(11) Número de Publicação: **PT 2634243 T**

(51) Classificação Internacional:
C12M 1/12 (2017.01) ***C12M 3/06*** (2017.01)
C12P 21/00 (2017.01) ***C12N 5/71*** (2017.01)
B01D 15/26 (2017.01) ***B01D 69/08*** (2017.01)
C07K 16/00 (2017.01) ***C07K 1/18*** (2017.01)
C07K 1/22 (2017.01) ***C07K 1/34*** (2017.01)
C12N 5/73 (2017.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2007.07.04**

(30) Prioridade(s): **2006.07.14 EP 06014671**
2007.02.06 EP 07002571

(43) Data de publicação do pedido: **2013.09.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.09.06**
245/2017

(73) Titular(es):
PATHEON HOLDINGS I B.V.
HERENGRACHT 540 1017 CG AMSTERDAM NL

(72) Inventor(es):
ROBERT PATRICK HOF **NL**
GERBEN MEILE ZIJLSTRA **NL**
JACOB SCHILDER **NL**

(74) Mandatário:
LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO
RUA RAUL PROENÇA, 3 2820-478 CHARNECA DA CAPARICA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA MELHORAR A CULTURA DE CÉLULAS**

(57) Resumo:
A INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA A CULTURA DE CÉLULAS, DE PREFERÊNCIA CÉLULAS HER IMORTALIZADAS DE E1, MAIS PREFERENCIALMENTE CÉLULAS PER.C6 NUM REATOR EM SUSPENSÃO NUM MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS, EM QUE AS CÉLULAS PRODUZEM UMA SUBSTÂNCIA BIOLÓGICA, DE PREFERÊNCIA UM ANTICORPO, EM QUE, PELO MENOS, UM COMPONENTE DE MEIO DE CULTURA CELULAR É ALIMENTADO À CULTURA CELULAR E EM QUE A CULTURA CELULAR COMPREENDENDO AS CÉLULAS, A SUBSTÂNCIA BIOLÓGICA E O MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS É CIRCULADO SOBRE UM SISTEMA DE SEPARAÇÃO E EM QUE O SISTEMA DE SEPARAÇÃO SEPARA A SUBSTÂNCIA BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS COM UM PESO MOLECULAR MAIS BAIXO DO QUE A SUSBTÂNCIA BIOLÓGICA E EM QUE A SUBSTÂNCIA BIOLÓGICA É RETIDA OU ALIMENTADA DE VOLTA AO REATOR. DE PREFERÊNCIA, PARTE DAS SUSBSTÂNCIAS DE MENOR PESO MOLECULAR É REMOVIDA CONTINUAMENTE DA CULTURA CELULAR.

RESUMO

MÉTODO PARA MELHORAR A CULTURA DE CÉLULAS

A invenção refere-se a um processo para a cultura de células, de preferência células HER imortalizadas de E1, mais preferencialmente células PER.C6 num reator em suspensão num meio de cultura de células, em que as células produzem uma substância biológica, de preferência um anticorpo, em que, pelo menos, um componente de meio de cultura celular é alimentado à cultura celular e em que a cultura celular compreendendo as células, a substância biológica e o meio de cultura de células é circulado sobre um sistema de separação e em que o sistema de separação separa a substância biológica de substâncias com um peso molecular mais baixo do que a substância biológica e em que a substância biológica é retida ou alimentada de volta ao reator. De preferência, parte das substâncias de menor peso molecular é removida continuamente da cultura celular.

DESCRIÇÃO

MÉTODO PARA MELHORAR A CULTURA DE CÉLULAS

A invenção refere-se a um processo para a cultura de células num reator em suspensão num meio de cultura de células.

Tal processo é, por exemplo, conhecido a partir da WO04/099396. Aqui, descreve-se como a densidade celular da cultura celular e o rendimento do material biológico desejado podem ser melhorados pela otimização das condições de crescimento em um processo alimentado por lote.

Além disso, a WO05/095578 descreve um processo para a cultura de células por cultura de perfusão contínua de uma cultura celular compreendendo meio de cultura celular e células, em que o meio de cultura celular é adicionado à cultura celular, a cultura celular é circulada sobre um módulo de filtro compreendendo fibras ocas resultando em um fluxo de saída de líquido com uma densidade celular mais baixa do que a cultura celular, e o fluxo dentro do módulo de filtro é um fluxo tangencial alternativo, em que as células produzem uma substância biológica. Nos exemplos da WO05/095578 é mostrado que o produto de 0,9 g/U por dia é produzido, correspondendo a uma concentração de produto na saída de aproximadamente 0,3 g/L.

Quanto maior o volume de líquido que contém a substância biológica, mais trabalhoso torna-se a purificação da substância biológica. A concentração de substância biológica obtida não é tão alta nos processos, tal como divulgada na WO04/099396 e WO05/095578. Por conseguinte, o processamento a jusante desta substância biológica é pesado, porque a substância biológica precisa ser concentrada antes de serem aplicadas outras etapas de purificação ou grandes volumes de substância biológica menos concentrada precisam de ser purificados. Além disso, a cultura de células em menores

densidades celulares resulta em menor produtividade volumétrica e, portanto, requer recipientes maiores e/ou mais cultivadoras e, portanto, maiores investimentos em equipamentos para um determinado nível de produção.

Por conseguinte, é o objetivo da invenção proporcionar um processo em que o produto é obtido a partir da cultura celular em concentrações mais elevadas.

Um outro objetivo da presente invenção é permitir a cultura das células e a produção do material biológico durante um período prolongado.

Estes objetivos são conseguidos por um processo para a cultura de células num reator em suspensão num meio de cultura de células, em que as células produzem uma substância biológica desejada selecionada de proteínas e vacinas, que pode ser utilizada como ingrediente ativo numa preparação farmacêutica, em que pelo menos um componente de meio de cultura celular é alimentado à cultura celular e em que a cultura celular compreendendo as células, a substância biológica e o meio de cultura celular circula sobre um filtro usando um fluxo tangencial e em que o filtro tem um tamanho de poro caracterizado por um corte de peso molecular de pelo menos 30 kDa e no máximo 100 kDa, adequado para separar a substância biológica desejada de substâncias com um peso molecular inferior à substância biológica desejada, em que o fluxo de saída de líquido do filtro contém essencialmente apenas componentes com um peso molecular inferior ao da substância biológica desejada e em que a substância biológica desejada é retida ou alimentada de volta para o reator.

Verificou-se que, utilizando um sistema de separação que separa a substância biológica das substâncias com um peso molecular inferior ao da substância biológica, a substância biológica pode ser acumulada na cultura celular em concentrações mais elevadas.

Assim, a presente invenção difere da cultura de células descrita na técnica anterior na medida em que permite a acumulação do material biológico desejado em conjunto com a massa celular.

Numa forma de realização preferida da presente invenção parte das substâncias de menor peso molecular são continuamente removidas da cultura celular.

Uma vantagem adicional do processo da presente invenção é que a concentração de células viáveis mais altas pode ser alcançada em comparação com, por exemplo, processos em lote ou alimentados em lote. Além disso, o tempo de produção - o período durante o qual as células produzem a substância biológica - pode ser prolongado em comparação com, por exemplo, processos em lote ou alimentados. Além disso, em comparação com um processo em lote ou alimentado-lote, é possível usar um reator menor. O uso de reatores menores é vantajoso, pois isso reduz os investimentos relacionados ao equipamento e instalações.

Além disso, concentrações mais elevadas da substância biológica podem ser obtidas em tempos mais curtos.

Verificou-se que era possível obter altas concentrações de substância biológica dentro do reator sem diminuir drasticamente a viabilidade celular e, portanto, sem limitar o tempo de produção. O especialista na técnica esperaria que a inibição do produto, ou seja, a inibição da produção da substância biológica pela própria substância biológica ou a inibição por outras macromoléculas produzidas pela célula (como, por exemplo, proteínas de células hospedeiras, enzimas ou detritos celulares), ocorreria. Além disso, verificou-se que a acumulação do material biológico desejado não prejudica a função do sistema de separação.

O processo da presente invenção proporciona uma vantagem considerável em termos de densidade celular, concentração de produto na cultura de células e período de cultura prolongado em comparação com os processos de acordo com a WO05/095578 e WO04/099396. Como resultado, o presente processo resulta numa produção melhorada do material biológico desejado.

As células que podem ser utilizadas para produzir a substância biológica são, em princípio, todas as células conhecidas dos especialistas na matéria, que têm a capacidade de produzir um produto biológico. As células podem ser eucarióticas, por exemplo, fungos filamentosos, por exemplo *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Trichoderma reesei, Penicillium chrysogenum,* leveduras, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis, Phaffia rhodozyma,* fermento do género *Pichia,* por exemplo, *Pichia pastoris* ou procariótico, por exemplo *Escherichia coli, Bacillus sp, por exemplo B. licheniformis, B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. alkalophilus, Streptomyces sp., Corynebacterium glutamicum, Pseudomonas sp.* Exemplos de células eucarióticas são, por exemplo, também descritos em Chu, L., Robinson, DK, (2001) Curr. Opinion Biotechn., Vol. 12, p. 180-187. De preferência, as células que são utilizadas no processo da presente invenção são células animais, em particular células de mamíferos. Exemplos de células de mamífero incluem células de CHO (Ovário de Hamster Chinês), células de hibridomas, células de BHK (Rim de Hamster bebé), células de mieloma, células humanas, por exemplo células HEK-293, células linfoblastoides humanas, células E imortalizadas de E1, células de ratinho, por exemplo Células NS0. Mais preferencialmente, são utilizadas células HER imortalizadas de E1, mais preferencialmente células PER.C6.

