

MÉTODO MEJORADO PARA AUMENTAR EL RENDIMIENTO DE UNA SUSTANCIA FARMACÉUTICA

CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere, en general, al campo del rendimiento de sustancias farmacéuticas proteicas.

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio, conforme al artículo 35 U.S.C. 119, de la Solicitud Provisional de Patente de EE. UU. con número de serie 63/540.749, presentada el 27 de septiembre de 2023, cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud se presenta electrónicamente a través de EFS-Web e incluye un listado de secuencias presentado electrónicamente en formato .xml en formato ST.26. El archivo .xml contiene un listado de secuencias titulado "024_seq_LISTING.xml" creado el 22 de agosto de 2024, y que tiene un tamaño de 4.338 bytes y 8.196 bytes en el disco. El listado de secuencias contenido en este archivo .xml forma parte de la memoria descriptiva y se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

Sin limitar el alcance de la descripción, sus antecedentes se describen en relación con métodos que mejoran la producción de masa celular de cuerpos de inclusión y/o el rendimiento proteico de una proteína de interés, tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), interferón alfa humano, interferón beta humano, interferón alfa 2b humano, Pro-hIFN- α 2b, anticuerpos monoclonales y/o cualquier proteína o intermediario de los mismos.

Se sabe que los productos biológicos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, proteínas grandes como el interferón, GCSF, etc.) en la industria farmacéutica son impredecibles para preparar y fabricar consistentemente, debido al hecho de que la mayoría de las proteínas o "moléculas grandes" se derivan naturalmente. El proceso de fabricación de estas proteínas típicamente implica la fermentación

de una célula huésped, seguido por el procesamiento celular, la purificación, o alguna otra reacción química para modificar aún más la proteína.

Sin embargo, las producciones a gran escala de estas proteínas son típicamente difíciles y dan como resultado un bajo rendimiento desde la perspectiva económica.

Otro desafío asociado con la producción de proteína reside en el control del procesamiento celular durante la fermentación y/o posfermentación, puesto que la proteína típicamente debe fabricarse con un determinado volumen o condición de producción, y las características de cada lote pueden ser diferentes; por lo tanto, también lo es el rendimiento de la proteína o de la masa celular.

Por lo tanto, existe la necesidad de un nuevo método para producir estas diversas proteínas y/o intermediarios en cantidades mayores a las conocidas actualmente por un experto en la materia.

SÍNTESIS

La presente descripción se refiere a métodos para aumentar el rendimiento de la fermentación para la producción de proteínas.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, que comprende realizar una o más fermentaciones de proteína recombinante mediante cultivo por lote alimentado (fed-batch). La fermentación de proteínas recombinantes mediante cultivo por lote alimentado comprende las etapas de: realizar la siembra (tiempo S_0) de un cultivo de células huésped procariotas modificadas genéticamente para expresar de forma inducible una proteína recombinante, y transferir el cultivo a uno o más fermentadores, cada uno de los cuales contiene un medio de cultivo; medir el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH en dicho uno o más fermentadores; suministrar una solución de alimentación de fuente de carbono a cualquiera de los uno o más fermentadores, mediante un mecanismo controlado por programa, individualmente, siempre que se cumplan la condición o las condiciones (i) y/o (ii): (i) dicho nivel de OD supere aproximadamente 35% a 45% y dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 300 a 1000 rpm; (ii) dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 400 a 700 rpm y dicho pH supere

