pH, composición de nutrientes, carga de biomasa y estrategia de alimentación). La viabilidad celular o la tasa de muerte celular se puede medir utilizando células que pueden expresar lactato deshidrogenasa (LDH). Cuando la célula que puede expresar LDH muere, la LDH en la célula se libera en el medio de cultivo líquido. Por lo tanto, la viabilidad celular o la tasa de muerte celular se puede medir ortogonalmente con LDH, y es proporcional a la producción específica de LDH (sLDHp) (FIG. 3).

La FIG. 4 muestra cómo el plurónico (por ejemplo, los protectores), el sensibilizador y el cizallamiento (por ejemplo, la agitación) pueden afectar la producción específica de LDH. Como se muestra en la FIG. 4, los protectores pueden disminuir la unión de la célula-burbuja y aumentar la durabilidad de la célula, manteniendo así la alta viabilidad celular y protegiendo las células de la muerte. En contraste, los sensibilizadores pueden aumentar los accesorios de burbujas celulares y disminuir la durabilidad celular, disminuyendo así la viabilidad celular. Como estos parámetros están interconectados entre sí, a menudo es muy difícil predecir los efectos exactos de sensibilizadores, agitación y/o protectores por los modelos tradicionales.

La FIG. 5 muestra que la producción específica de LDH en el modelo a pequeña escala es una función de la concentración de sensibilizador, concentración de protector y agitación. Debido a la interacción entre los parámetros, la producción específica de LDH generalmente no tiene una relación lineal con ninguno de estos parámetros. Los efectos de estos parámetros sobre la producción específica de LDH están determinados por un diseño factorial completo.

El diseño factorial implica realizar experimentos bajo un conjunto de condiciones, y las condiciones están definidas por un conjunto de parámetros (por ejemplo, parámetros de operación). En el conjunto de condiciones, cada parámetro puede tener dos o más niveles. El propósito del diseño factorial es estudiar los efectos principales y los efectos de interacción entre diferentes parámetros (por ejemplo, concentración de sensibilizador, concentración de protector y agitación). El término "diseño factorial completo" se refiere a un diseño de experimento que incluye todas las combinaciones posibles de diferentes niveles en todos los parámetros. Por ejemplo, con tres parámetros (es decir, factores) cada uno tomando dos niveles, un diseño factorial completo tendrá 8 combinaciones en total, y generalmente se llama un diseño factorial 2^3 (FIG. 6). Por el contrario, el término "diseños factoriales fraccionales" se refiere a los diseños experimentales que consisten en un subconjunto cuidadosamente elegido (fracción) de las series experimentales de un diseño factorial completo. El subconjunto se elige para explotar el principio de escasez de efectos para exponer información sobre las características más importantes del problema estudiado, mientras se utiliza una fracción del esfuerzo de un diseño factorial completo en términos de ejecuciones experimentales y recursos. Al realizar un diseño factorial, se puede identificar la región inoperable (por ejemplo, la combinación de valores de parámetros que hacen que la operación falle). El diseño factorial es conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, en Box, G. E.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery* (2ª ed.). Wiley. ISBN 0-471-71813-0; Vicente, Gemma, et al. "Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production." *Industrial crops and products* 8.1 (1998): 29-35; Vandervoort, Jo y Annick Ludwig. "Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study." *International journal of pharmaceutics* 238.1-2 (2002): 77-92.

En un diseño factorial típico, los puntos centrales (por ejemplo, las regiones de interés) a menudo se prevén deficientemente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el diseño factorial se puede utilizar en combinación con el diseño compuesto de centro inscrito (FIG. 7). Un diseño compuesto de centro es un diseño experimental que contiene un diseño factorial o fraccional incrustado con puntos centrales que se aumenta con un grupo de puntos axiales que permiten estimar la curvatura. El diseño compuesto es conocido en la técnica, y una descripción detallada con respecto al diseño compuesto central se puede encontrar, por ejemplo, en Box, G. E.; Hunter, W. G.; HUNTER, J. S. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery* (2ª ed.). Wiley. ISBN 0-471-71813-0; Ahmadi, M., et al. "Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation." *Journal of Hazardous Materials* 123.1-3 (2005): 187-195.

Mediante combinación de cribado factorial completo y diseño compuesto de centro, las condiciones de ensayo seleccionadas pueden maximizar las regiones de interés y minimizar las regiones de fallo potencial (FIG. 8 y FIG. 9).

Los resultados del experimento de estas condiciones de ensayo en recipientes de cultivo de ensayo proporcionan un contorno estimado que ilustra la relación entre los parámetros seleccionados. Una vez que se ha determinado el contorno del modelo a pequeña escala, el modelo a pequeña escala se puede utilizar para predecir los valores

que faltan. Por ejemplo, con el conocimiento de la concentración de antiespumante o tensión de corte, puede predecir cuánto plurónico se requiere para las operaciones. Esta relación se determina mediante la correlación de la tasa de crecimiento celular y las tasas de muerte a través de diferentes escalas (por ejemplo, pequeña escala, sobremesa, producción, etc.).

En algunas realizaciones, el contorno estimado del modelo a pequeña escala se puede utilizar para coincidir con los puntos de datos recopilados a una escala diferente (por ejemplo, la escala de producción). Debido a que se conoce la concentración de sensibilizador y protectores, es posible determinar la tensión de cizallamiento en el modelo a pequeña escala que corresponde a la tensión de cizallamiento en el biorreactor de producción a partir del contorno (FIG. 10). Basado en la tensión de cizallamiento que corresponde al esfuerzo de cizallamiento en el biorreactor de producción y la concentración de sensibilizador, el efecto del cambio de concentración del protector ($\Delta[\text{Protector}]$) se puede determinar a partir del contorno estimado (FIG. 11). Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 11, el punto extremo izquierdo (círculo), el punto central izquierdo (círculo), el punto central derecho (círculo), y el punto extremo derecho (círculo) tienen en su totalidad la misma tensión de cizallamiento y concentración de sensibilizador. La región sombreada es un espacio inoperable. Mediante aumento de la concentración de protector (desde el punto central derecho (círculo) hasta el extremo derecho (círculo), con una flecha representada entre estos dos puntos), se puede aumentar el rango aceptable de concentración del sensibilizador, lo que lleva a una mejor resistencia al sensibilizador.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el modelo descrito en el presente documento puede ser utilizado para determinar efectos interactivos entre diferentes parámetros. Los modelos tradicionales suelen estudiar el efecto de cada parámetro individualmente. Los modelos descritos en el presente documento pueden estudiar los efectos de tres parámetros a la vez en lugar del efecto de cada parámetro individualmente. Por lo tanto, este modelo descrito aquí puede predecir dónde será el rendimiento esperado del cultivo celular si se cambia cualquier parámetro individual.

Además, esos parámetros tradicionales de escalado no proporcionan generalmente predicciones de rendimiento de cultivos celulares. El modelo descrito en el presente documento puede predecir un rango operativo con una mejor orientación, lo que conduce a una menor probabilidad de fallo cuando se mueve a una escala de producción, y proporciona la capacidad de escalar una vez que se han cumplido otros parámetros tradicionales (P/V, velocidad de punta, tiempo de mezcla, K_LA).

En algunas otras realizaciones, los modelos descritos en el presente documento se pueden utilizar para establecer un espacio de diseño operativo para reactores a cualquier escala dado cualquier parámetro individual o combinación de parámetros (por ejemplo, plurónico, antiespumante y cizallamiento). El modelo se puede utilizar para determinar la cantidad máxima de agentes antiespumantes que el cultivo celular puede tolerar antes del fallo para una condición de cizallamiento dada.

En algunas realizaciones, el modelo se puede utilizar para determinar la cantidad máxima de agentes antiespumantes que la concentración de plurónico puede sostener antes de perder su eficacia para una condición de cizallamiento dada.

En algunas realizaciones, el modelo se puede utilizar para probar diferentes tipos de agentes antiespumantes (antifoam C, antiespumante esterilizado en autoclave, antiespumantes irradiados, etc.) contra diferentes plurónicos.

En algunas realizaciones, el modelo puede ser independiente del rango de densidad celular, y no necesita aplicarse solo a cultivos de perfusión intensificados, ya que utiliza LDH para normalizarse a través de escalas.

En algunas realizaciones, el modelo también puede probar concentraciones de antiespumante ya sea con adición absoluta (bolo de 1 vez al principio) o adición diaria.

En algunas realizaciones, el modelo se puede utilizar para probar la cinética detrás de la desactivación de antiespumante y su impacto en el cultivo celular.

Células

Los métodos proporcionados en el presente documento se pueden utilizar para cultivar una variedad de células diferentes (por ejemplo, células de mamíferos, células bacterianas y células de levadura).

Ejemplos no limitantes de células bacterianas incluyen *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium acetobutylicum*. Las células bacterianas ejemplares disponibles en el mercado que se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen BL21(DE3) (Novagen), BL21(DE3)-pLysS (Novagen), BL21 Star-pLysS (Invitrogen), BL21-SI (Invitrogen), BL21-AI (Invitrogen), Tuner (Novagen), Tuner pLysS (Novagen), Origami (Novagen), Origami D (Novagen), Origami B pLysS (Novagen), Rosetta (Novagen), Rosetta pLysS (Novagen), Rosetta-gami-pLysS (Novagen), BL21 CodonPlus (Stratagene), AD494 (Novagen), BL21trxB (Novagen), HMS174 (Novagen), NovaBlue (DE3) (Novagen), BLR (Novagen),

C41(DE3) (Lucigen), C43(DE3) (Lucigen), Lemo21(DE3) (New England BioLabs), SHuffle T7 (New England BioLabs), ArticExpress (Agilent Technologies), y Artic Express (DE3) (Agilent Technologies).

Ejemplos no limitantes de células de levadura incluyen: *S. cerevisiae*, *S. exiguus* y *Pichia pastoris*. Otros ejemplos de células de levadura que pueden ser utilizados en cualquiera de los métodos descritos en este documento incluyen aquellos de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, y *Yarrowia*. Ejemplos adicionales de células de levadura que se pueden utilizar en cualquiera de los métodos descritos en este documento se describen en Nielsen, *Methods in Enzymology* 536:133-147, 2014.

Ejemplos no limitantes de células de mamíferos que se pueden cultivar utilizando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen: Células del ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células CHO DG44, células CHO-K1s y células CHO-DXB11), Sp2.0, células de mieloma (por ejemplo, NS/0), células B, células de hibridoma, células T, células renales embrionarias humanas (HEK) (por ejemplo, HEK 293E y HEK 293F), células epiteliales renales de mono verde africano (Vero) y células epiteliales renales de Madin-Darby Canine (Cocker Spaniel) (MDCK). Células de mamíferos adicionales que se pueden cultivar utilizando los métodos descritos en el presente se conocen en la técnica. En ejemplos no limitantes de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de células de mamífero presentes en un recipiente de cultivo de ensayo y/o un biorreactor de producción al comienzo del cultivo es alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL (por ejemplo, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,1 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,2 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,3 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $0,8 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de $1,0 \times 10^6$ células/mL a alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL, alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de $1,5 \times 10^6$ células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor

de 1.5×10^6 células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de 1.5×10^6 células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de 1.5×10^6 células/mL a alrededor de 2×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de 2×10^6 células/mL a alrededor de 3×10^6 células/mL, alrededor de 3×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de 3×10^6 células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de 3×10^6 células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de 3×10^6 células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de 3×10^6 células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de 3×10^6 células/mL a alrededor de 4×10^6 células/mL, alrededor de 4×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de 4×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de 4×10^6 células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de 4×10^6 células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de 4×10^6 células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de 4×10^6 células/mL a alrededor de 5×10^6 células/mL, alrededor de 5×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de 5×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de 5×10^6 células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de 5×10^6 células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de 5×10^6 células/mL a alrededor de 6×10^6 células/mL, alrededor de 6×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de 6×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de 6×10^6 células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de 6×10^6 células/mL a alrededor de 7×10^6 células/mL, alrededor de 7×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de 7×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, alrededor de 7×10^6 células/mL a alrededor de 8×10^6 células/mL, alrededor de 8×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL, alrededor de 8×10^6 células/mL a alrededor de 9×10^6 células/mL, o alrededor de 9×10^6 células/mL a alrededor de 10×10^6 células/mL).