As células primárias da retina embrionária humana (HER) podem ser isoladas dos fetos (Byrd P, Brown KW, Gallimore PH. 1982. Transformação maligna de retinoblastos de embriões humanos por DNA de adenovírus 12 clonado. Natureza 298: 69-71, Byrd PJ, Grand RJA, Gallimore PH. 1988. Transformação diferencial de células retinianas primárias de embriões humanos por regiões E1 de adenovírus e combinações de E1A + ras. Oncogene 2: 477-484). As células primárias morrerão após o cultivo de várias passagens. As células HER imortalizadas de E1 para a finalidade da presente invenção são derivadas de células HER primárias por expressão de ADN que codifica as proteínas adenovíricas E1A e E1B no mesmo, para obter células imortalizadas. Essas células imortalizadas podem ser cultivadas por mais de 100 passagens. Métodos para a obtenção de células HER imortalizadas por E1, por exemplo, foram descritos em Patente US 5994128, de Byrd P, Brown KW, Gallimore PH. 1982. Transformação maligna de retinoblastos de embriões humanos por DNA de adenovírus 12 clonado. Nature 298: 69-71, de Byrd PJ, Grand RJA, Gallimore PH. 1988. Transformação diferencial de células retinianas primárias de embriões humanos por regiões E1 de adenovírus e combinações de E1A + ras. Oncogene 2:477-484, e em Gallimore, PH, Grand, RJA e Byrd, PJ (1986). Transformação de retinoblastos de embriões humanos com vírus de símio 40, adenovírus e oncogenes de ras. AntiCancer Res. 6, p499-508. Por exemplo, as células HER imortalizadas, incluindo as células PER.C1, PER.C3, PER.C4, PER.C5, PER.C6, PER.C8 e PER.C9, foram geradas por transfecção de células HER primárias usando um plasmídeo que continha as sequências de codificação de adenovírus serotipo 5 (Ad5) E1 A e E1B (nucleótidos Ad5 459-3510) sob o controle do promotor de fosfoglicerato quinase humano ("PGK") (ver a Patente US 5994128).

Numa forma de realização preferida, as células no processo da presente invenção são células HER imortalizadas com E1,

mais preferencialmente células PER.C6 (ver a Patente US 5994128). As células PER.C6 são exemplificadas por células como depositadas sob ECACC No. 96022940 (veja, por exemplo, Patente US 5994128, EP 0833934 B1).

No processo da invenção, as células podem ser cultivadas em suspensão sob qualquer forma, por exemplo como células imobilizadas, células individuais ou em aglomerados de células ou como uma combinação destes. De preferência, as células são cultivadas como células únicas e/ou como aglomerados de células pequenas de não mais de 100 células, mais preferencialmente de não mais do que 20 células. As células podem, por exemplo, ser imobilizadas em microportadores, tais como comercialmente disponíveis, por exemplo, da GE Healthcare (Cytodex).

Um reator como aqui definido é um sistema que compreende a cultura celular em que a cultura celular, por sua vez, compreende células e um meio de cultura de células. De preferência, proporciona barreiras estéreis, tais como filtros de ar, para evitar que outras células contaminem as células desejadas e, de preferência, mantém um ambiente favorável para as células, fornecendo condições de cultura adequadas, tais como mistura, temperatura, pH, concentração de oxigénio, etc.

O reator pode, por exemplo, ser de natureza mais permanente, por exemplo, o reator pode ser de aço inoxidável ou de vidro ou, por exemplo, pode ser de natureza descartável, por exemplo, o reator pode ser um frasco ou saco de plástico. Exemplos de reatores adequados para utilização na presente invenção incluem, mas não estão limitados a recipientes de tanque agitado, vasos de transporte aéreo e sacos descartáveis que podem ser misturados por balanço, movimento de agitação ou agitação. De preferência, os reatores (biológicos) descartáveis são usados porque são

favoráveis, pois exigem custos de investimento relativamente baixos, têm grande flexibilidade operacional, tempos de rodagem curtos e são facilmente configuráveis para o processo. Os reatores (bio) descartáveis estão comercialmente disponíveis, por exemplo, Hyclone, Sartorius, Applikon ou Wave.

O termo "sistema de separação" é definido dentro do enquadramento da invenção como um sistema capaz de separar com base no peso molecular. O sistema de separação utilizado no processo da invenção é capaz de separar a substância biológica de substâncias com um peso molecular inferior ao da substância biológica. Por outras palavras, o corte de peso molecular é escolhido de tal modo que o corte de peso molecular (MWCO) é menor do que, mais preferencialmente, pelo menos, um fator 2, mais preferencialmente, pelo menos, um fator 3 menor do que o peso molecular da substância biológica. Tipicamente, mas, obviamente, dependendo do peso molecular da substância biológica produzida no processo da presente invenção, o MWCO do sistema de separação é, pelo menos, 30kDa e no máximo 100kDa. Por exemplo, para uma IgG com um peso molecular de 150kDa, um sistema de separação tendo um MWCO no máximo de 50 kDa é o mais preferido.

Como aqui reivindicado, os sistemas de separação são limitados aos filtros.

O termo "filtro", tal como aqui utilizado, pretende incluir todos os dispositivos com a capacidade de separar partículas com base em tamanho ou peso molecular. Em princípio, no processo da presente invenção, qualquer filtro pode ser utilizado desde que o tamanho de poro ou MWCO seja escolhido de tal modo que a substância biológica seja separada de substâncias com um peso molecular inferior ao da substância biológica. Exemplos de filtros adequados para uso na presente invenção incluem filtros de membrana, filtros

cerâmicos e filtros metálicos. O filtro pode ser usado em qualquer forma; o filtro pode, por exemplo, ser enrolado em espiral ou tubular ou pode ser utilizado na forma de uma folha. De preferência, no processo da invenção, o filtro utilizado é um filtro de membrana, de preferência um filtro de fibra oca. Com o termo "fibra oca" entende-se uma membrana tubular. O diâmetro interno do tubo é pelo menos 0,1 mm, mais preferencialmente pelo menos 0,5 mm, mais preferencialmente pelo menos 0,75 mm e de preferência o diâmetro interno do tubo é no máximo de 10 mm, mais preferencialmente no máximo de 6 mm, mais preferencialmente no máximo 1 mm. Os módulos de filtro que compreendem fibras ocas estão comercialmente disponíveis, por exemplo, da General Electric (GE, anteriormente Amersham).

Ao circular a cultura celular compreendendo a substância biológica, as células e o meio de cultura de células sobre um sistema de separação, a substância biológica e as células são retidos no reator e a saída de líquido tem, portanto, uma menor concentração de substância biológica e uma densidade celular mais baixa do que a cultura de células. Normalmente, no processo da invenção, a saída líquida não contém nem contém qualquer substância biológica e células. Normalmente, a saída de líquido essencialmente apenas contém componentes com um peso molecular inferior ao da substância biológica. Essencialmente, todas as células e essencialmente todas as substâncias biológicas são, portanto, geralmente mantidas no reator.

De preferência, o tamanho de poro ou MWCO do filtro é escolhido de tal modo que o tamanho dos poros ou MWCO do filtro seja menor que, mais preferencialmente, pelo menos, um fator 2, mais preferencialmente, pelo menos, um fator 3 menor que o diâmetro ou peso molecular do produto, garantindo uma alta retenção de produto. Tipicamente, mas, obviamente,

dependendo do tamanho ou peso molecular do produto, isto é, substância biológica produzida no processo da presente invenção, o tamanho de poro ou MWCO do filtro é de preferência, pelo menos 5, mais preferencialmente, pelo menos, 10, mais preferencialmente, pelo menos, 30kDa e/ou o tamanho de poro ou MWCO do filtro/membrana é de preferência no máximo 500kDa, mais preferencialmente no máximo 300kDa, mais preferencialmente no máximo 100kDa.

Com o corte de peso molecular (MWCO) entende-se o peso molecular acima do qual, pelo menos, 90% das partículas é retida pelo sistema de separação.

Circular a cultura de células sobre um sistema de separação, por exemplo, um filtro significa que a cultura de células é passada através de um sistema de separação, por exemplo, um filtro que resulta em um escoamento de líquido e um fluxo cujo conteúdo é mantido ou alimentado de volta para o reator. O fluxo em que os conteúdos são mantidos ou alimentados de volta para o reator normalmente, essencialmente, apenas contém componentes com um peso molecular pelo menos igual ao da substância biológica ou superior e, portanto, o referido fluxo compreenderá mais substância biológica do que a saída líquida.