aproximadamente 7,0 a 7,4; y suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores en los que se haya iniciado la inducción de la expresión de la proteína recombinante, individualmente, aproximadamente en I_0 (tiempo de inicio de la inducción) o I_1 , o en ambos; opcionalmente, suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores, individualmente, en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} . En otra realización, el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH se monitorean continuamente y/o periódicamente en un intervalo de tiempo dado.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, que comprende realizar una o más fermentaciones de proteína recombinante mediante cultivo por lotes alimentados. La fermentación de proteínas recombinantes mediante cultivo por lote alimentado comprende las etapas de: realizar la siembra (tiempo S_0) de un cultivo de células huésped procariotas modificadas genéticamente para expresar de forma inducible una proteína recombinante, y transferir el cultivo a uno o más fermentadores, cada uno de los cuales contiene un medio de cultivo; medir el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH en dicho uno o más fermentadores; suministrar una solución de alimentación de fuente de carbono a cualquiera de los uno o más fermentadores, siempre que se cumplan la condición o las condiciones (i) y/o (ii): (i) dicho nivel de OD supere aproximadamente 35% a 45% y dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 300 a 1000 rpm; (ii) dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 400 a 700 rpm y dicho pH supere aproximadamente 7,0 a 7,4; y suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores en los que se haya iniciado la inducción de la expresión de la proteína recombinante, individualmente, aproximadamente en I_0 (tiempo de inicio de la inducción) o I_1 , o en ambos; opcionalmente, suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores, individualmente, en uno o más puntos temporales seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} . En otra realización, el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH se monitorean continuamente y/o periódicamente en un intervalo de tiempo dado.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, que comprende realizar una o más fermentaciones de proteína recombinante por lote. La fermentación de proteínas recombinantes por lote comprende las etapas de: realizar la siembra (tiempo S_0) de un cultivo de células huésped procariotas modificadas genéticamente para expresar de forma inducible una proteína recombinante, y transferir el cultivo a uno o más fermentadores, cada uno de los cuales contiene un medio de cultivo; medir el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH en el uno o más fermentadores; suministrar una solución de alimentación de fuente de carbono a cualquiera de los uno o más fermentadores, siempre que se cumplan la condición o las condiciones (i) y/o (ii): (i) dicho nivel de OD supere aproximadamente 35% a 45% y dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 300 a 1000 rpm; (ii) dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 400 a 700 rpm y dicho pH supere aproximadamente 7,0 a 7,4; y suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores en los que se haya iniciado la inducción de la expresión de la proteína recombinante, individualmente, aproximadamente en I_0 (tiempo de inicio de la inducción) o I_1 , o en ambos; opcionalmente, suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores, individualmente, en uno o más puntos temporales seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} . En otra realización, el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH se monitorean continuamente y/o periódicamente en un intervalo de tiempo dado.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, que comprende realizar una o más fermentaciones de proteína recombinante por lote. La fermentación de proteínas recombinantes mediante lote alimentado comprende las etapas de: realizar la siembra (tiempo S_0) de un cultivo de células huésped procariotas modificadas genéticamente para expresar de forma inducible una proteína recombinante, y transferir el cultivo a uno o más fermentadores, cada uno de los cuales contiene un medio de cultivo; medir el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH en dicho uno o más fermentadores; suministrar una solución de alimentación de fuente de

carbono a cualquiera de los uno o más fermentadores usando un mecanismo controlado por programa, individualmente, siempre que se cumplan la condición o las condiciones (i) y/o (ii): (i) dicho nivel de OD supere aproximadamente 35% a 45% y dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 300 a 1000 rpm; (ii) dicha velocidad de agitación supere aproximadamente 400 a 700 rpm y dicho pH supere aproximadamente 7,0 a 7,4; y suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores en los que se haya iniciado la inducción de la expresión de la proteína recombinante, individualmente, aproximadamente en I_0 (tiempo de inicio de la inducción) o I_1 , o en ambos; opcionalmente, suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores, individualmente, en uno o más puntos temporales seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} . En otra realización, el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y el pH se monitorean continuamente y/o periódicamente en un intervalo de tiempo dado.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, en la condición (i), dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% a 40% (por ejemplo, aproximadamente 35, 36, 37, 38, 39 o 40%) y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 700 rpm (por ejemplo, aproximadamente 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 o 700 rpm), opcionalmente aproximadamente 300 a 500 rpm. En otra realización, dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% a 40% (por ejemplo, aproximadamente 35, 36, 37, 38, 39 o 40%) y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm, opcionalmente, aproximadamente 300 a 400 rpm, 350 a 450 rpm o 350 a 500 rpm. En algunas realizaciones, dicho nivel de OD supera aproximadamente 35%, y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm. En otra realización, dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 400 rpm, aproximadamente 400 to 500 rpm, aproximadamente 350 to 400 rpm, aproximadamente 400 to 450 rpm, aproximadamente 450 to 500 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 450 rpm, o aproximadamente 500 rpm. En una realización, dicho nivel de OD supera aproximadamente 40%, y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm. En aún otra realización,

dicho nivel de OD supera aproximadamente 40% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 500 rpm, aproximadamente 350 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 450 rpm, aproximadamente 450 a 500 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 450 rpm, o aproximadamente 500 rpm.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, en la condición (ii), dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,4 (por ejemplo, aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4); opcionalmente, dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,2 (por ejemplo, aproximadamente 7,0, 7,1 o 7,2) y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm o 600 rpm. En otra realización, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,2; opcionalmente, dicho pH supera aproximadamente 7,2. En aún otra realización, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,2 a 7,4; opcionalmente, dicho pH supera aproximadamente 7,4 y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, se suministra la fuente de nitrógeno al uno o más fermentadores, individualmente, en aproximadamente I₀ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, S₈, S₉ y S₁₀ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₉, S₁₀, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₉, S₆ y S₁₀, S₅, S₇, y S₉, o S₆, S₇, y S₁₀); opcionalmente en aproximadamente I₀ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, y S₈ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₈, S₆ y S₇, S₅, S₇, y S₈, o S₆, S₇, y S₈).