La célula (por ejemplo, la célula de mamífero) puede contener un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma de la célula) que codifica una proteína terapéutica recombinante (por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante que es secretada por la célula). Ejemplos no limitantes de proteínas terapéuticas recombinantes se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

Proteínas terapéuticas recombinantes

Una proteína terapéutica recombinante puede ser una proteína secretada que es liberada por la célula (por ejemplo, la célula de mamíferos) en el medio de cultivo líquido del cultivo celular. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante soluble puede contener una secuencia que codifica un péptido de señal de secreción en el término N o C de la proteína recombinante, que es dividida por una enzima presente en la célula (por ejemplo, célula de mamífero), y posteriormente liberada en el medio de cultivo líquido del cultivo celular. En otros casos, la proteína recombinante es una proteína soluble que no se secreta, y la proteína recombinante se recupera desde dentro de la célula (por ejemplo, la célula de mamíferos).

Ejemplos no limitantes de proteínas recombinantes incluyen inmunoglobulinas (incluyendo inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, cualquiera de los fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento), enzimas (por ejemplo, una galactosidasa (por ejemplo, una alfa-galactosidasa), Miozyme o Cerezyme), proteínas (por ejemplo, eritropoyetina humana, factor de necrosis tumoral (TNF), o un interferón alfa o beta), o proteínas inmunogénicas o antigénicas o fragmentos de proteínas (por ejemplo, proteínas para su uso en una vacuna). En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un polipéptido de unión a antígenos diseñado que contiene al menos un armazón multifuncional de proteínas recombinantes (véase, por ejemplo, las proteínas de unión a antígenos recombinantes descritas en Gebauer et al., Current Opin. Chem. Biol. 13:245-255, 2009; y la Publicación de Solicitud de Patente de los EE. UU. Nº 2012/0164066). Ejemplos no limitantes de proteínas recombinantes que son anticuerpos incluyen: panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatomomab, apolizumab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, biciromab, canakinumab, cetuximab, daclizumab, densusab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, ertumaxomab, etaracizumab, golimumab, infliximab, natalizumab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, y trastuzumab. Ejemplos adicionales de anticuerpos terapéuticos se conocen en la técnica. Otros ejemplos no limitantes de proteínas recombinantes incluyen: alglucosidasa alfa, laronidasa, abatacept, galsulfase, lutropina alfa, factor antihemofílico, agalsidasa beta, interferón beta-1a, darbepoyetina alfa, tenecteplasa, etanercept, factor IX de coagulación, hormona foliculoestimulante, interferón beta-1a, imiglicerasa, domasa alfa, epoyetina alfa y alteplasa.

Una proteína recombinante secretada y soluble puede recuperarse del medio de cultivo líquido. En la técnica se conoce una diversidad de diferentes métodos para retirar el medio de cultivo líquido de las células (por ejemplo, células de mamífero) incluyendo, por ejemplo, centrifugación, filtración, pipeteo y/o aspiración. La proteína recombinante secretada puede ser recuperada y purificada posteriormente del medio de cultivo líquido utilizando una variedad de técnicas bioquímicas incluyendo varios tipos de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de

afinidad, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de intercambio aniónico) y/o filtración (por ejemplo, filtración de corte de peso molecular).

Para recuperar una proteína recombinante intracelular, la célula (por ejemplo, la célula de mamíferos) puede ser lisada. Una amplia variedad de métodos para lisar células (por ejemplo, células de mamíferos) se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, sonicación y/o detergente, enzimática, y/o lisis química. Una proteína recombinante se puede purificar a partir de un lisado celular (por ejemplo, un lisado celular de mamíferos) utilizando una variedad de métodos bioquímicos conocidos en la técnica, típicamente comenzando con un paso de centrifugación para eliminar los desechos celulares, y a continuación uno o más pasos adicionales (por ejemplo, uno o más tipos de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de intercambio aniónico) y/o filtración (por ejemplo filtración de corte de peso molecular).

En algunas realizaciones, la proteína recombinante recuperada es al menos 50 % pura en peso, por ejemplo, al menos 55 % pura en peso, al menos 60 % pura en peso, al menos 65 % pura en peso, al menos 70 % pura en peso, al menos 75 % pura en peso, al menos 80 % pura en peso, al menos 85 % pura en peso, al menos 90 % pura en peso, al menos 95 % pura en peso, al menos 96 % pura en peso, al menos 97 % pura en peso, al menos 98 % pura en peso, o al menos o alrededor del 99 % pura en peso, o más del 99 % pura en peso.

En algunas realizaciones, la proteína recombinante recuperada es una proteína terapéutica humana recombinante que tiene una o más propiedades biofísicas diferentes en comparación con la misma proteína nativa en un humano (por ejemplo, diferencias en el tipo o cantidad de glicosilación, diferencias en la fosforilación, diferencias en la acilación, diferencias en la metalación o estequiometría metálica, y/o diferencias en la unión de cofactores).

En el presente documento también se proporciona una proteína terapéutica recombinante producida por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Medios de Cultivo Líquidos

Los medios de cultivo líquidos son conocidos en la técnica. El medio de cultivo líquido se puede complementar con un suero de mamíferos (por ejemplo, suero fetal de ternera y suero bovino), y/o una hormona de crecimiento o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico). Alternativamente o además, el medio de cultivo líquido puede ser un medio de cultivo líquido definido químicamente, un medio de cultivo líquido libre de componentes derivados de animales, un medio de cultivo líquido libre de suero o un medio de cultivo líquido que contiene suero. Ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos químicamente definidos, medios de cultivo líquidos libres de componentes de origen animal, medios de cultivo líquidos libres de suero y medios de cultivo líquidos que contienen suero están disponibles en el mercado.

Un medio de cultivo líquido contiene típicamente una fuente de energía (por ejemplo, un carbohidrato, como glucosa), aminoácidos esenciales (por ejemplo, el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína), vitaminas y/u otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones, ácidos grasos libres y/u oligoelementos. Si se desea, el medio de cultivo líquido puede complementarse con, por ejemplo, una hormona o factor de crecimiento de mamífero (por ejemplo, insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales y tampones (por ejemplo, sales de calcio, magnesio y fosfato), nucleósidos y bases (por ejemplo, adenosina, timidina e hipoxantina), hidrolizados proteicos y tisulares, y/o cualquier combinación de estos u otros aditivos.

Ejemplos no limitantes de medios de cultivo líquidos que son particularmente útiles en los métodos descritos en la actualidad incluyen, por ejemplo, CD CHO, Opti CHO y Forti CHO (todos disponibles en Life Technologies; Grand Island, NY), Hycell CHO MEDIUM (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), Ex-cell CD CHO Fusion MEDIUM (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO) y PowerCHO MEDIUM (Lonza Group, Ltd.; Basilea, Suiza). Los componentes del medio que también pueden ser útiles en los métodos actuales incluyen, entre otros, hidrolizados definidos químicamente (CD), por ejemplo, peptona de CD, polipéptidos de CD (dos o más aminoácidos) y factores de crecimiento de CD. En la técnica se conocen ejemplos adicionales de medio de cultivo tisular líquido y componentes del medio.

Cultivo de perfusión

El cultivo de una célula se puede realizar utilizando el cultivo de perfusión. El cultivo de una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) en un recipiente incluye la extracción del recipiente de un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido (por ejemplo, que contiene cualquier concentración de células de mamífero, por ejemplo, un primer volumen de un primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células), y la adición al primer medio de cultivo líquido de un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido. La eliminación y adición pueden realizarse simultánea o secuencialmente, o una combinación de los dos. Además, la eliminación y adición se pueden realizar continuamente (por ejemplo a una tasa que elimina y reemplaza un volumen de entre 0,1 % a 800 % (por ejemplo, entre 1 % y 700 %, entre 1 % y 600 %, entre 1 % y 500 %, entre 1 % y 400 %, entre 1 % y 350 %, entre 1 % y 300 %, entre 1 % y 250 %, entre 1 % y 100 %, entre 100 % y 200 %, entre 5 % y 150 %, entre 10 % y 50 %, entre 15 % y 40 %, entre 8 % y 80 %, y entre 4 % y 30 %) del volumen del recipiente del primer

volumen de medio de cultivo líquido o cualquier periodo de tiempo dado (por ejemplo por encima de un periodo de 24 horas, por encima de un periodo de tiempo incremental de alrededor de 1 hora a alrededor de 24 horas, o por encima de un periodo de tiempo incremental mayor que 24 horas)) o periódicamente (por ejemplo, una vez cada tres días, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día o cinco veces al día), o cualquier combinación de los mismos. Cuando se realiza periódicamente, el volumen que se retira o reemplaza (por ejemplo, dentro de un periodo de 24 horas aproximadamente, dentro de un periodo de tiempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, o dentro de un periodo de tiempo incremental mayor que 24 horas) puede ser, por ejemplo, entre 0,1 % y 800 % (por ejemplo, entre 1 % y 700 %, entre 1 % y 600 %, entre 1 % y 500 %, entre 1 % y 400 %, entre 1 % y 300 %, entre 1 % y 200 %, entre 1 % y 100 %, entre 100 % y 200 %, entre 5 % y 150 %, entre 10 % y 50 %, entre 15 % y 40 %, entre 8 % y 80 %, y entre 4 % y 30 %) del volumen del recipiente o del primer volumen de medio de cultivo líquido. El primer volumen del primer medio de cultivo líquido retirado y el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido pueden mantenerse, en algunos casos, aproximadamente iguales durante cada periodo de 24 horas (o, como alternativa, un periodo de tiempo gradual de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas o un periodo de tiempo gradual mayor que 24 horas) durante la totalidad o parte del periodo de cultivo. Como se conoce en la técnica, la tasa (volumen/unidad de tiempo) a la que se retira el primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la tasa (volumen/unidad de tiempo) a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido pueden variarse. La tasa (volumen/unidad de tiempo) a la que se retira el primer volumen del primer medio de cultivo líquido y la tasa (volumen/unidad de tiempo) a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido pueden ser aproximadamente iguales o pueden ser diferentes.

Como alternativa, el volumen retirado y añadido pueden cambiar (por ejemplo, aumentar gradualmente) durante cada periodo de 24 horas (o como alternativa, un periodo de tiempo gradual entre 1 hora y aproximadamente 24 horas o un periodo de tiempo gradual mayor que 24 horas) durante el periodo de cultivo. Por ejemplo, el volumen del primer medio de cultivo líquido retirado y el volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido dentro de cada periodo de 24 horas (o alternativamente, un periodo de tiempo incremental de entre alrededor de 1 hora y más de 24 horas o un periodo de tiempo incremental mayor que 24 horas) durante el periodo de cultivo puede ser aumentado (por ejemplo, gradualmente o a través de incrementos escalonados) durante el periodo de cultivo de un volumen que está entre 0,5 % y alrededor de 20 % del volumen del recipiente o el primer volumen de medio de cultivo líquido a aproximadamente 25 % a aproximadamente 150 % de volumen del recipiente o el primer volumen de medio de cultivo líquido.

Los expertos en la materia apreciarán que el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser el mismo tipo de medio. En otros casos, el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser diferentes.

El primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede eliminarse, por ejemplo, mediante un sistema mecánico que puede eliminar el primer volumen del primer medio de cultivo líquido del recipiente (por ejemplo, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células del biorreactor). Como alternativa o adicionalmente, el primer volumen del primer medio de cultivo líquido puede retirarse por filtración o flujo por gravedad del primer volumen del primer medio de cultivo líquido a través de una membrana estéril con un límite de peso molecular que excluye la célula (por ejemplo, célula de mamífero).

El segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido puede añadirse al primer medio de cultivo líquido de una manera automatizada, por ejemplo, mediante bomba de perfusión.