Em princípio, não é crítico quando a circulação da cultura celular sobre o sistema de separação é iniciada durante o processo da invenção. A circulação da cultura celular pode, por exemplo, ser iniciada diretamente desde o início do processo ou quando a densidade celular viável das células atingiu um determinado nível.

A circulação da cultura de células sobre um filtro pode ser um fluxo substancialmente perpendicular em relação à superfície do filtro, também conhecido como fluxo de saída ou um fluxo substancialmente paralelo à superfície do filtro, também conhecido como fluxo tangencial, por exemplo, fluxo

tangencial unidirecional (TFF) ou fluxo cruzado. Um exemplo preferido de fluxo cruzado é o fluxo tangencial alternativo (ATF), como com o ATF, que o entupimento do filtro não ocorre (rapidamente) mesmo em densidades celulares muito altas. É comum o conhecimento geral de que a filtragem em profundidade, o filtro de poro final deve ser protegido contra o entupimento por pré-filtros do curso. Esta prática baseia-se no conhecimento geral comum que filtra com poros menores ou com uma obstrução MWCO menor com mais facilidade, limitando assim o tempo de produção. Se o ATF for utilizado, o uso de um pré-filtro torna-se supérfluo.

O fluxo pode ser direcionado movendo a cultura celular, movendo o filtro ou ambos. O filtro pode, por exemplo, ser movido por rotação (filtro rotativo) ou vibração (filtro vibratório). Alternativamente, se o fluxo é dirigido movendo apenas a cultura celular, o filtro é estático e, por exemplo, a cultura celular pode ser movida por meio de bombas ou pressão.

Com "fluxo tangencial alternativo" entende-se que existe um fluxo na mesma direção que (ou seja, tangencial para) a (s) superfície (s) do filtro, que flui indo e para trás, e que há outro fluxo em uma direção substancialmente perpendicular a disse a superfície do filtro. O fluxo tangencial alternativo pode ser conseguido de acordo com métodos conhecidos do especialista na técnica (por exemplo, como descrito na US 6544424).

Durante a cultura das células, pelo menos, um componente de meio de cultura de células, por exemplo, um ou mais nutrientes e/ou meio de cultura de células podem ser alimentados às células. No processo de acordo com a invenção, é vantajoso complementar, em parte ou de preferência, em todo, pelo menos, um dos nutrientes empobrecidos através de uma alimentação deste nutriente ou destes nutrientes para o

reator. Por exemplo, o meio de cultura celular completo pode ser alimentado ao reator, o que é vantajoso como uma necessidade de alimentação separada, então não deve ser preparado separadamente. O meio de cultura de células pode, por exemplo, ser também alimentado às células numa forma mais concentrada; Isso é vantajoso, pois volumes menores são mais fáceis de manusear. Também um ou mais nutrientes podem ser alimentados ao reator. Por exemplo, carboidratos, por exemplo, glicose ou frutose; aminoácidos, tal como, glutamina e/ou péptidos podem ser alimentados vantajosamente para o reator.

Numa forma de realização preferida da invenção, as condições de cultura celular são escolhidas de tal modo que a taxa de crescimento celular e/ou a produtividade específica das células não é limitada e mais preferencialmente de tal modo que a concentração de pelo menos um dos componentes do meio de cultura celular permaneça essencialmente constante. Exemplos de condições limitantes de cultura celular são limitações de nutrientes e formação de metabolitos inibidores, como amônia, dióxido de carbono e lactato. Por exemplo, as condições de cultura de células tais como a alimentação podem ser escolhidas de tal modo que a taxa de crescimento celular não é limitada, por exemplo, fornecendo nutrientes suficientes para compensar a depleção e/ou para evitar a produção de metabolitos inibidores tais como lactato ou amoníaco. Por exemplo, as condições de aeração podem ser escolhidas de tal forma que a formação de dióxido de carbono não está limitando a taxa de crescimento celular. Crescer a célula em condições não limitantes é altamente vantajosa do ponto de vista de boas práticas de fabricação (GMP) como 1) isso pode dar um ambiente constante de cultura de células que, em muitos casos, também dá qualidade de produto constante e boa e 2) isso pode levar a alta viabilidade celular, em alguns casos a uma viabilidade

celular de mais de 98%. A viabilidade celular elevada reduz a liberação de contaminantes relacionados com células, como as proteínas da célula hospedeira, o que facilita a purificação do produto. Além disso, o crescimento das células com taxa de crescimento celular ilimitada e/ou produtividade específica ilimitada tem a vantagem comercial de que é possível produzir mais substância biológica em um tempo ainda menor, uma vez que a maior densidade celular será alcançada no início do processo.

A "produtividade específica" das células é a quantidade de uma determinada substância biológica produzida por célula por unidade de tempo e geralmente é expressa em pg.célula^{-1} dia^{-1} .

A taxa de adição de, pelo menos, um componente de meio de cultura de células, por exemplo, nutrientes e/ou meio de cultura celular para a cultura celular (taxa de entrada ou taxa de perfusão) influencia a viabilidade e a densidade das células. No processo da invenção, o (s) componente (s) de meio de cultura de células, tais como nutrientes e / ou meio de cultura de células podem ser alimentados, por exemplo, num fluxo contínuo de fluxo semi-contínuo, por exemplo, fluxo escalonado ou fluxo escalonado. De preferência, o (s) componente (s) do meio de cultura celular, por exemplo, nutrientes e/ou meio de cultura de células são adicionados num fluxo contínuo.

O (s) componente (s) de meio de cultura de células, tais como meio de cultura celular completo e/ou nutrientes, podem, em princípio, ser alimentados ao reator a qualquer momento durante o processo. De preferência, a alimentação é iniciada antes que os substratos, tais como a glutamina e a glicose, tenham atingido níveis tão baixos que causem o cessar o crescimento das células ou antes dos metabolitos inibitórios, por exemplo, lactato ou amônia atingir níveis

tão elevados que o crescimento cessaria. A partir deste ponto, o componente (s) do meio de cultura celular, tais como nutrientes e / ou meio de cultura celular completo, é de preferência alimentado ao reator a uma velocidade tal que a demanda do substrato seja atendida.

Numa forma de realização da invenção, o meio de cultura celular é adicionado a uma taxa de alimentação de acordo com a fórmula (1):

$$\text{Taxa de alimentação} = SFR \times \text{volume de cultura de células totais} \times \text{densidade celular viável} \quad (1)$$

em que a taxa de alimentação é expressa em litros por dia, em que o SFR é a taxa de alimentação específica, ou seja, a taxa na qual o meio de cultura celular é alimentado para a cultura celular expressa como o volume de meio adicionado por unidade viável por unidade de tempo e em que a densidade celular viável é o número de células viáveis por unidade de volume. O número de células viáveis pode ser determinado pelo especialista na técnica, por exemplo através do método de exclusão de azul de tripano. A taxa de alimentação específica é de preferência escolhida entre 0,01 e 0,3 nL/célula/dia, mais preferencialmente entre 0,01 e 0,2 nL/célula/dia.

Pode ser vantajoso levar em consideração parâmetros adicionais ao ajustar a taxa de alimentação, por exemplo, a quantidade de glicose a ser alimentada na cultura e/ou a taxa de absorção de oxigénio. Por exemplo, para PER.C6, a velocidade de alimentação do meio de cultura celular e/ou os nutrientes é de preferência escolhida de tal modo que a concentração de glicose é mantida entre 3 e 20 mmol/L, mais preferencialmente entre 5 e 15 mmol/L. De preferência, a concentração de glicose é de, pelo menos, 3 mmol/L, mais preferencialmente, pelo menos, 5 mmol/L e de preferência no

máximo 20 mmol/L, mais preferencialmente no máximo 15 mmol/L.

Numa forma de realização especial da invenção, a cultura de células (compreendendo células, substância biológica e meio de cultura de células) é removida pelo menos uma vez do reator e líquido, por exemplo, meio de cultura celular ou uma alimentação nutriente é adicionada ao reator para compensar a célula remoção de cultura. A remoção da cultura de células pode levar a tempos de processo mais longos em altas densidades celulares em combinação com viabilidades celulares elevadas resultando em maior produtividade. A cultura de células pode ser removida de forma contínua ou gradual.