En otra realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, se suministra la fuente de nitrógeno al uno o más fermentadores, individualmente, en aproximadamente I₁ y uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, S₈, S₉ y S₁₀ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₉, S₁₀, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₉, S₆ y S₁₀,

S₅, S₇, y S₉, o S₆, S₇, y S₁₀); opcionalmente en aproximadamente I₁ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, y S₈ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₈, S₆ y S₇, S₅, S₇, y S₈, o S₆, S₇, y S₈).

En aún otra realización, del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, se suministra la fuente de nitrógeno al uno o más fermentadores, individualmente, en aproximadamente I₀ y aproximadamente I₁ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, S₈, S₉ y S₁₀ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₉, S₁₀, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₉, S₆ y S₁₀, S₅, S₇, y S₉, o S₆, S₇, y S₁₀); opcionalmente, en aproximadamente I₀ y aproximadamente I₁ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, y S₈ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₈, S₆ y S₇, S₅, S₇, y S₈, o S₆, S₇, y S₈).

En una realización, se suministra una solución de alimentación de fuente de carbono al menos una vez a al menos un fermentador durante la fermentación de proteínas recombinantes por lote alimentado. En algunas realizaciones, la solución de alimentación de fuente de carbono se suministra dos o más veces independientes a al menos un fermentador durante la fermentación de proteínas recombinantes por lote alimentado. En una realización, la solución de alimentación de fuente de carbono es una solución de alimentación de glucosa, solución de alimentación de fructosa, solución de alimentación de galactosa, solución de alimentación de piruvato, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, se suministra la fuente de nitrógeno al uno o más fermentadores, individualmente, en aproximadamente I₀ y/o aproximadamente I₁ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, S₈, S₉ y S₁₀ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₉, S₁₀, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₉, S₆ y S₁₀, S₅, S₇, y S₉, o S₆, S₇, y S₁₀); opcionalmente en aproximadamente I₀ y/o aproximadamente I₁ y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, y S₈ (por ejemplo, S₅, S₆, S₇, S₈, S₅ y S₇, S₅ y S₈, S₆ y S₈, S₆ y S₇, S₅, S₇, y S₈, o S₆, S₇, y S₈); y la solución de alimentación de fuente de carbono se suministra al menos una vez o dos o más veces independientes al uno o más fermentadores durante la fermentación de

proteína recombinante por lote alimentado según lo activen cualquiera de las condiciones (i) y (ii), o ambas. En una realización del método, la fuente de nitrógeno puede suministrarse al uno o más fermentadores, individualmente, aproximadamente en I_0 o aproximadamente en I_1 y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , y S_8 (por ejemplo, S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_5 y S_7 , S_5 y S_8 , S_6 y S_8 , S_6 y S_7 , S_5 , S_7 , y S_8 , o S_6 , S_7 , y S_8); y la solución de alimentación de fuente de carbono puede suministrarse al menos una vez o dos o más veces independientes al uno o más fermentadores durante la fermentación de proteínas recombinantes por lote alimentado, según lo activen cualquiera de las condiciones (i) y (ii), o ambas.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la solución de alimentación de fuente de carbono es una solución de alimentación de glucosa. En una realización, se suministra un total acumulado de aproximadamente 800 a 1500 g de glucosa a al menos un fermentador, por cada 5 L aproximadamente de capacidad del fermentador, al finalizar la fermentación de proteínas recombinantes por lote alimentado. En algunas realizaciones, se suministra un total acumulado de aproximadamente 6000 a 9000 g de glucosa a al menos un fermentador al finalizar la fermentación de proteínas recombinantes por lote alimentado, el al menos un fermentador tiene una capacidad aproximada de 40 L.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la solución de alimentación de glucosa suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, incluye D-(+)-glucosa; opcionalmente, la solución de alimentación de glucosa suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, contiene aproximadamente 600 a 900 g/L de D-(+)-glucosa anhidra. En una realización, la solución de alimentación de glucosa suministrada a uno o más fermentadores, individualmente, contiene H_3BO_3 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, EDTA, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 12N (37%) HCl, y/o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; opcionalmente, aproximadamente 20 a 600 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. En otra realización, la fuente de carbono se añade de forma continua o por lotes, dependiendo de las