En algunos casos, la eliminación del primer volumen del primer medio de cultivo líquido (por ejemplo, un primer volumen del primer medio de cultivo líquido que está sustancialmente libre de células de mamíferos) y la adición al primer medio de cultivo líquido de un segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido no se produce dentro de al menos 1 hora (por ejemplo, dentro de 2 horas, dentro de 3 horas, dentro de 4 horas, dentro de 5 horas, dentro de 6 horas, dentro de 7 horas, dentro de 8 horas, dentro de 9 horas, dentro de 10 horas, dentro de 12 horas, dentro de 14 horas, dentro de 16 horas, dentro de 18 horas, dentro de 24 horas, dentro de las 36 horas, dentro de las 48 horas, dentro de las 72 horas, dentro de las 96 horas, o después de las 96 horas) de la siembra del recipiente con una célula (por ejemplo, una célula de mamífero).

Cultivo alimentado por lotes

El cultivo de una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) se puede realizar usando el cultivo alimentado por lotes. Una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) incluye, durante la mayor parte del periodo de cultivo, la adición (por ejemplo, adición periódica o continua) a un primer medio de cultivo líquido de un segundo volumen de un segundo medio de cultivo líquido. La adición del segundo medio de cultivo líquido se puede realizar de forma continua (por ejemplo, a una tasa que añade un volumen de entre 0,1 % y 300 % (por ejemplo, entre 1 % y 250 %, entre 1 % y 100 %, entre 100 % y 200 %, entre 5 % y 150 %, entre 10 % y 50 %, entre 15 % y 40 %, entre 8 % y 80 %, y entre 4 % y 30 %) del volumen del recipiente o del primer volumen medio de cultivo líquido durante un periodo de tiempo determinado (por ejemplo, durante un periodo de 24 horas, durante un periodo de tiempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, o durante un periodo de tiempo incremental

mayor que 24 horas) o periódicamente (por ejemplo, una vez cada tres días, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, o cinco veces al día), o cualquier combinación de los mismos. Cuando se realiza periódicamente, el volumen que se añade (por ejemplo, en un periodo de alrededor de 24 horas, en un periodo de tiempo incremental de alrededor de 1 hora a alrededor de 24 horas, o en un periodo de tiempo incremental mayor que 24 horas) puede ser, por ejemplo, entre 0,1 % y 300 % (por ejemplo, entre 1 % y 200 %, entre 1 % y 100 %, entre 100 % y 200 %, entre 5 % y 150 %, entre 10 % y 50 %, entre 15 % y 40 %, entre 8 % y 80 %, y entre 4 % y 30 %) del volumen del recipiente o del primer volumen de medio de cultivo líquido. El segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido puede mantenerse, en algunos casos, aproximadamente igual durante cada periodo de 24 horas (o, como alternativa, un periodo de tiempo gradual de alrededor de 1 hora a alrededor de 24 horas o un periodo de tiempo gradual mayor que 24 horas) durante la totalidad o parte del periodo de cultivo. Como se conoce en la técnica, la tasa (volumen/unidad de tiempo) a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido puede variarse durante la totalidad o parte del periodo de cultivo. Por ejemplo, el volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido puede cambiar (por ejemplo, aumentar gradualmente) durante cada periodo de 24 horas (o como alternativa, un periodo de tiempo gradual entre 1 hora y alrededor de 24 horas o un periodo de tiempo gradual mayor que 24 horas) durante el periodo de cultivo. Por ejemplo, el volumen del segundo medio de cultivo líquido añadido dentro de cada periodo de 24 horas (o alternativamente, un periodo de tiempo incremental de entre alrededor de 1 hora y más de 24 horas o un periodo de tiempo incremental mayor que 24 horas) durante el periodo de cultivo puede ser aumentado (por ejemplo, gradualmente o a través de incrementos escalonados) durante el periodo de cultivo de un volumen que es entre 0,5 % y alrededor de 20 % del volumen del recipiente o el primer volumen de medio de cultivo líquido a alrededor de 25 % a alrededor de 150 % del volumen del recipiente o el primer volumen de medio de cultivo líquido. La tasa (volumen/unidad de tiempo) a la que se añade el segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido puede ser aproximadamente la misma durante la totalidad o parte del periodo de cultivo.

Los expertos en la materia apreciarán que el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser el mismo tipo de medio. En otros casos, el primer medio de cultivo líquido y el segundo medio de cultivo líquido pueden ser diferentes. El volumen del segundo medio de cultivo líquido puede añadirse al primer medio de cultivo líquido de una manera automatizada, por ejemplo, mediante bomba de perfusión.

En algunos casos, la adición al primer medio de cultivo líquido un segundo volumen del segundo medio de cultivo líquido no se produce en al menos 1 hora (por ejemplo, dentro de 2 horas, dentro de 3 horas, dentro de 4 horas, dentro de 5 horas, dentro de 6 horas, dentro de 7 horas, dentro de 8 horas, dentro de 9 horas, dentro de 10 horas, dentro de 12 horas, dentro de 14 horas, dentro de 16 horas, dentro de 18 horas, dentro de 24 horas, dentro de 36 horas, dentro de 48 horas, dentro de 72 horas, dentro de 96 horas, o después de 96 horas) de la siembra del recipiente con una célula (por ejemplo, una célula de mamífero). El medio de cultivo celular en cultivos alimentados por lotes se recoge típicamente al final del periodo de cultivo y se usa en cualquiera de los procesos descritos en el presente documento, sin embargo, el medio de cultivo celular en cultivos alimentados por lotes también puede recogerse en uno o más puntos temporales durante el periodo de cultivo y usarse en cualquiera de los procesos descritos en el presente documento.

Los profesionales expertos apreciarán que cualquiera de los diversos parámetros de cultivo (por ejemplo, recipientes, volúmenes, tasas o frecuencias de reemplazo de volúmenes de cultivo, frecuencias de agitación, temperaturas, medios y concentraciones de CO₂) se puede utilizar en cualquier combinación para realizar estos métodos.

Temperatura

El cultivo puede realizarse a una temperatura de 32 °C a alrededor de 39 °C, por ejemplo, de 32 °C a alrededor de 37 °C. Los profesionales expertos apreciarán que la temperatura puede cambiarse en puntos específicos del tiempo en el método de cultivo (por ejemplo, durante uno o más del primer periodo de tiempo, del segundo periodo de tiempo y del tercer periodo de tiempo), por ejemplo, sobre una base horaria o diaria. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse o desplazarse (por ejemplo, aumentar o disminuir) aproximadamente en un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, once días, doce días, catorce días, quince días, dieciséis días, diecisiete días, dieciocho días, diecinueve días, o alrededor de veinte días o más después de la siembra inicial del matraz de agitación con la célula de mamífero) o en cualquier momento dentro del primer, segundo y/o tercer periodo de tiempo descrito en el presente documento. Por ejemplo, la temperatura se puede desplazar hacia arriba (por ejemplo, un cambio de hasta o alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10,0 °C). Por ejemplo, la temperatura se puede desplazar hacia abajo (por ejemplo, un cambio de hasta o alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o 10 °C).

CO₂

El cultivo puede incluir la incubación de un cultivo celular en una atmósfera que contenga como máximo o alrededor de 1 % a 15 % de CO₂ (por ejemplo, como máximo o alrededor de 14 % CO₂, 12 % de CO₂, 10 % de CO₂, 8 % de CO₂, 6 % de CO₂, 5 % de CO₂, 4 % de CO₂, 3 % de CO₂, 2 % de CO₂, o como máximo o alrededor de 1 % de

CO₂). El cultivo puede incluir la incubación de un cultivo celular en una atmósfera humidificada (por ejemplo, al menos o alrededor de 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o al menos o alrededor de 95 % de humedad, o alrededor de 100 % de humedad).

5 Medición de viabilidad celular

En la técnica se conocen una variedad de métodos y ensayos que se pueden utilizar para determinar la viabilidad celular de un cultivo celular (por ejemplo, un cultivo celular de mamíferos). Por ejemplo, la lactato deshidrogenasa (LDH) se puede detectar en un medio de cultivo líquido de un cultivo celular. Los kits comerciales para la detección de LDH en un medio de cultivo líquido de un cultivo celular son conocidos en la técnica.

Para determinar la viabilidad celular se utiliza una variedad de diferentes colorantes que son excluidos por las células viables, pero selectivamente absorbidos por las células no viables. Ejemplos no limitantes de estos colorantes incluyen yoduro de propidio, azul de tripano y 7-aminoactinomicina D. La viabilidad de las células se determina mediante la visualización o detección de la tinción de las células después de la incubación con el colorante.

Los ensayos adicionales para determinar la viabilidad celular de un cultivo de células incluyen la detección de la actividad mitocondrial o la actividad de caspasa en las células (por ejemplo, resazurina y formazano). En la técnica se conocen métodos adicionales para determinar la viabilidad celular en un cultivo de células.

Métodos de predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción

En el presente documento se proporcionan métodos de predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador (por ejemplo, cualquiera de los sensibilizadores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica) sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción que incluyen: (a) determinación de la viabilidad celular en una pluralidad de condiciones de ensayo en un recipiente de cultivo de ensayo (por ejemplo, cualquiera de los recipientes de cultivo de ensayo descritos en el presente documento), donde la pluralidad de condiciones de ensayo se definen por un conjunto de parámetros; y (b) sobre la base de la viabilidad celular en el recipiente de cultivo de ensayo bajo la pluralidad de condiciones, predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción (por ejemplo, cualquiera de los biorreactores de producción descritos en el presente documento).

En algunas realizaciones, el conjunto de parámetros incluye, consiste o consiste esencialmente en tensión de cizallamiento, concentración del sensibilizador y concentración de un protector (por ejemplo, cualquiera de los protectores descritos en el presente documento). En algunas realizaciones de cualquiera de estos métodos, el sensibilizador es un antiespumante (por ejemplo, un antiespumante a base de polidimetilsiloxano, simeticona, o cualquier otro antiespumante descrito en el presente documento o conocido en la técnica).

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo (por ejemplo, cualquiera de los recipientes de cultivo de ensayo ejemplares descritos en el presente documento o conocidos en la técnica) tiene un volumen de alrededor de 5 mL a alrededor de 5 L (o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación, por ejemplo, un matraz de agitación con deflectores.

En algunas realizaciones, el biorreactor de producción (por ejemplo, cualquiera de los biorreactores de producción ejemplares descritos en el presente documento o conocidos en la técnica) tiene un volumen de alrededor de 5 L a alrededor de 20.000 L (o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en el presente documento). En algunos ejemplos, el biorreactor de producción es un biorreactor de perfusión. En otros ejemplos, el biorreactor de producción es un biorreactor alimentado por lotes.