Numa forma de realização preferida da invenção, a cultura celular (compreendendo células, meio de cultura celular e substância biológica) é removida do reator logo que a densidade celular desejada, por exemplo, uma densidade celular de, pelo menos, 10.10^6 células viáveis/ml, de preferência de pelo menos $20,10^6$ células viáveis/ml, mais preferencialmente de pelo menos $30,10^6$ células viáveis/ml, por exemplo, uma densidade celular de no máximo 200.10^6 células viáveis/ml são atingidas e líquido, por exemplo, meio de cultura de células ou alimentação de nutrientes é adicionado ao reator para compensar a remoção da cultura de células. De preferência, a cultura celular é removida a uma velocidade tal que a densidade celular permaneça na gama de densidade celular desejada. Esta forma de realização da invenção é altamente vantajosa em comparação com um processo convencional de lote ou de processo alimentado, uma vez que combina as vantagens do processo da invenção com elevada viabilidade que pode ser mantida mais longa, permitindo realizar uma produtividade volumétrica global ainda maior. Com "produtividade volumétrica" entende-se a

quantidade de substância biológica produzida por unidade de volume do reator por unidade de tempo e geralmente é expressa em $gL^{-1}.dia^{-1}$. Em comparação com um processo de perfusão convencional, esta forma de realização da invenção é também altamente vantajosa à medida que combina as vantagens do processo da invenção com uma corrente de remoção de cultura de células possuindo uma elevada concentração de substância biológica. A alta concentração de substância biológica no fluxo de remoção de cultura de células torna comercialmente interessante a colheita da substância biológica a partir de lá. Em um processo de perfusão convencional em que a cultura de células é removida, o fluxo de remoção da cultura celular não contém substância biológica suficiente para tornar comercialmente valioso a colheita da substância biológica e o fluxo de remoção da cultura de células é geralmente considerado como um desperdício. Assim, nesta forma de realização da invenção, em teoria, toda substância biológica produzida pode ser colhida de maneira direta, economicamente fazível e de um modo simples.

Numa forma de realização particularmente preferida da invenção, as condições de cultura celular são escolhidas de tal modo que a taxa de crescimento celular e/ou a produtividade específica das células não é limitada e mais preferencialmente de tal modo que também a concentração de pelo menos um dos componentes da cultura celular O meio, tal como glicose ou glutamina permanece constante e a cultura celular é removida, pelo menos, uma vez do reator assim que a densidade celular desejada é atingida e líquido, por exemplo, meio de cultura de células é adicionado ao reator para compensar a remoção da cultura de células.

De preferência, a taxa do fluxo de saída é escolhida de modo a que seja substancialmente igual à taxa da adição do pelo menos um componente de meio de cultura celular, por exemplo,

nutrientes e/ou meio de cultura de células menos a taxa da remoção opcional de cultura de células.

As células que produzem uma substância biológica são, por exemplo, células capazes de expressar um gene que codifica a substância biológica. As células capazes de expressar um gene que codifica a substância biológica podem, por exemplo, ser preparadas por transfecção das células com um plasmídeo contendo o gene que codifica a substância biológica e um gene que codifica um marcador de seleção adequado, por exemplo um gene que codifica uma resistência a neomicina (gene marcador Neo). As células transfectadas de forma estável podem então ser selecionadas por pressão de seleção, por exemplo - no caso de um gene marcador Neo - cultivando as células transfectadas na presença de G418 (genéricos) e triagem imediata das células para células que exibem expressão de alto nível de a substância biológica. Métodos para a preparação de clones de células HER imortalizadas de E1 que expressam uma proteína e métodos para cultivar tais células para produzir a proteína são bem conhecidos dos peritos e podem, por exemplo, ser encontrados na US 6855544.

As substâncias biológicas, que podem ser produzidas pelas células, por exemplo, expressando uma codificação de gene (recombinante), são, por exemplo, proteínas (recombinantes), em particular recetores, enzimas, proteínas de fusão, proteínas do sangue tais como proteínas da cascata de coagulação do sangue, proteínas multifuncionais, tais como, por exemplo, eritropoietina, vírus ou proteínas bacterianas, por exemplo, para uso em vacinas; imunoglobulinas tais como anticorpos, por exemplo IgG ou IgM, e semelhantes; de preferência, uma proteína, mais preferencialmente um anticorpo é produzido pelas células. De preferência, as substâncias biológicas tais como proteínas ou vacinas produzidas pelas células podem ser utilizadas como um

ingrediente ativo numa preparação farmacêutica. No contexto da presente invenção, os termos "produto" e "substância biológica" são intercambiáveis.

No quadro da presente invenção, com preparação farmacêutica entende-se qualquer preparação, que pode ser utilizada como medicamento, em particular como um medicamento em seres humanos. Tal medicamento pode, por exemplo, ser utilizado para o diagnóstico, ou para fins profiláticos, tais como, por exemplo, uma vacina e / ou para fins terapêuticos, tais como, por exemplo, uma enzima ou proteína para a qual um doente é deficiente ou um anticorpo para matar indesejável células. Uma preparação farmacêutica pode ainda conter um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável, exemplos dos quais são bem conhecidos do especialista na técnica.

A linha celular PER.C6 pode ser utilizada para a produção de substâncias biológicas, como o adenovírus excluído por E1 (ver, por exemplo, a Patente US 6994128; Nichols et al, 2002, Propagation of adenoviral vectors: uso os PER.C6 cells. Em: Curiel D, Douglas JT, editores. Adenoviral vectors for gene therapy. San Diego: Elsevier. p 129-167), outros vírus (ver, por exemplo, a WO 01/38362), ou proteínas recombinantes (ver, por exemplo, a Patente US 6855544; Yallop et al, 2005, PER.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins, Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization, 4 Volumes, 779-807, Jörg Knäblein (Editor)).

Exemplos de proteínas que podem ser usadas como ingrediente ativo em preparações farmacêuticas (com a marca entre parênteses) incluem Tenecteplase (TN Kase™), fator antihemofílico (recombinante) (ReFacto™), Interferão α-n1 linfoblastoide (Wellferon™), (recombinante) Fator de coagulação (NovoSeven™), Etanercept, (Enbrel™), Trastuzumab (Herceptin™), Infliximab (Remicade™), Palivizumab (Synagis™), Basiliximab (Simulect™), Daclizumab (Zenapaz™),

Rituximab (Rituxan™), (recombinante) Fator de Coagulação IX (Benefix™) e Interferão β-1a (Avonex™).

Exemplos de vacinas que podem ser utilizadas como ingrediente ativo na preparação farmacêutica incluem antigénios de proteínas isoladas, exemplos dos quais incluem, mas não estão limitados a vacina viva, oral, tetravalente de Rotavírus (RotaShield™), vacina contra a raiva (RanAvert™), vacinas contra a gripe e vacina inativada contra hepatite A (VAQTA™).

O pH, a temperatura, a concentração de oxigénio dissolvido e a osmolaridade do meio de cultura de células não são, em princípio, críticas e dependem do tipo de célula escolhida. De preferência, o pH, a temperatura, a concentração de oxigénio dissolvido e a osmolaridade são escolhidos de modo que seja ótimo para o crescimento e a produtividade das células. O especialista na matéria sabe como encontrar o pH ideal, temperatura, concentração de oxigénio dissolvido e osmolaridade para a cultura (ver, por exemplo, a WO 2004/099396). De preferência, para o processo da invenção quando se utilizam células HER imortalizadas de E1, o pH é escolhido entre 6,6 e 7,6 e/ou a temperatura é escolhida entre 30 e 39°C e/ou a osmolaridade é escolhida entre 260 e 400mOsm/kg. Para manter condições de processo ótimas, é desejada a automação para controlar as condições do processo. Para otimizar as condições do processo, por exemplo, para obter uma parada de crescimento para aumentar a produtividade celular, durante a cultura pode ser aplicada uma mudança nas condições de cultura. Isto pode ser estabelecido, por exemplo, por uma mudança de temperatura (tal como de 37 a 32°C), uma mudança de pH ou uma mudança de osmolaridade.

O processo da presente invenção pode, em princípio, ser realizado em qualquer tipo de meio de cultura celular adequado para a cultura de células. As diretrizes para

escolher um meio de cultura celular e condições de cultura de células são bem conhecidas e, por exemplo, são fornecidas em Capítulo 8 e 9 de Freshney, RI Culture of animal cells (a manual of basic techniques), 4ª edição 2000, Wiley-Liss e em Doyle, A., Griffiths, JB, Newell, DG Cell & Tissue culture: Laboratory Procedures 1993, John Wiley & Sons.

Por exemplo, o meio de cultura de células pode, por exemplo, compreender como componente de meio de cultura de células uma fonte, sais e/ou aminoácidos e/ou vitaminas e/ou lípidos e/ou detergentes e/ou tampões e/ou fatores de crescimento e/ ou hormonas e/ou citocinas e/ou oligoelementos. Exemplos de fontes de carboidratos incluem glicose, frutose, galactose e piruvato. Exemplos de sais incluem sais de magnésio, por exemplo, $MgCl_2$.$6H_2O$, $MgSO_4$ e sais de ferro, por exemplo $FeSO_4$.$7H_2O$, sais de potássio, por exemplo KH_2PO_4, KCl; sais de sódio, por exemplo, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4 e sais de cálcio, por exemplo, $CaCl_2$.$2H_2O$. Os exemplos de aminoácidos incluem todos os aminoácidos conhecidos proteinogénicos, por exemplo histidina, glutamina, treonina, serina, metionina. Exemplos de vitaminas incluem: ascorbato, biotina, colina. Cl, mio-inositol, D-pantotenato, riboflavina. Exemplos de lípidos incluem: ácidos gordos, por exemplo ácido linoleico e ácido oleico; Exemplos de detergentes incluem Tween® 80 e Pluronic® F68. Exemplo de tampões incluem HEPES e NA_2CO_3. Exemplos de fatores de crescimento/hormonas/ citocinas incluem IGF (fator de crescimento similar a insulina), hidrocortisona e insulina (recombinante). Exemplos de oligoelementos são conhecidos do especialista na técnica e incluem Zn, Mg e Se. O meio de cultura celular pode, por exemplo, também compreender outros componentes do meio de cultura de células, por exemplo peptona de soja ou etanolamina.

Para a produção de substâncias biológicas de acordo com a invenção, em particular se as substâncias biológicas forem utilizadas como ingrediente ativo em preparações farmacêuticas, o meio livre de soro é preferido para meios contendo uma fonte de soro. A razão para isso é que o meio de origem sérica pode estar contaminado com vírus, apresentar o risco de infeções priónicas e pode criar um obstáculo importante no processamento a jusante do produto bio farmacêutico (ou seja, a posterior purificação da substância biológica a partir da cultura celular). Por conseguinte, o processo da invenção é de preferência realizado num meio de cultura de células que não compreende soro de um animal, incluindo a fonte humana. Uma vez que os compostos de uma fonte de mamífero também apresentam um risco de infeção, de preferência o meio de cultura de células é livre de mamíferos (isto é, o meio de cultura de células não compreende soro ou componentes de uma fonte de mamífero). Mais preferencialmente, o meio de cultura celular é livre de origem animal (isto é, o meio de cultura de células não compreende soro ou componentes de um animal, incluindo humanos, fonte. Exemplos de meio isento de soro que podem ser utilizados para a cultura de células PER.C6 incluem meio comercialmente disponível, como, por exemplo, o meio EXMC™ VPRO (SAFC), HyQ® CDM4Retino™ (HyClone), IS ProVec CD (Irvine scientific), 293-SFM II (invitrogen).

Em formas de realização preferidas, a substância biológica produzida no processo da presente invenção é colhida a partir do fluxo em que o conteúdo é mantido ou de preferência alimentado novamente no reator ou a partir da cultura de células que é removida do reator ou de ambos. A (s) substância (s) biológica (s) produzida (s) no processo da presente invenção podem ser colhidas adicionalmente a partir da cultura celular no chamado processamento a jusante, utilizando métodos dependentes da substância biológica,

cujos métodos são, como tal, bem conhecidos do especialista na matéria. O processamento a jusante geralmente compreende várias etapas de purificação em combinações e ordem variadas. Exemplos de passos de purificação no processamento a jusante são etapas de separação (por exemplo, por cromatografia de afinidade e/ou cromatografia de permuta iónica e/ou extração por sistemas aquosos de duas fases e/ ou precipitação por, por exemplo, sulfato de amónio), etapas para a concentração do biológico substância (por exemplo, por ultrafiltração ou diafiltração), etapas para trocar tampões e/ou etapas para remover ou inativar vírus (por exemplo, por filtração de vírus, mudança de pH ou tratamento com detergente solvente).

Num aspeto, a invenção refere-se a uma cultura celular compreendendo células de mamífero, de preferência células HER imortalizadas de E1, mais preferencialmente células PER.C6, possuindo uma densidade celular viável de pelo menos 50.10^6 células/mL, de preferência pelo menos 60.10^6 células/ mL, em particular, pelo menos, $90,10^6$ células/mL e uma concentração de substância biológica de, pelo menos, 5 g/L, mais preferencialmente, pelo menos, 10 g/L, em particular, pelo menos, 11 g/L. Em princípio, a concentração da substância biológica pode ser tão alta como a solubilidade da substância biológica permite. A concentração de células viáveis é tipicamente não superior a 200.10^6 células/mL e de preferência dentro da gama de $80-150.10^6$ células/mL.

A densidade de célula viável pode, por exemplo, ser determinada utilizando o método de exclusão de azul de triptano por exemplo, utilizando um contador de células, tal como comercialmente disponível, por exemplo, de Innovatis (contador de células Cedex).

Com a cultura celular entende-se o líquido compreendendo meio de cultura de células, células e substância biológica,

que é o líquido de um processo para a cultura de células num reator num meio de cultura celular, em que as células produzem a substância biológica.

A invenção será agora elucidada por meio dos seguintes exemplos sem, contudo, ser limitada a isso.

Descrição das figuras

Fig. 1/9 - mostra a densidade celular viável Y (10^6.ml^{-1}) traçada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) e C1 (processo da invenção).

Fig. 2/9 - mostra a concentração de IgG no reator Z (% em comparação com a concentração de IgG no processo A) em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) e C1 (processo da invenção).

Fig. 3/9 - mostra a densidade celular viável Y (10^6.ml^{-1}) traçada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) C2 (processo da invenção).

Fig. 4/9 - mostra a concentração de IgG no reator Z (% em comparação com a concentração de IgG no processo A) em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) e C2 (processo da invenção).

Fig. 5/9 - mostra a densidade celular viável Y (10^6.ml^{-1}) traçada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) C3 (processo da invenção).

Fig. 6/9 - mostra a concentração de IgG no reator Z (em comparação com a concentração de IgG no processo A3) em relação ao tempo de processamento X (dias) para o processo A e C3.

Fig. 7/9 - mostra o rendimento cumulativo Q (% em comparação com o rendimento no processo A, por volume do reator L)

traçado em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A, B e C3.

Fig. 8/9 - mostra o número de célula Y (10^6.ml^{-1}) traçado em relação ao tempo de processo X (dias) para C4 (processo da invenção).

Fig. 9/9 - mostra a concentração de IgG no reator Z (% em comparação com a concentração máxima de IgG alcançada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo C4 (uma forma de realização do processo da invenção)

Exemplos

Exemplo 1: Comparação entre um processo em lote, um processo de lote alimentado e o processo de acordo com a invenção.

Neste exemplo, o desempenho do processo de acordo com a presente invenção foi comparado aos processos em lote e alimentados por lote.

A Fig. 1/9 mostra a densidade celular viável Y (10^6 .ml^{-1}) traçada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) e C1 (processo da invenção).

A Fig. 2/9 mostra a concentração de IgG no reator Z (% em comparação com a concentração de IgG no processo A) em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) e C1 (processo de a invenção).

Todas as fermentações foram realizadas usando um controlador Sartorius Biostat B para controlar a temperatura a 36,5°C, o pH entre 7,2 e 6,8 e o DO a 50% de saturação de ar e a 200 rpm. A mesma linha de células PER.C6 que produz IgG (ver a WO 2004/099396) foi utilizado em todas as experiências.

Processo em lote A

O processo do lote foi executado com 4 L de volume de trabalho em um recipiente Sartorius B5. As células foram inoculadas

a 3x10e5 células/mL em meio VPRO (SAFC) suplementado com L-glutamina 6 mM e subsequentemente cultivadas durante 17 dias.

Processo de alimentação em lote B

O processo alimentado por lote foi executado com 4 L de volume de trabalho em um recipiente Sartorius B5. As células foram inoculadas a 3x10e5 células/mL em meio VPRO (SAFC) suplementado com 6 mM de L-Glutamina. Durante a cultura, foram adicionados glicose e glutamina para manter a concentração acima, respetivamente, 15 mM e 1 mM. Os aminoácidos e os péptidos foram adicionados a partir do dia 5 para reabastecer os aminoácidos consumidos.

Processo da invenção C1

O processo da invenção foi realizado num recipiente Applikon de 2 L. Uma membrana de fibra oca de corte de peso molecular de 100 kDa obtida da General Electric (GE) operada em modo de fluxo ATF com um sistema ATF-2 (Refine Technology) foi usada para reter as células e o produto IgG. A cultura foi iniciada com 3x10e5 células/mL em meio VPRO (SAFC) suplementado com L-Glutamina a 6 mM. O meio de cultura VPRO (SAFC) suplementado com L-Glutamina a 6 mM foi perfundido através da cultura de células em suspensão utilizando uma Taxa de Fluxo Específico (SFR) entre 0,05 e 0,2 nL/célula/dia. A maior concentração de produto obtida foi de 1,4 g/L.

O processo da invenção resultou em maiores densidades celulares viáveis e aumento das concentrações de produto em comparação com os modos de cultivo mencionados em menos tempo, como pode ser visto a partir da Fig. 1 e da Fig. 2 abaixo.

Exemplo 2: Comparação entre um processo em lote, um processo alimentado por lote e o processo de acordo com a invenção.

Neste exemplo, o processo de acordo com a presente invenção é novamente comparado aos processos em lote e alimentados por lote; no processo C2, a pressão de CO_2 é controlada e um sistema de separação de 50 kDa foi usado.

A Fig. 3/9 mostra a densidade celular viável Y (10^6.ml^{-1}) traçada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) C2 (processo da invenção).

A Fig. 4/9 mostra a concentração de IgG no reator Z (% em comparação com a concentração de IgG no processo A) em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) e C2 (processo de a invenção)

Todas as fermentações foram realizadas usando um controlador Sartorius Biostat B para controlar a temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 e 6,8 e DO a 50% de saturação de ar e a 200 rpm. O mesmo IgG (de aproximadamente 150kDa) produzindo linha celular PER.C6 (ver a WO 2004/099396) foi utilizado em todas as experiências.