La tasa específica de muerte celular como se describe en el presente documento se define por la fórmula siguiente:

Tasa de muerte celular específica = (producción de LDH específica)/(contenido de LDH por célula)

Algunas realizaciones de estos métodos incluyen además el cultivo de una célula (por ejemplo cualquiera de las células descritas en el presente documento) en el biorreactor de producción utilizando una concentración de sensibilizador que se prevé que tendrá una tasa de muerte celular de menos de 40 % por día, menos de 39 % por día, menos de 38 % por día, menos de 37 % por día, menos de 36 % por día, menos de 35 % por día, menos de 34 % por día, menos de 33 % por día, menos de 32 % por día, menos de 31 % por día, menos de 30 % por día, menos de 29 % por día, menos de 28 % por día, menos de 27 % por día, menos de 26 % por día, menos de 25 % por día, menos de 24 % por día, menos de 23 % por día, menos de 22 % por día, menos de 21 % por día, menos de 20 % por día, menos de 19 % por día, menos de 18 % por día, menos de 17 % por día, menos de 16 % por día, menos de 15 % por día, menos de 14 % por día, menos de 13 % por día, menos de 12 % por día, menos de 11 %

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Algunas realizaciones de estos métodos incluyen además el cultivo de una célula (por ejemplo cualquiera de las células descritas en el presente documento) en el biorreactor de producción (por ejemplo cualquiera de los biorreactores de producción descritos en el presente documento) utilizando una concentración de sensibilizador que se prevé que dará lugar a una producción de LDH específica de la célula de menos de 150 nU/célula/día, menos de 145 nU/célula/día, menos de 140 nU/célula/día, menos de 135 nU/célula/día, menos de 130 nU/célula/día, menos de 125 nU/célula/día, menos de 120 nU/célula/día, menos de 115 nU/célula/día, menos de 110 nU/célula/día, menos de 105 nU/célula/día, menos de 100 nU/célula/día, menos de 95 nU/célula/día, menos de 90 nU/célula/día, menos de 85 nU/célula/día, menos de 80 nU/célula/día, menos de 75 nU/célula/día, menos de 70 nU/célula/día, menos de 65 nU/célula/día, menos de 60 nU/célula/día, menos de 55 nU/célula/día, menos de 50 nU/célula/día, menos de 45 nU/célula/día, menos de 40 nU/célula/día, menos de 35 nU/célula/día, menos de 30 nU/célula/día, menos de 25 nU/célula/día, menos de 20 nU/célula/día, menos de 15 nU/célula/día, menos de 10 nU/célula/día, menos de 5 nU/célula/día, o menos de menos de 1 nU/célula/día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. Algunas realizaciones de estos métodos incluyen además el cultivo de una célula (por ejemplo cualquiera de las células descritas en el presente documento) en el biorreactor de producción (por ejemplo cualquiera de los biorreactores de producción descritos en el presente documento) utilizando una concentración de sensibilizador que se prevé que dará lugar a

[illegible]

[illegible]

[illegible]

nU/célula/día, alrededor de 85 nU/célula/día a alrededor de 110 nU/célula/día, alrededor de 85 nU/célula/día a alrededor de 100 nU/célula/día, alrededor de 85 nU/célula/día a alrededor de 95 nU/célula/día, alrededor de 85 nU/célula/día a alrededor de 90 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 140 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 130 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 120 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 110 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 100 nU/célula/día, alrededor de 90 nU/célula/día a alrededor de 95 nU/célula/día, alrededor de 95 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, alrededor de 95 nU/célula/día a alrededor de 140 nU/célula/día, alrededor de 95 nU/célula/día a alrededor de 130 nU/célula/día, alrededor de 95 nU/célula/día a alrededor de 120 nU/célula/día, alrededor de 95 nU/célula/día a alrededor de 110 nU/célula/día, alrededor de 95 nU/célula/día a alrededor de 100 nU/célula/día, alrededor de 100 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, alrededor de 100 nU/célula/día a alrededor de 140 nU/célula/día, alrededor de 100 nU/célula/día a alrededor de 130 nU/célula/día, alrededor de 100 nU/célula/día a alrededor de 120 nU/célula/día, alrededor de 100 nU/célula/día a alrededor de 110 nU/célula/día, alrededor de 110 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, alrededor de 110 nU/célula/día a alrededor de 140 nU/célula/día, alrededor de 110 nU/célula/día a alrededor de 130 nU/célula/día, alrededor de 110 nU/célula/día a alrededor de 120 nU/célula/día, alrededor de 120 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, alrededor de 120 nU/célula/día a alrededor de 140 nU/célula/día, alrededor de 120 nU/célula/día a alrededor de 130 nU/célula/día, alrededor de 130 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, alrededor de 130 nU/célula/día a alrededor de 140 nU/célula/día, o alrededor de 140 nU/célula/día a alrededor de 150 nU/célula/día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

La tasa de crecimiento es el cálculo de crecimiento compuesto, que se puede determinar usando la ecuación a continuación.

$$\text{Densidad celular final} = \text{Densidad inicial} \times e^{kt},$$

donde k es la constante de crecimiento y t es el tiempo en días.

La tasa de crecimiento aparente es la suma de la tasa de muerte calculada añadida a la tasa de crecimiento.

Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además el cultivo de una célula (por ejemplo, cualquiera de las células descritas en el presente documento) en el biorreactor de producción (por ejemplo cualquiera de los biorreactores de producción descritos en el presente documento) utilizando una concentración de sensibilizador que se prevé que dará lugar a una tasa de crecimiento aparente mayor que 1 % por día, mayor que 1,5 % por día, mayor que 2 % por día, mayor que 2,5 % por día, mayor que 3 % por día, mayor que 3,5 % por día, mayor que 4,0 % por día, mayor que 4,5 % por día, mayor que 5,0 % por día, mayor que 5,5 % por día, mayor que 6,0 % por día, mayor que 6,5 % por día, mayor que 7,0 % por día, mayor que 7,5 % por día, mayor que 8,0 % por día, mayor que 8,5 % por día, mayor que 9,0 % por día, mayor que 9,5 % por día, mayor que 10,0 % por día, mayor que 10,5 % por día, mayor que 11,0 % por día, mayor que 11,5 % por día, mayor que 12,0 % por día, mayor que 12,5 % por día, mayor que 13,0 % por día, mayor que 13,5 % por día, mayor que 14,0 % por día, mayor que 14,5 % por día, mayor que 15,0 % por día, mayor que 16 % por día, mayor que 17 % por día, mayor que 18 % por día, mayor que 19 % por día, mayor que 20 % por día, mayor que 21 % por día, mayor que 22 % por día, mayor que 23 % por día, mayor que 24 % por día, mayor que 25 % por día, mayor que 30 % por día, mayor que 35 % por día, mayor que 40 % por día, mayor que 45 % por día, mayor que 50 % por día, mayor que 55 % por día, mayor que 60 % por día, mayor que 65 % por día, mayor que 70 % por día, mayor que 75 % por día, mayor que 80 % por día, mayor que 85 % por día, mayor que 90 % por día, mayor que 95 % por día, mayor que 100 % por día, mayor que 105 % por día, mayor que 110 % por día, mayor que 115 % por día, mayor que 120 % por día, mayor que 125 % por día, mayor que 130 % por día, mayor que 135 % por día, mayor que 140 % por día, mayor que 145 % por día, o mayor que 150 % por día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción. Algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen además el cultivo de una célula (por ejemplo, cualquiera de las células descritas en el presente documento) en el biorreactor de producción (por ejemplo cualquiera de los biorreactores de producción descritos en el presente documento) utilizando una concentración de sensibilizador que se prevé que dará lugar a una tasa de crecimiento aparente de alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 150 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 140 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 135 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 130 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 125 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 120 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 115 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 110 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 105 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 100 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 95 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 90 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 85 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 80 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 75 % por día, alrededor de 0,1 % a alrededor de 70 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 65 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 60 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 55 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 50 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 45 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 40 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 35 % por día, alrededor de 0,1 % por día a alrededor de 30 %

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

por día, alrededor de 100 % por día a alrededor de 120 % por día, alrededor de 100 % por día a alrededor de 115 % por día, alrededor de 100 % por día a alrededor de 110 % por día, alrededor de 100 % por día a alrededor de 105 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 140 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 135 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 130 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 125 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 120 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 115 % por día, alrededor de 105 % por día a alrededor de 110 % por día, alrededor de 110 % por día a alrededor de 140 % por día, alrededor de 110 % por día a alrededor de 135 % por día, alrededor de 110 % por día a alrededor de 130 % por día, alrededor de 110 % por día a alrededor de 125 % por día, alrededor de 110 % por día a alrededor de 120 % por día, alrededor de 110 % por día a alrededor de 115 % por día, alrededor de 115 % por día a alrededor de 140 % por día, alrededor de 115 % por día a alrededor de 135 % por día, alrededor de 115 % por día a alrededor de 130 % por día, alrededor de 115 % por día a alrededor de 125 % por día, alrededor de 115 % por día a alrededor de 120 % por día, alrededor de 120 % por día a alrededor de 140 % por día, alrededor de 120 % por día a alrededor de 135 % por día, alrededor de 120 % por día a alrededor de 130 % por día, alrededor de 120 % por día a alrededor de 125 % por día, alrededor de 125 % por día a alrededor de 140 % por día, alrededor de 125 % por día a alrededor de 130 % por día, alrededor de 125 % por día a alrededor de 135 % por día, alrededor de 130 % por día a alrededor de 135 % por día, o alrededor de 135 % por día a alrededor de 140 % por día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.

En algunas realizaciones de estos métodos, la célula contiene un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica recombinante.

En algunas realizaciones de estos métodos, la célula es una bacteria (por ejemplo, cualquiera de las bacterias ejemplares descritas en el presente documento o conocidas en la técnica), una levadura (por ejemplo, cualquiera de las células ejemplares de levadura descritas en el presente documento o conocidas en la técnica), o una célula de mamíferos (por ejemplo, cualquiera de las células ejemplares de mamíferos descritas en el presente documento o conocidas en la técnica).

En algunas realizaciones de estos métodos, la viabilidad celular se determina midiendo una concentración de ácido láctico deshidrogenasa (LDH) en el recipiente de cultivo de ensayo.

En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores (por ejemplo, cualquiera de los matraces de agitación con deflectores aquí o conocidos en la técnica) y la pluralidad de condiciones de ensayo incluyen una o más de: (a) una agitación rotatoria de alrededor de 125 RPM a alrededor de 400 RPM (o cualquiera de los subrangos de este rango descrito en el presente documento); (b) una concentración de sensibilizador (por ejemplo, cualquiera de los sensibilizadores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica) de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm (o cualquiera de los subrangos de este rango descrito en el presente documento); y (c) una concentración de un protector (por ejemplo, cualquiera de los protectores descritos en el presente documento o conocidos en la técnica) que es de alrededor de 1 g/L a alrededor de 10 g/L (o cualquiera de los subrangos de este rango descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, el protector es un poloxámero (por ejemplo, poloxámero-188, poloxámero-401, poloxámero-402 o poloxámero-407), una poloxamina (por ejemplo, poloxamina-904 o poloxamina-908), o un poliol plurónico.

EJEMPLOS

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLO 1: Proyección Factorial Completa Combinada con Centro Inscrito

Diseño Compuesto para Recipientes de Cultivo de Ensayo

La agitación rotatoria (RPM³), la concentración del sensibilizador y la concentración de un protector fueron seleccionados como parámetros. Se utilizó un diseño factorial completo combinado con un diseño compuesto central inscrito para determinar un conjunto de condiciones de ensayo (FIG. 7). Los valores específicos de producción de LDH se midieron en cada condición de ensayo. Los resultados se utilizaron para proporcionar un contorno estimado de los parámetros seleccionados. Se identificaron regiones de bajo rendimiento y regiones de fallo de operación (FIG. 9).

EJEMPLO 2: Predicción de Valores Específicos de Producción de LDH a Escala de Sobremesa

Se realizaron experimentos de ensayo de concepto en la escala de sobremesa para determinar la exactitud de los métodos de predicción como se describe en el presente documento.

La concentración de protectores en la escala de sobremesa se fijó en tres niveles diferentes. Para cada nivel, se probaron dos biorreactores de cultivo de sobremesa. Los valores máximos de producción de LDH específicos se midieron debido al proceso de perfusión y se compararon con los valores previstos.

Los valores reales observados en los experimentos de la escala de sobremesa coincidieron muy bien con los valores previstos ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,84$) (FIG. 13A y FIG. 13C). Los resultados demostraron que los métodos descritos en el presente documento pueden ser utilizados con éxito para predecir los efectos de varios parámetros a una escala más alta.

Los experimentos se realizaron manteniendo un rango de concentración de antiespumante de 30-40 ppm de adición de antiespumante por día. Las concentraciones de plurónico se ajustaron de 1,8 g/L (línea discontinua), 2,8 g/L (línea sólida, círculos cerrados), 3,8 g/L (línea sólida, círculos abiertos). El experimento se realizó por duplicado. Esto demuestra la capacidad de los modelos de predicción de la producción específica de LDH cuando se cambian las concentraciones de plurónico.

También se realizaron experimentos para aumentar la concentración de agente antiespumante de 30 ppm a 80 ppm por día. El rango previsto de LDH fue 90,19~96,38, que coincidió muy bien con el rango real de LDH observado 94,74~99,36 (FIG. 14). Los resultados mostraron que los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar con éxito para predecir los efectos de los agentes antiespumantes.