Processo em lote A

O processo do lote foi executado com 4 L de volume de trabalho em um recipiente Sartorius B5. As células foram inoculadas em $3,10^5$ células.m^{-1} em meio VPRO (SAFC) suplementado com 6 mM de L-glutamina e subsequentemente cultivadas durante 17 dias.

Processo de alimentação em lote B

O processo alimentado em lote foi executado com 4 L de volume de trabalho em um recipiente Sartorius B5. As células foram inoculadas a 3.10^5 células.mL^{-1} em meio VPRO (SAFC) suplementado com L-Glutamina 6 mM. Durante a cultura, foram adicionados glicose e glutamina para manter a concentração acima, respetivamente, 15 mM e 1 mM. Os aminoácidos e os

péptidos foram adicionados a partir do dia 5 para reabastecer os aminoácidos consumidos.

Processo da invenção C2

O processo da invenção foi realizado num recipiente Applikon de 2 L. Uma membrana de fibra oca de peso molecular (GECO) de 50 kDa operada em modo de fluxo ATF com um sistema ATF-2 (Refine Technology) foi usada para reter as células e o produto IgG. A cultura foi iniciada com 3x10e5 células/mL em meio VPRO (SAFC) suplementado com L-Glutamina a 6 mM. Meio de cultura VPRO (SAFC) suplementado com 6 mM de L-glutamina é perfundido através da cultura de células em suspensão utilizando uma SPR entre 0,05 e 0,2 $nL.célula^{-1}.dia^{-1}$. A pressão de CO_2 foi controlada abaixo de 15%.

Resultado

Como pode ser visto a partir da Fig. 3/9 e da Fig. 4/9, o processo de acordo com a invenção resulta em densidades de células viáveis significativamente aumentadas e aumento das concentrações do produto (2415% x rendimento em lote, 690% x rendimento de alimentação em lote) em igual ou menor tempo (100% do tempo do lote, 81% do tempo de alimentação em lote).

O aumento global da produtividade em $gL^{-1}.dia^{-1}$ do processo da invenção é 23,9 vezes a produtividade do lote em $gL^{-1}.dat^{-1}$) e 8,5 vezes a produtividade da alimentação em lote em $gL^{-1}.dat^{-1}$. No processo da invenção C2, produziu-se 11,1 g de produto/L. O entupimento do dispositivo de retenção não ocorreu durante 17 dias, mesmo com densidade celular muito alta.

Exemplo 3: Comparação entre um processo em lote, um processo de lote alimentado e o processo de acordo com a invenção.

Neste exemplo, o desempenho do processo de acordo com o presente invento com remoção de cultura de células e novamente comparado a processos em lote e alimentados por lote; no processo, a cultura celular C3 foi removida.

A Fig. 5/9 mostra a densidade celular viável Y (10^6.ml^{-1}) traçada em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A (lote), B (alimentado-lote) C3 (processo da invenção).

A Fig. 6/9 mostra a concentração de IgG no reator Z (em comparação com a concentração de IgG no processo A3) em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A e C3.

A Fig. 7/9 mostra o rendimento cumulativo Q (% em comparação com o rendimento no processo A, por volume do reator L) traçado em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo A, B e C3.

Todas as fermentações foram realizadas usando um controlador Sartorius Biostat B para controlar a temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 e 6,8 e DO a 50% de saturação de ar e a 200 rpm. O mesmo IgG (de aproximadamente 150kDa) produzindo linha celular PER.C6 (ver a WO 2004/099396) foi utilizado em todas as experiências.

Processo em lote A

O processo do lote foi executado com 4 L de volume de trabalho em um recipiente Sartorius B5. As células foram inoculadas em $3,10^5$ células.mL^{-1} em meio VPRO (SAFC) suplementado com 6 mM de L-glutamina e subsequentemente cultivadas durante 17 dias.

Processo de alimentação em lote B

O processo alimentado em lote foi executado com 4 L de volume de trabalho em um recipiente Sartorius B5. As células foram inoculadas a 3.10^5 células.mL^{-1} em meio VPRO (SAFC) suplementado com L-Glutamina 6 mM. Durante a cultura, foram adicionados glicose e glutamina para manter a concentração acima, respetivamente, 15 mM e 1 mM. Os aminoácidos e os péptidos foram adicionados a partir do dia 5 para reabastecer os aminoácidos consumidos.

Processo da invenção C3

O processo da invenção foi realizado num recipiente Applikon de 2 L. Uma membrana de fibra oca de peso molecular (GECO) de 100 kDa operada em modo de fluxo ATF com um sistema ATF-2 (Refine Technology) foi usada para reter as células e o produto IgG. A cultura foi iniciada com 3x10e5 células/mL em meio VPRO (SAFC) suplementado com L-Glutamina a 6 mM. Meio de cultura VPRO (SAFC) suplementado 6 mM de L-glutamina é perfundido através da cultura de células em suspensão utilizando uma SPR entre 0,05 e 0,2 nL.célula^{-1}.dia^{-1}. A cultura celular é removida a 10% do volume de trabalho por dia acima de 10.10^6 células.mL^{-1} e a 30% do volume de trabalho por dia quando a densidade celular viável excede 30.10^6 células.mL^{-1} e em diante.

Resultado

Como pode ser visto na Fig. 5/9 com o processo da invenção, as densidades celulares viáveis mais elevadas são alcançadas rapidamente. Além disso, a Fig. 5/9 também mostra que a viabilidade das células pode ser mantida mais longa com o processo da invenção à medida que o processo C3 foi mantido em operação durante um período de quase 40 dias, porque nenhuma obstrução do dispositivo de retenção ocorreu mesmo com alta densidade celular.

A Fig. 6/9 mostra que as concentrações do produto para o processo da presente invenção são muito superiores à

concentração do produto no processo descontínuo. O fluxo de produto contendo o produto foi colhido a partir do processo C3 a aproximadamente 200% a 250% vezes a concentração final no processo de lote A.

A Fig. 7/9 mostra que a maioria dos produtos é formada pelo processo da presente invenção e que o processo da invenção pode ser mantido mais longo do que o processo descontínuo A ou o lote alimentado B. No dia 17, o rendimento cumulativo do processo C3 é 8,1 vezes o rendimento cumulativo do processo em lote (A3) e 2,1 vezes o rendimento cumulativo do processo alimentado (B). Além disso, no dia 17, o processo em lote terminou. No dia 21, o rendimento cumulativo do processo C3 é 3,0 vezes o rendimento cumulativo do processo do lote alimentado B. No dia 21, o processo alimentado-lote terminou. Após 39 dias, o rendimento cumulativo global do processo C3 é 25 vezes o rendimento cumulativo do processo descontínuo A e 6 vezes o rendimento do processo do lote alimentado B.

Pode concluir-se a partir desta experiência que o rendimento global de um material biológico desejado no processo de acordo com a presente invenção pode ser ainda melhorado aplicando uma hemorragia da cultura de células quando a densidade celular excede um certo nível elevado.

Exemplo 4: Culturas e produção com células CHO.

Neste exemplo, o processo de acordo com a presente invenção foi realizado com uma linha celular CHO produzindo IgG e inclui uma queda de temperatura para diminuir o crescimento celular.

A Fig. 8/9 mostra o número de células Y (10^6.ml^{-1}) traçado em relação ao tempo de processo X (dias) para C4 (processo da invenção).

A Fig. 9/9 mostra a concentração de IgG no reator Z (% em comparação com a concentração máxima de IgG atingida em relação ao tempo de processo X (dias) para o processo C4 (uma forma de realização do processo da invenção)

A fermentação foi realizada utilizando um controlador Sartorius Biostat B para controlar a temperatura a 36,5°C, pH entre 7,1 e 6,9 e DO a 40% de saturação de ar e a 100 rpm. A temperatura caiu para 32°C no dia 5.

Processo da invenção C4

O processo da invenção foi realizado num recipiente Applikon de 2 L. O dispositivo de retenção de células e produtos é uma membrana de fibra oca Molecular Weight Cut-Off (MWCO) de 50 kD (General Electric) operada em modo de fluxo ATF com um sistema ATF-2 (Refine Technology). A cultura foi iniciada com 5.10^6 células.mL^{-1} no meio de cultura MTCM-49 (Hyclone). O meio foi submetido a perfusão através da cultura de células em suspensão utilizando uma SPR entre 0,1 e 0,4 nL.células^{-1}.dia^{-1}. A pressão de CO_2 foi controlada abaixo de 15%.

Resultado

Os dados mostram que o processo da invenção também funciona quando se utiliza uma linha de células CHO que produz proteínas. A densidade celular alcançada e as concentrações do produto são aumentadas em comparação com a cultura em lote. Os dados também mostram que, no processo de acordo com a presente invenção, o crescimento celular pode ser preso (por exemplo, por uma queda de temperatura), enquanto a acumulação de produto no sistema de cultura continua.

Exemplo 5: Processo da invenção realizado com uma linha celular de mieloma.

O processo de acordo com a presente invenção também pode ser aplicado a linhas celulares de mieloma. Para este fim, a fermentação é realizada utilizando um controlador Sartorius

Biostat B para controlar a temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 e 6,8 e DO a 40% de saturação de ar e a 100 rpm. A cultura celular começa com a inoculação das células de mieloma em 3x10e5 células/ml em meio de cultura de SFM4Mab (Hyclone) em um vaso de 5 L de Sartorius. O dispositivo de retenção de células e produtos é uma membrana de fibra oca Molecular Weight Cut-Off (MWCO) de 30 kD (General Electric) operada em modo ATF com um sistema ATF-4 (Refine Technology). O meio de cultura SFM4Mab (Hyclone) é perfundido através da cultura de células em suspensão usando um SPR entre 0,1 e 0,4 nL.célula^{-1}.dia^{-1}. A pressão de CO_2 é controlada abaixo de 15%.

Exemplo 6: Processo da invenção realizado com uma linha celular MDCK.

O processo de acordo com a presente invenção também pode ser aplicado em linhas de células MDCK transformadas em suspensão. Para este fim, a fermentação é realizada utilizando um controlador Sartorius Biostat B para controlar a temperatura a 36,5°C, pH entre 7,2 e 6,8 e DO a 40% de saturação de ar e a 100 rpm. A cultura celular começa com a inoculação das células MDCK transformadas a 3x10e5 células/ml em meio de cultura VP-SFM (Invitrogen) em um vaso Sartorius de 5 L. O dispositivo de retenção de células e produtos é uma membrana de fibra oca Molecular Weight Cut-Off (MWCO) de 30 kD (General Electric) operada em modo ATF com um sistema ATF-4 (Refine Technology). O meio de cultura VP-SFM (Invitrogen) é perfundido através da cultura de células em suspensão usando um SPR entre 0,1 e 0,4 nL.célula^{-1}.dia^{-1}. A pressão de CO_2 é controlada abaixo de 15%.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a cultura de células eucarióticas num reator em suspensão num meio de cultura de células, em que as células produzem uma substância biológica desejada selecionada a partir de proteínas e vacinas, que pode ser utilizada como ingrediente ativo numa preparação farmacêutica,

   pelo que, pelo menos, um componente de meio de cultura de uma célula é alimentado à cultura de células e em que a cultura celular compreendendo as células, a substância biológica desejada e o meio de cultura de células é circulado sobre um filtro usando um fluxo tangencial e em que o filtro possui um tamanho de poro caracterizado por um corte de peso molecular de pelo menos 30 kDa e no máximo 100 kDa, adequado para separar a substância biológica desejada de substâncias com um peso molecular mais baixo do que a substância biológica desejada,

   em que o fluxo de saída do líquido do filtro contém essencialmente apenas componentes que possuem um peso molecular inferior ao da substância biológica desejada e em que a substância biológica desejada é retida ou alimentada de volta ao reator.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a substância biológica desejada é codificada por pelo menos um gene transfectado para dentro das células.

3. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, em que a substância biológica desejada é uma IgG.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que as células eucarióticas são células de mamífero.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que as células de mamífero são células CHO, hibridomas, células BHK, células de mieloma, células humanas ou células de ratinho.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que as células humanas são células HEK-293, células linfoblastoides humanas ou células HER imortalizadas de E1.

7. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que as células de ratinho são células NS0.

8. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que as células de mamífero são células CHO.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que as células têm uma viabilidade celular de, pelo menos, 98%.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a substância biológica é colhida das células e/ou da cultura celular.