EJEMPLO 3: Predicción de Valores Específicos de Producción de LDH a Escala de Producción

Se realizaron experimentos a escala de producción para determinar la exactitud del modelo como se describe en el presente documento.

Se probaron tres biorreactores de producción de 50 L y dos biorreactores de producción de 100 L. Los experimentos probaron concentraciones de poloxámero-188 (plurónico) que oscilaron entre 1,8 g/L y 5,8 g/L.

Los valores reales observados para la producción específica de LDH coincidieron bien con estos valores previstos ($P < 0,0001$, $R^2 = 0,84$) (FIG. 15A y FIG. 15B). Los resultados demostraron que los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse con éxito para predecir los efectos de parámetros seleccionados a escala de producción (escala de biorreactores de producción).

REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción, comprendiendo el método:
 - (a) determinación de la viabilidad celular bajo una pluralidad de condiciones de ensayo en un recipiente de cultivo de ensayo, en donde la pluralidad de condiciones de ensayo se define mediante un conjunto de parámetros, en donde la pluralidad de condiciones de ensayo se selecciona sobre la base de un análisis factorial completo y/o un diseño compuesto de centro inscrito; y
 - (b) sobre la base de la viabilidad celular en el recipiente de cultivo de ensayo en la pluralidad de condiciones, predicción del efecto de una concentración de un sensibilizador sobre la viabilidad celular en un biorreactor de producción.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el conjunto de parámetros comprende la tensión de cizallamiento, la concentración del sensibilizador, y la concentración de un protector.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el sensibilizador es un agente antiespumante, preferiblemente el antiespumante es un antiespumante a base de polidimetilsiloxano o el antiespumante es simeticona.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el recipiente de cultivo de ensayo tiene un volumen de alrededor de 5 mL a alrededor de 5 L, preferiblemente un volumen de alrededor de 10 mL a alrededor de 500 mL.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el biorreactor de producción tiene un volumen de alrededor de 5 L a alrededor de 20.000 L, preferiblemente el biorreactor de producción tiene un volumen de alrededor de 50 L a alrededor de 10.000 L.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el biorreactor de producción es un biorreactor de perfusión o un biorreactor alimentado por lotes.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que tendrá una tasa específica de muerte celular de menos de 40 % por día, preferiblemente menos de 20 % por día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que dará lugar a una producción de LDH específica celular de menos de 150 nU/célula/día, preferiblemente menos de 100 nU/célula/día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además el cultivo de una célula en el biorreactor de producción utilizando una concentración del sensibilizador que se prevé que dará lugar a una tasa de crecimiento aparente mayor que 1 % por día, preferiblemente mayor que 5 % por día, durante el cultivo de la célula en el biorreactor de producción.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde célula contiene un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica recombinante.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la célula es una bacteria, una levadura, o una célula de mamíferos.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la viabilidad celular se determina mediante medición de una concentración de ácido láctico deshidrogenasa (LDH) en el recipiente de cultivo de ensayo.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-13, en donde el recipiente de cultivo de ensayo es un matraz de agitación con deflectores y la pluralidad de condiciones de ensayo comprende una o más de:
 - (a) una agitación rotatoria de alrededor de 125 RPM a alrededor de 400 RPM;
 - (b) una concentración del sensibilizador de alrededor de 0 ppm a alrededor de 120 ppm; y
 - (c) una concentración de un protector que es alrededor de 1 g/L a alrededor de 10 g/L.
15. El método de la reivindicación 2 o 14, en donde el protector es un poloxámero, preferiblemente seleccionado a partir de poloxámero-188, poloxámero-401, poloxámero-402, o poloxámero-407, una poloxamina, preferiblemente seleccionado de poloxamina-904 o poloxamina-908, o un poliol plurónico.