Fig.1/9

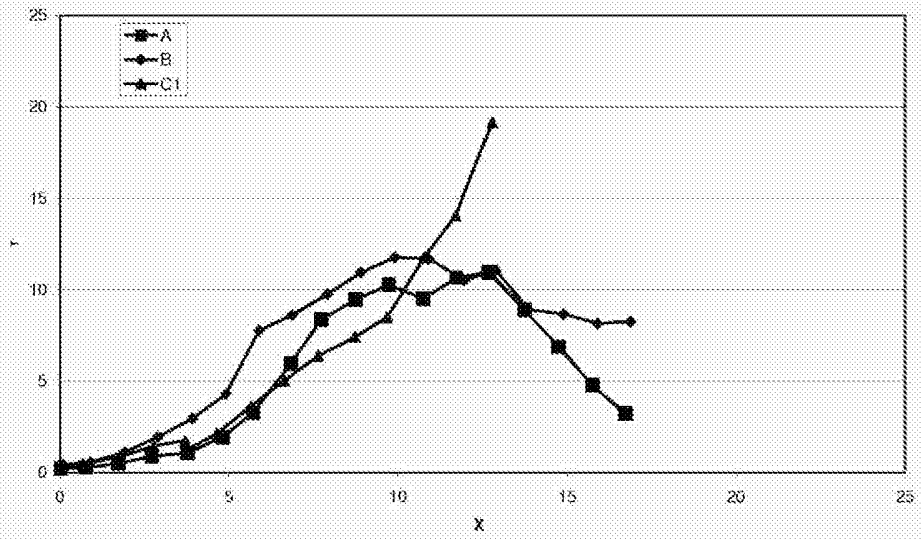

A
B
C1
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
Y
X

Fig.2/9

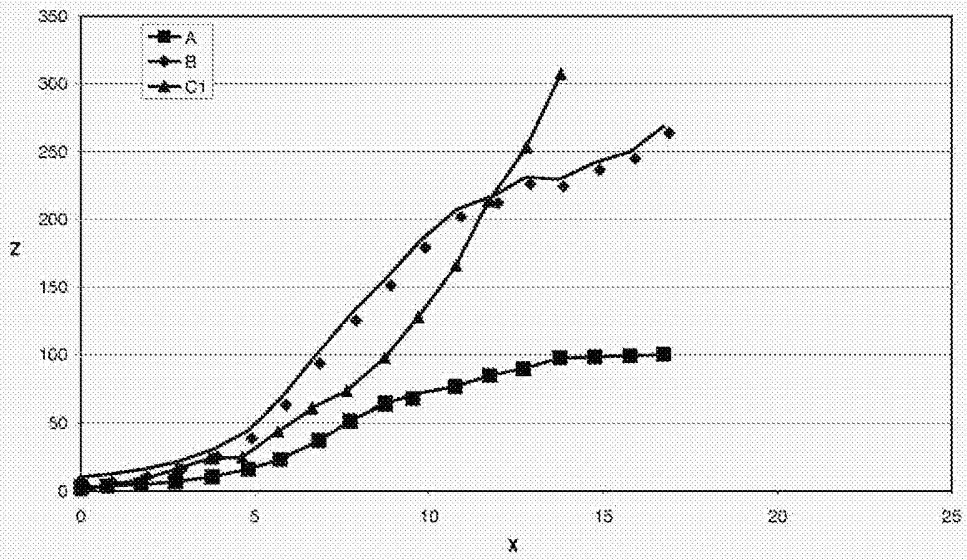

A
B
C1
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
Z
X

Fig 3/9

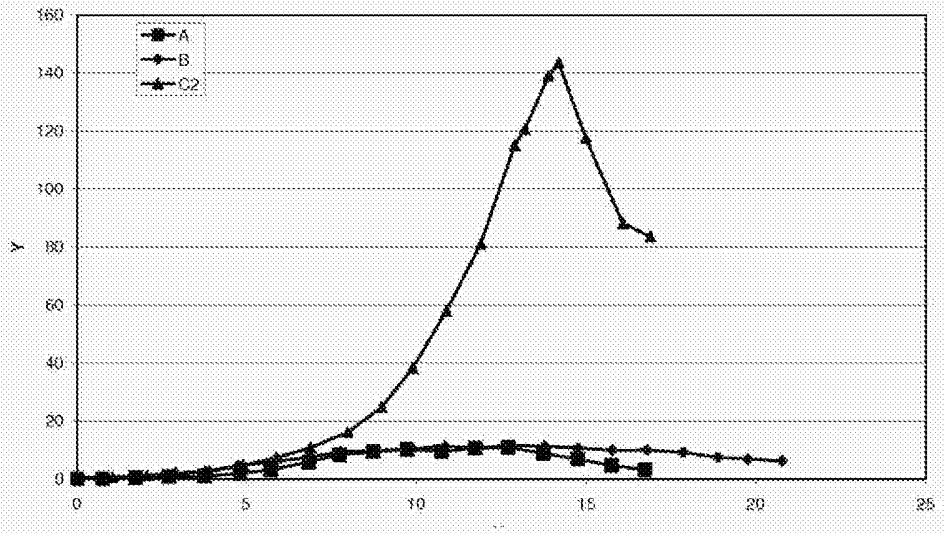

A
B
C2
Y
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25

Fig. 4/9

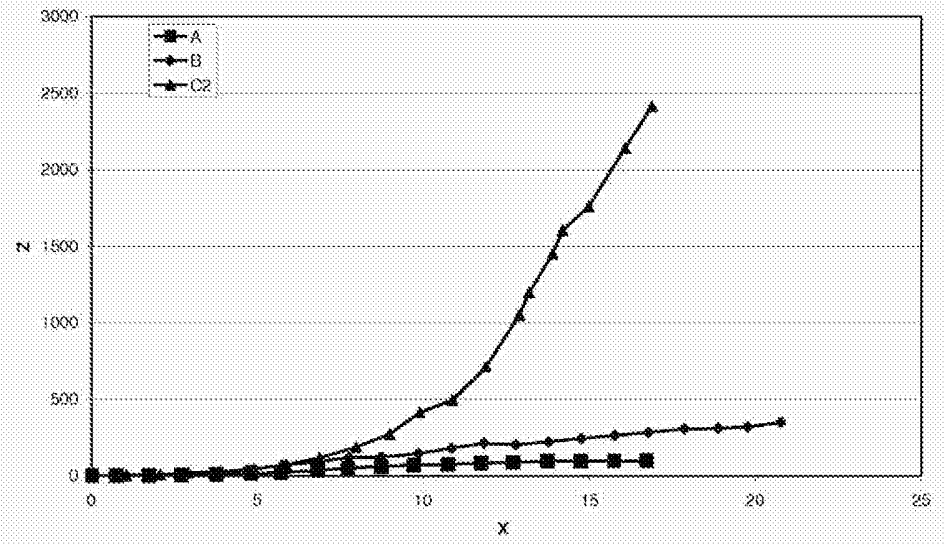

A
B
C2
Z
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
X

Fig. 5/9

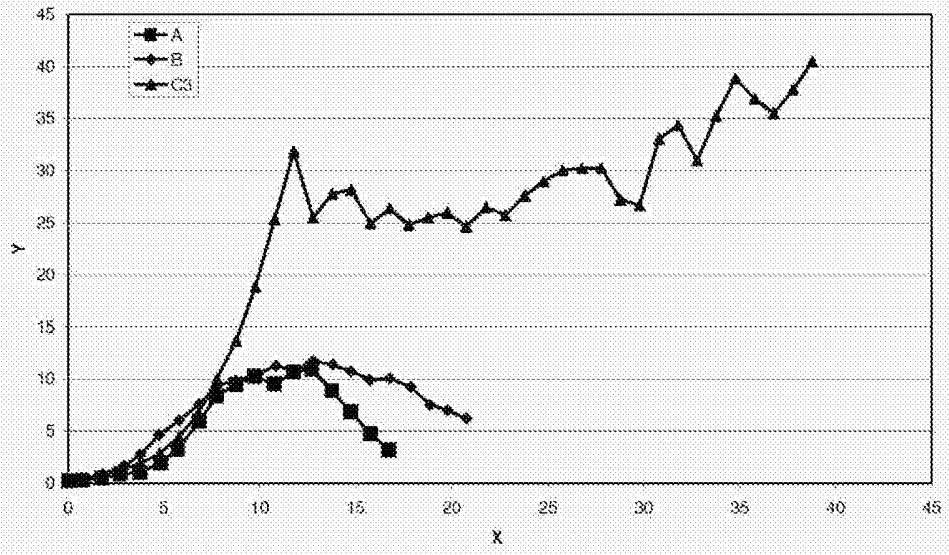

A
B
C3
Y
X
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

Fig. 6/9

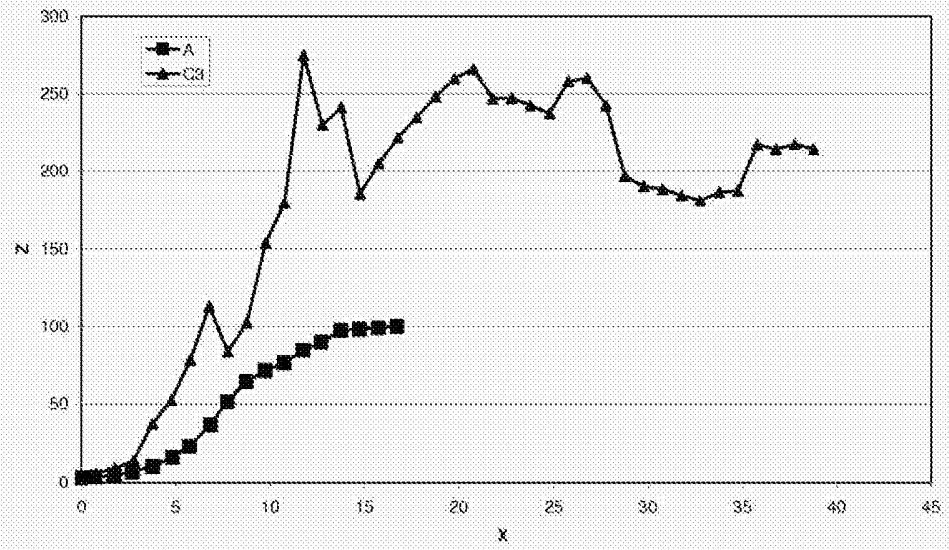

A
C3
Z
X
0
50
100
150
200
250
300
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45

Fig. 7/9

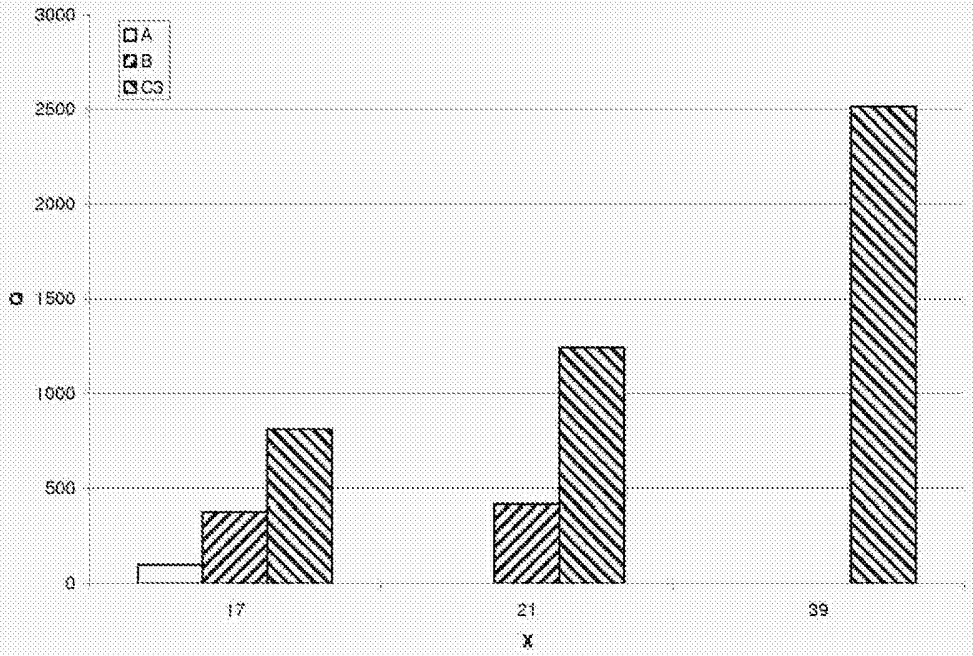

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Q
A
B
C3
17
21
39
X

Fig. 8/9

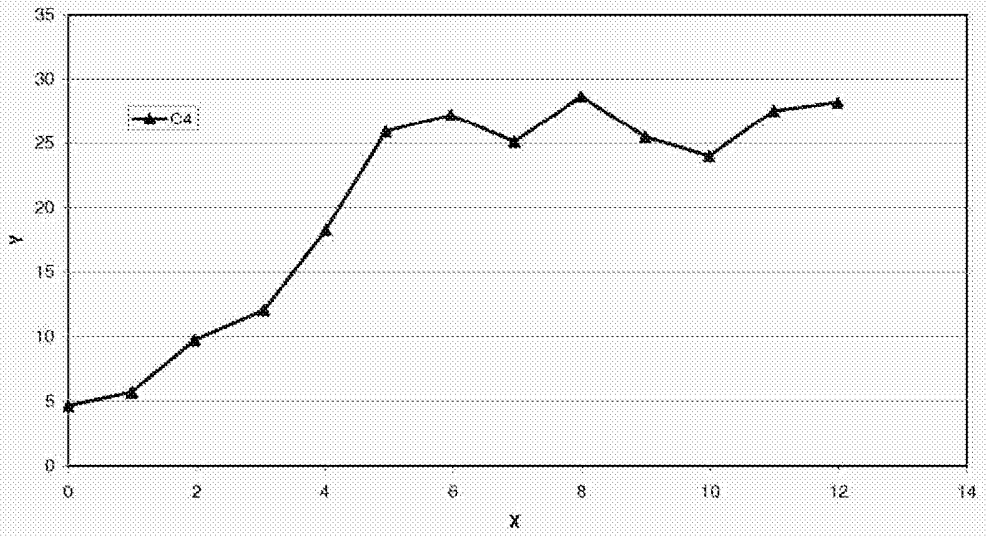

35
30
25
20
15
10
5
0
Y
C4
0
2
4
6
8
10
12
14
X

Fig. 9/9