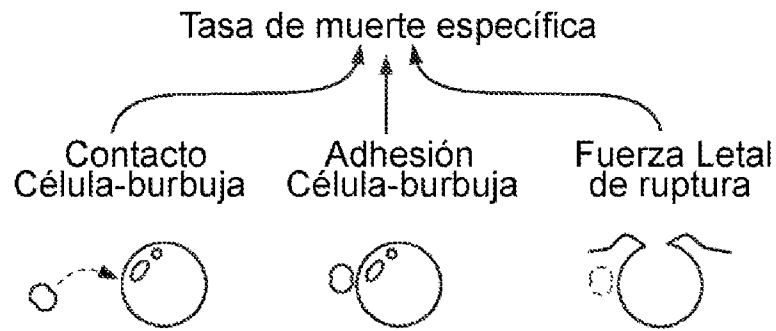


FIG. 1

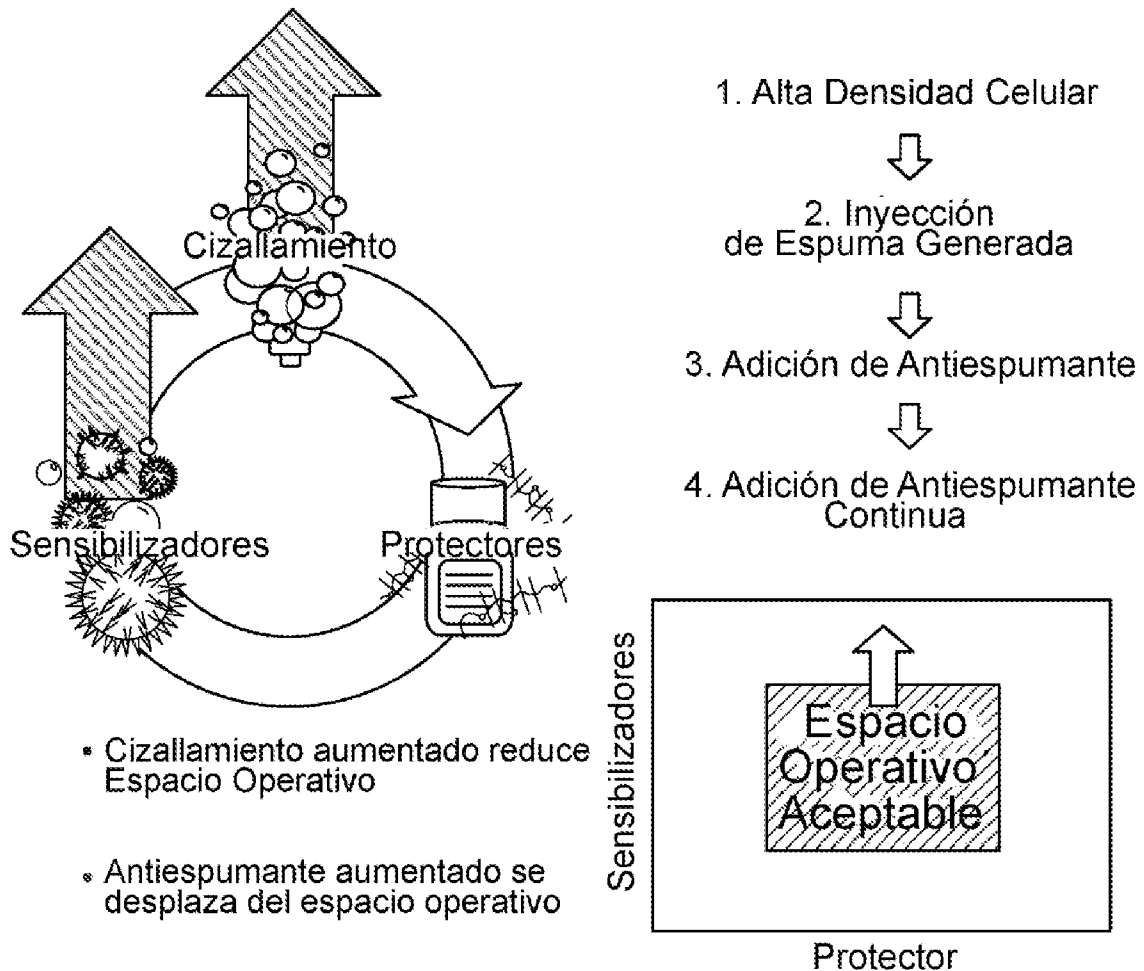


FIG. 2

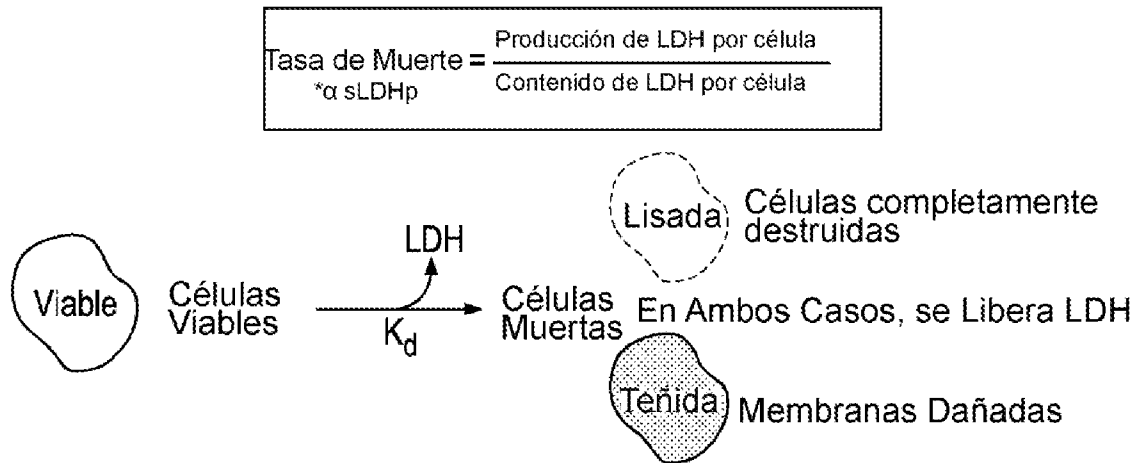


FIG. 3

A lo largo de la Escala

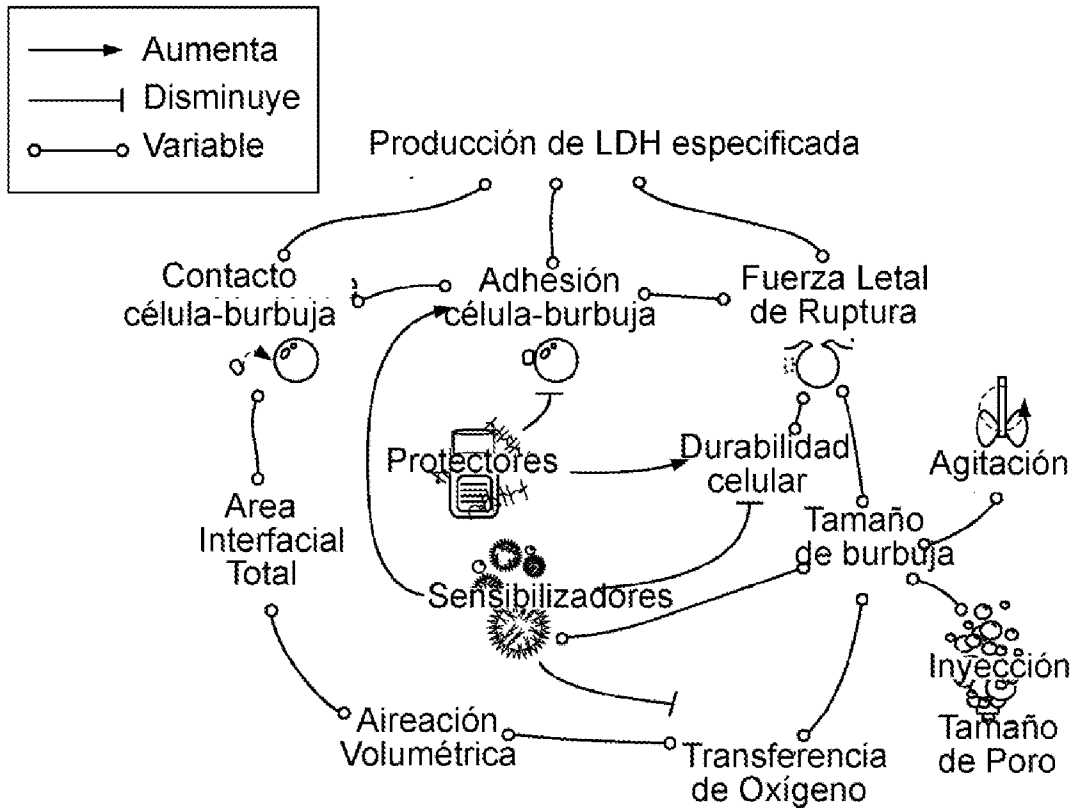


FIG. 4

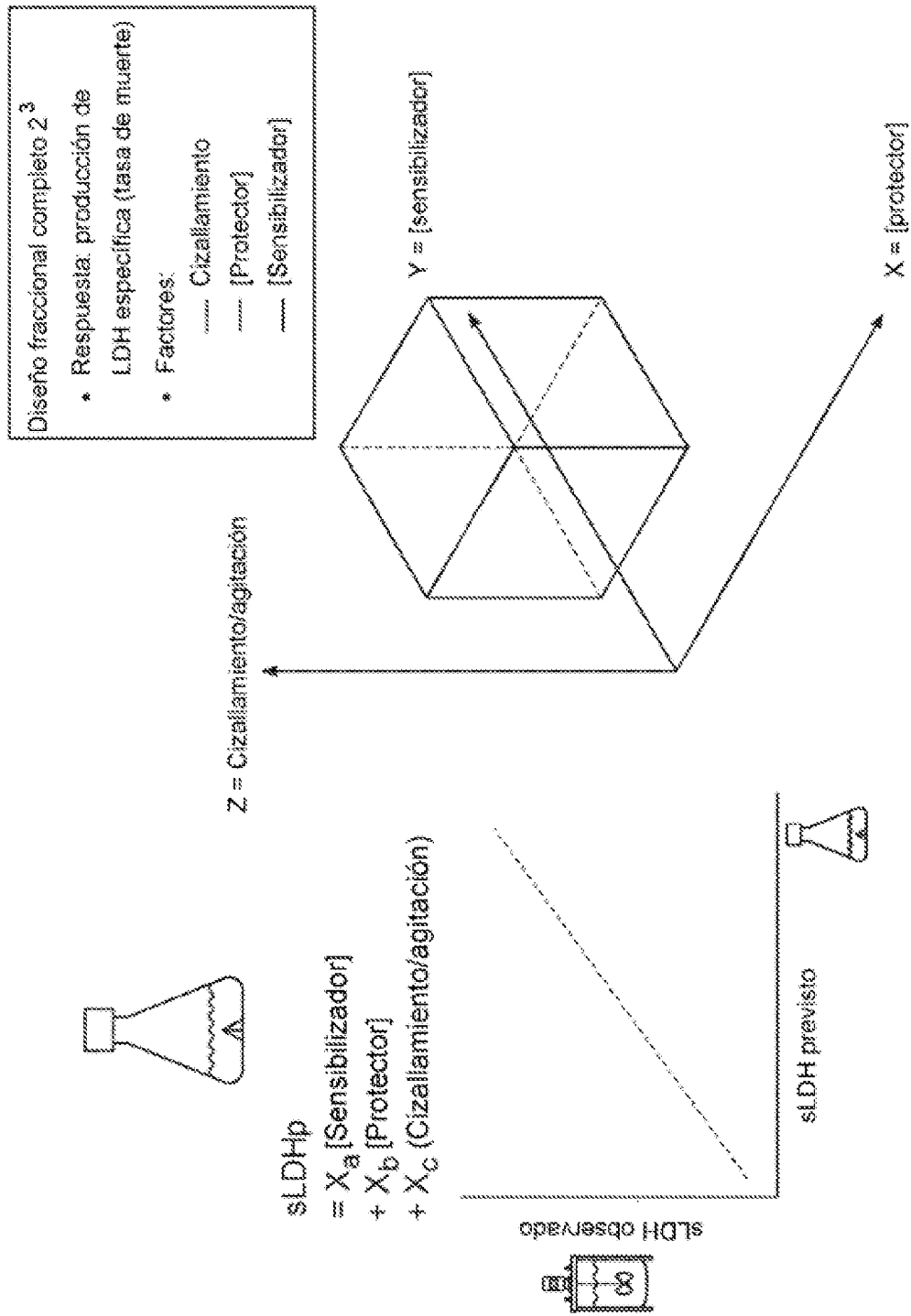


FIG. 5

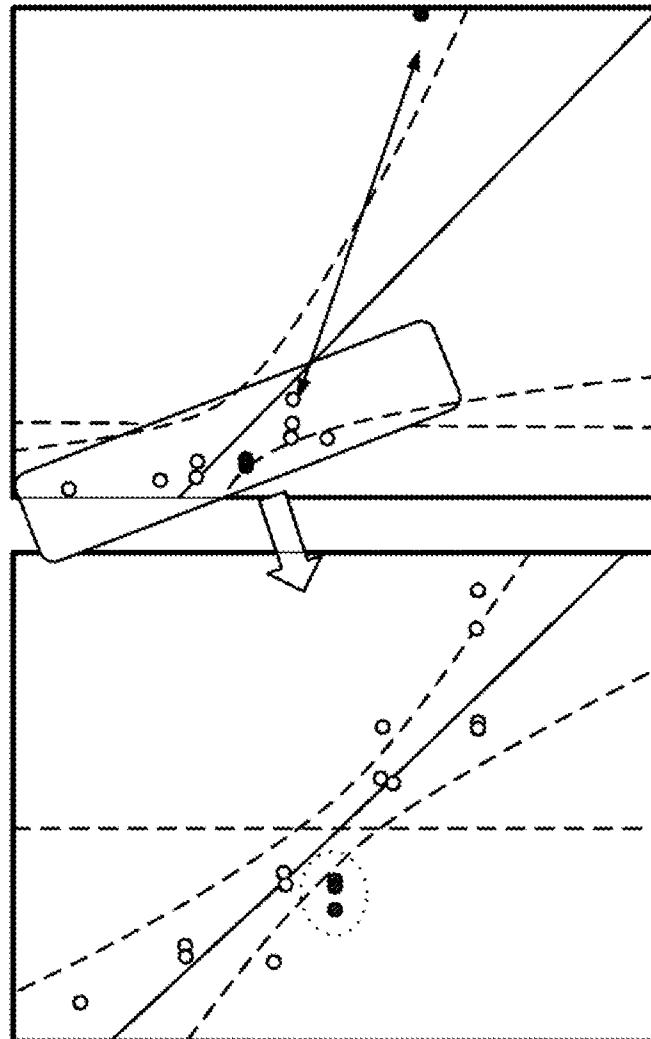
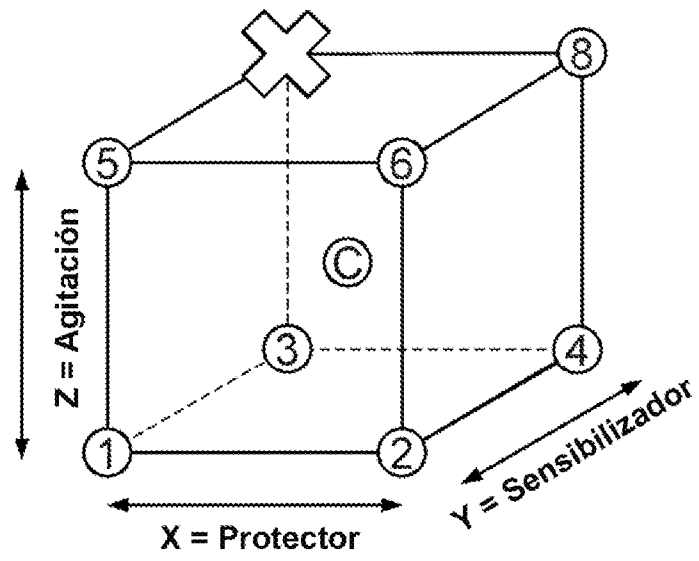
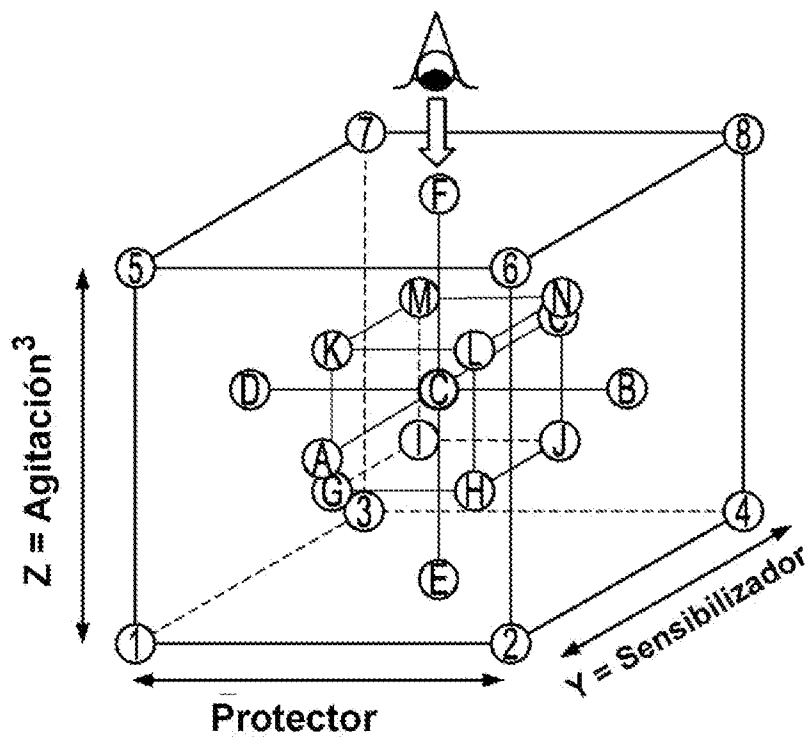


FIG. 6



RPM ajustadas a la 3ª potencia

FIG. 7

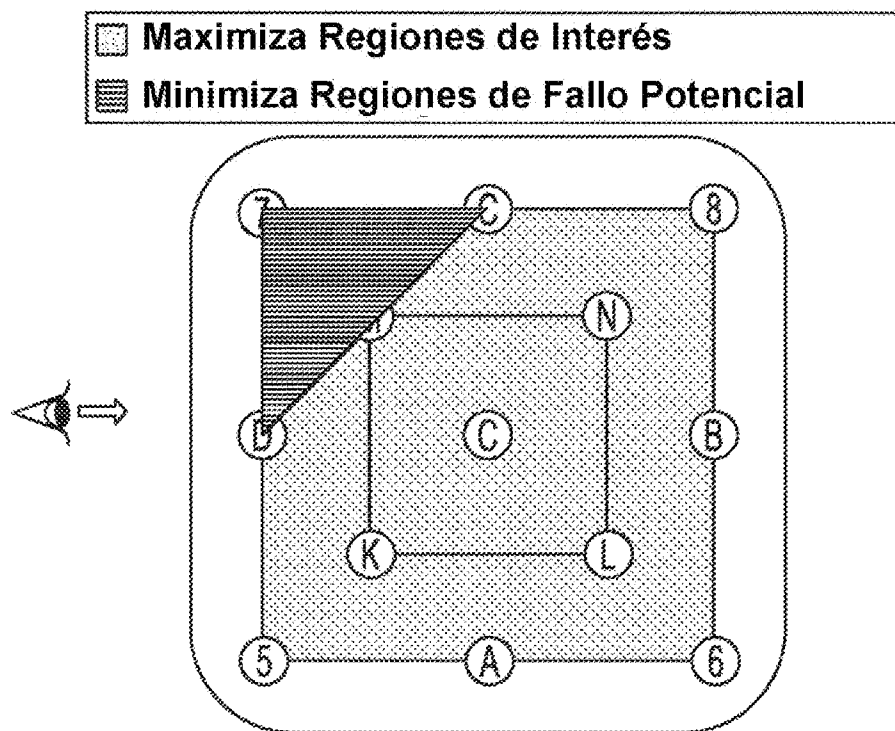
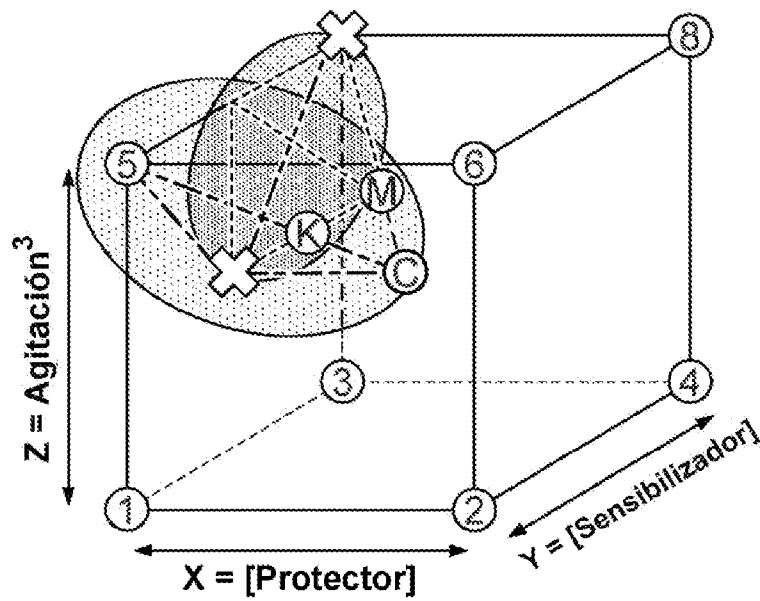
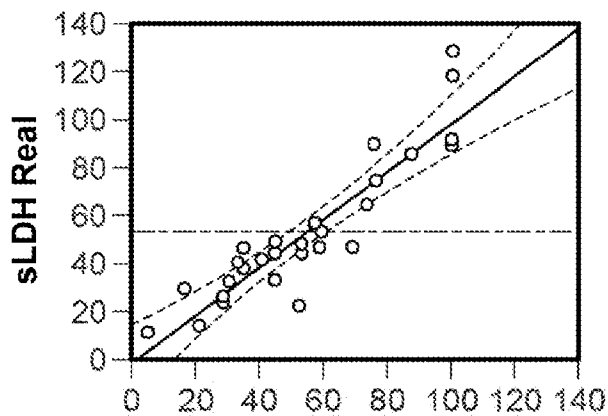


FIG. 8



Región Deficiente Identificada de Rendimiento Deficiente/Fallo



$sLDH = \text{Prevista } P < ,0001$
 $RSq = 0,84 \text{ RMSE} = 12,219$

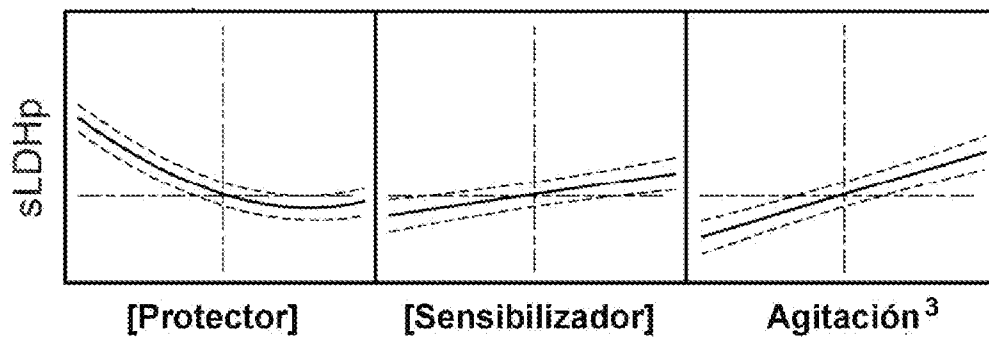
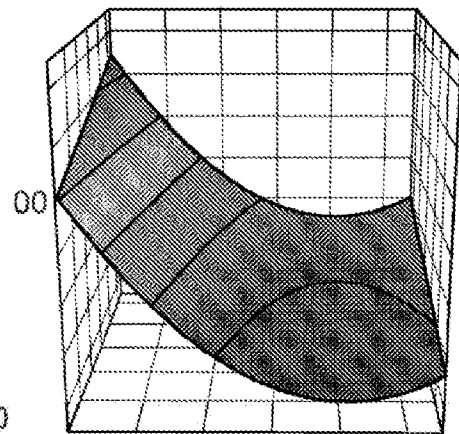
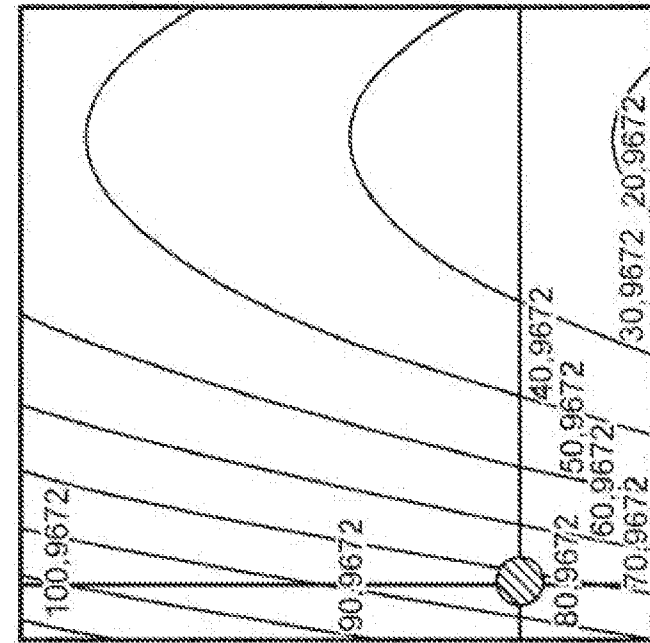


FIG. 9



2. Δ Parámetro Previsto

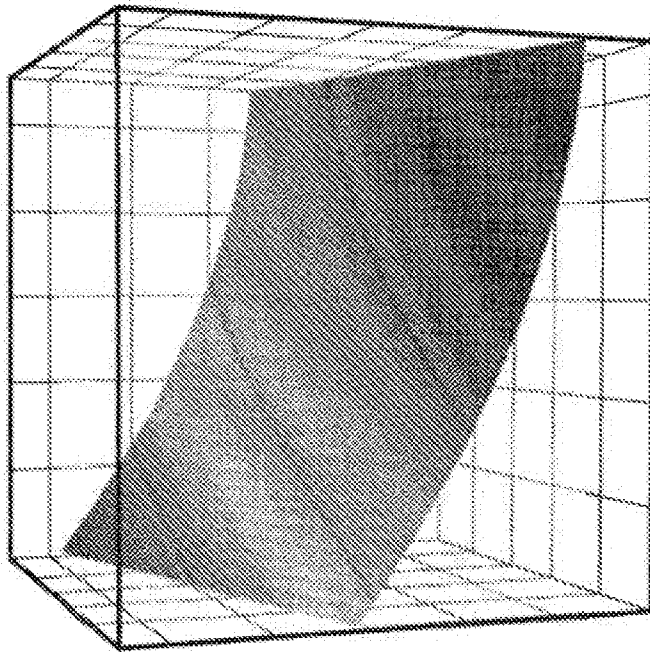
Conocido:

Cizallamiento

[Sensibilizador]

Resuelto:

[Protector]



1. Coincidencia de Contorno Correcto

Conocido:

[Sensibilizador]

[Protector]

Resuelto:

Cizallamiento

FIG. 10

Optimización de Proceso

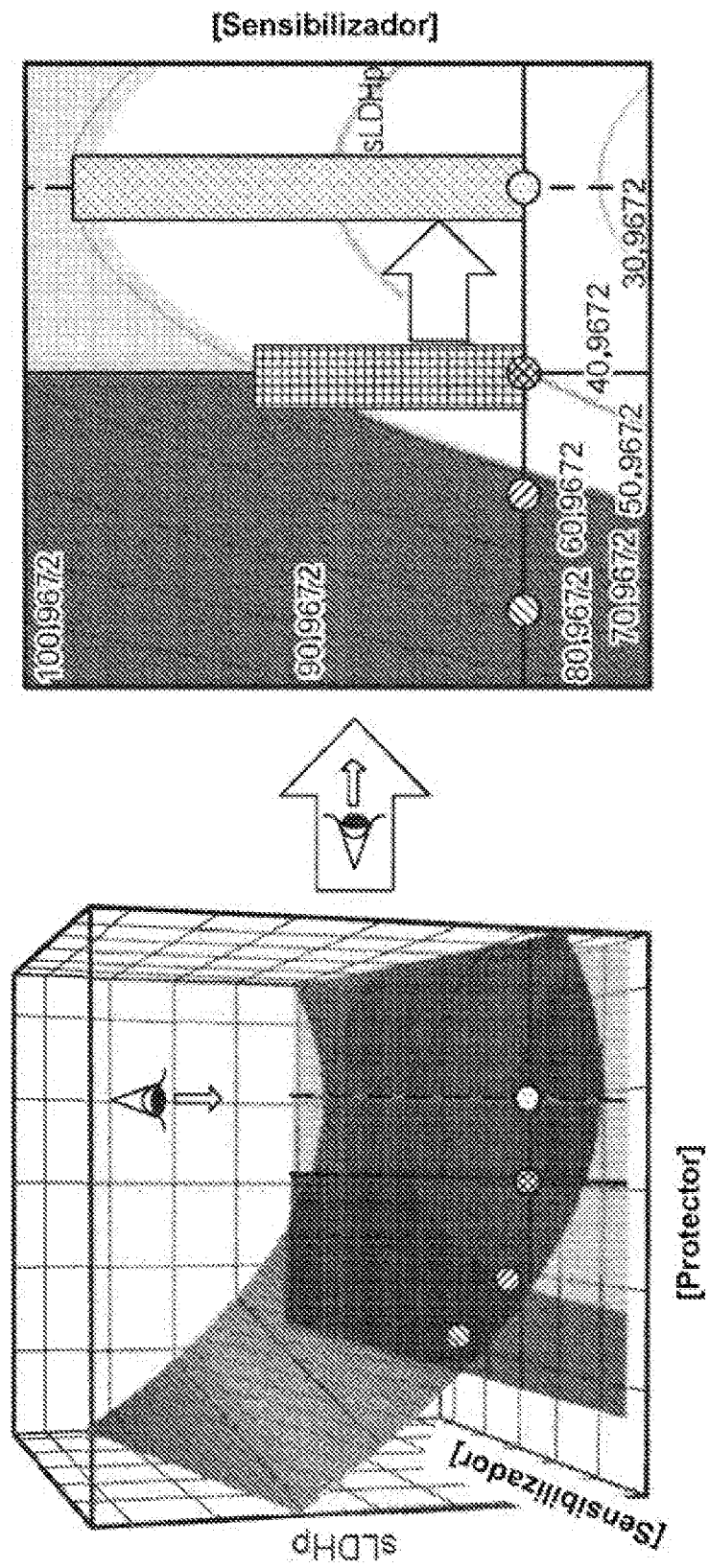


FIG. 11

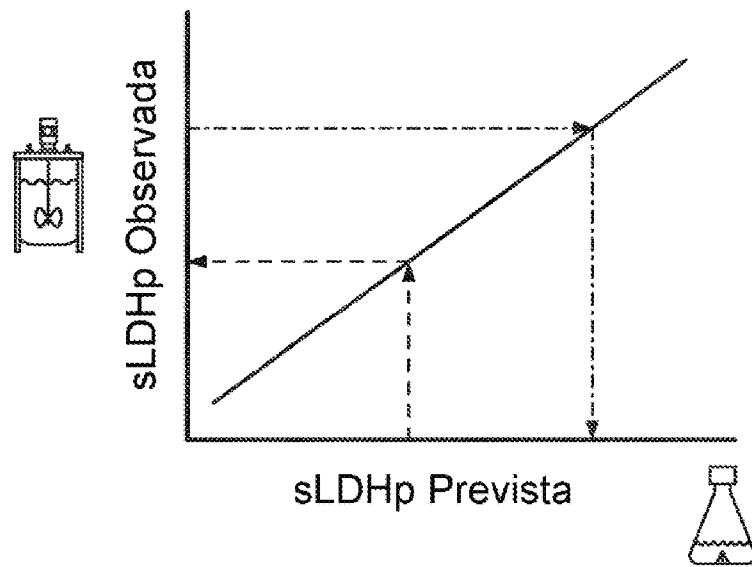


FIG. 12

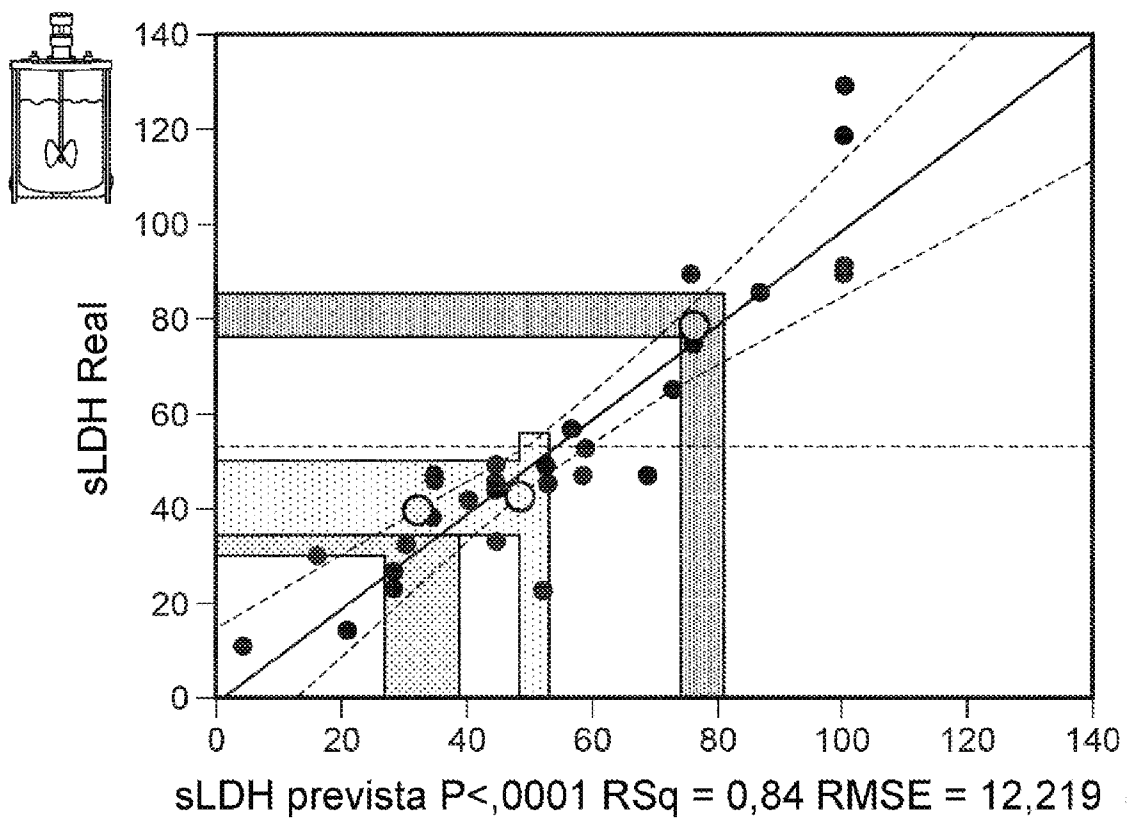


FIG. 13A

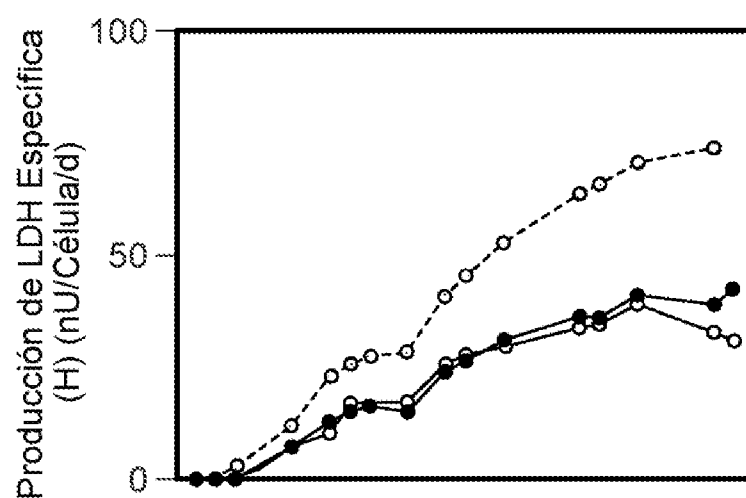
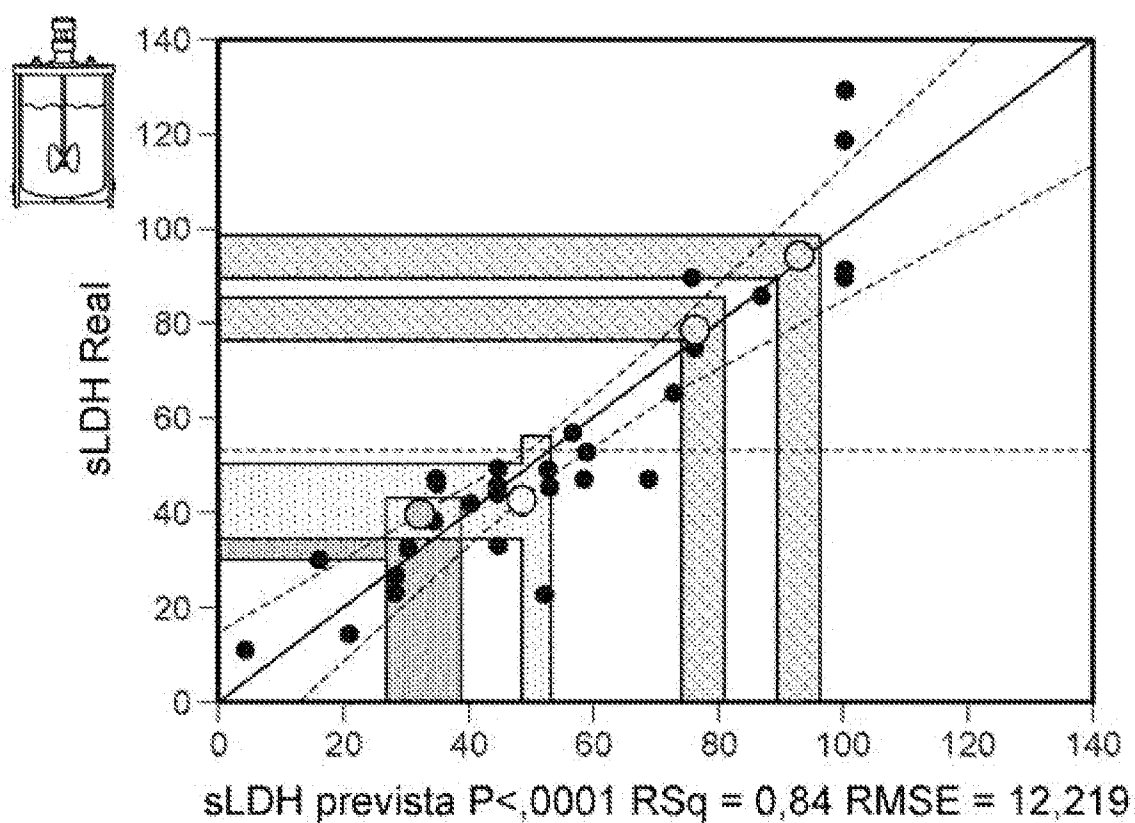


FIG. 13B

Sobremesa 10L		Modelo de Matraz de agitación	
LDH Observada		LDH Prevista	
Avg	Std	Avg	Std
39,00	8,49	37,00	4,24
43,00	7,07	54,00	4,24
80,50	3,54	80,00	4,24
Min	Max	Min	Max
30,51	47,49	32,76	41,24
35,93	50,07	49,76	58,24
76,96	84,04	75,76	84,24

FIG. 13C



n = 1 por Condición Cambiada

Aumento de Antiespumante 30 ppm a 80 ppm			
Rango de LDH Observado		Rango de LDH Previsto	
94,74	99,36	90,19	96,38

FIG. 14

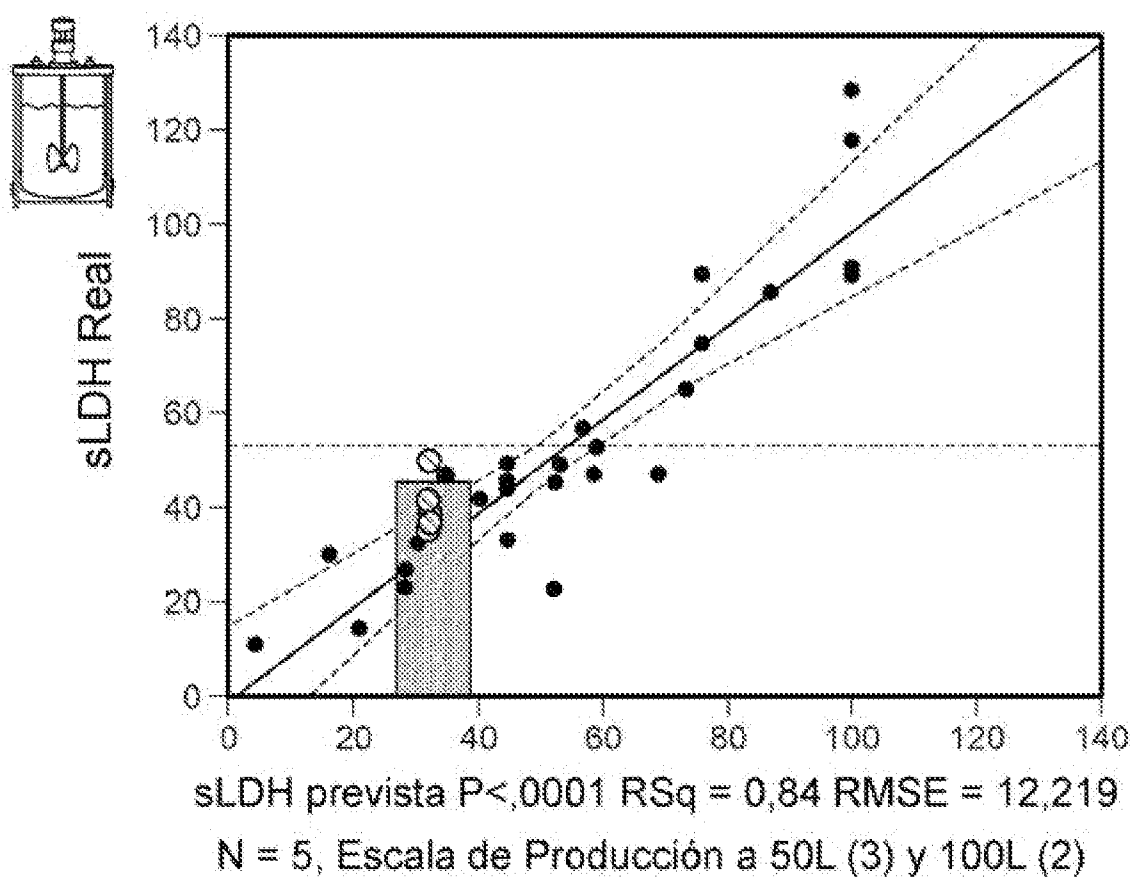


FIG. 15A

LDH		Prevista	
50L		Modelo	std
S16	39,72	37,00	4,24
S18	51,05	37,00	4,24
S19	39,6	37,00	4,24
100L		37,00	4,24
S27	37,61	37,00	4,24
S28	42,55	37,00	4,24

FIG. 15B