condiciones del cultivo tales como el nivel de oxígeno disuelto (OD), la velocidad de agitación y los niveles de pH.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la fuente de nitrógeno suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, es un extracto de levadura, peptona, soytone (peptona de soja), urea, triptona o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente, la fuente de nitrógeno es una solución de extracto de levadura. En algunas realizaciones, la solución de extracto de levadura suministrada a uno o más fermentadores, individualmente, tiene una concentración de aproximadamente 100 a 600 g/L, 200 a 300 g/L, 300 a 400 g/L, 400 a 500 g/L, 500 a 600 g/L, 150 a 200 g/L, 200 a 250 g/L, 250 a 300 g/L, 300 a 350 g/L, 350 a 400 g/L, 400 a 450 g/L, 450 a 500 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 250 g/L, 300 g/L, 350 g/L, 400 g/L, 428 g/L, 450 g/L, 500 g/L, o 600 g/L. El volumen total de la fuente de nitrógeno se puede ajustar en función de la escala de fermentación.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, se suministran aproximadamente 40 a 150 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores cada vez, individualmente; opcionalmente, se suministran aproximadamente 300 a 1500 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores cada vez, individualmente. En otra realización, se suministran aproximadamente 45 a 60 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si el suministro se realiza en cualquier punto de tiempo seleccionado de aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; y se suministran aproximadamente 90 a 120 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si el suministro se realiza aproximadamente en I_0 o I_1 . En una realización, se suministran aproximadamente 350 a 500 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si el suministro se realiza en cualquier punto de tiempo seleccionado de aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; y se suministran aproximadamente 700 a 1200 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si el suministro se realiza aproximadamente en I_0 o I_1 .

En algunas realizaciones del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la fuente de nitrógeno suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, contiene potasio, opcionalmente en forma de K_2HPO_4 y/o KH_2PO_4 ; o en donde se suministra potasio, opcionalmente en forma de K_2HPO_4 y/o KH_2PO_4 al uno o más fermentadores, individualmente, aproximadamente al mismo tiempo que se suministra la fuente de nitrógeno. En una realización, la fuente de nitrógeno contiene aproximadamente 1,0 a 3,0 M de potasio, o en donde se suministra potasio para alcanzar una concentración final de potasio de aproximadamente 35 a 40 mM en el uno o más fermentadores, individualmente.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, el uno o más fermentadores, de forma individual, pueden tener aproximadamente 5 L a 200 L o una mayor capacidad (por ejemplo, aproximadamente 5 L, 10 L, 20 L, 30 L, 40 L, 50 L, 80 L, 100 L, 150 L, 200 L, o más de 200 L); opcionalmente, cada uno del uno o más fermentadores tiene aproximadamente una capacidad de 5 L; opcionalmente, cada uno del uno o más fermentadores tiene aproximadamente una capacidad de 40 L; opcionalmente, el uno o más fermentadores, de forma individual, tiene 1 a 200 L del medio.

En otra realización, la concentración de cada ingrediente de la presente descripción puede permanecer sin cambios cuando el tamaño de la fermentación se aumenta en escala hacia arriba o hacia abajo (por ejemplo, aproximadamente 5 L, 10 L, 20 L, 30 L, 40 L, 50 L, 80 L, 100 L, 150 L, 200 L, o más de 200 L). En un aspecto, el volumen total de cada ingrediente, como carbono y/o fuente de nitrógeno, se puede ajustar dependiendo del tamaño de la fermentación. Un ejemplo no limitativo incluye que, para un aumento de escala de 5 L a 40 L, el volumen requerido para una fermentación de 40 L es ocho veces el necesario en comparación con una de 5 L. Además, o alternativamente, los ajustes habituales de los parámetros también se contemplan en la presente descripción en función del tamaño de la fermentación.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, en donde dicho mecanismo controlado por programa para suministrar una solución de alimentación de fuente

de carbono incluye uno o más sensores que miden el nivel de OD, el pH, la medición rédox y/o la cantidad de carbono en el uno o más fermentadores, y en donde dicho mecanismo controlado por programa inyecta automáticamente la solución de alimentación de fuente de carbono en el uno o más fermentadores.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados se realiza con una relación de inóculo de aproximadamente 6,0 a 8,5%; opcionalmente, aproximadamente 6,5 a 7%, 7,0 a 7,5%, 7,5 a 8%, o 8,0 a 8,5%; opcionalmente, aproximadamente 6,25%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,67%, 6,7%, 6,8%, 6,95%, 7,0%, 7,24%, 7,3%, 7,33%, 7,48%, 7,5%, 7,6%, 7,76%, 7,8%, 7,9%, 8%, 8,14%, o 8,4%. En una realización del método, la relación de inóculo puede ser de aproximadamente 6,0 a 8,5%; opcionalmente, aproximadamente 6,5 a 7%, 7,0 a 7,5%, 7,5 a 8%, o 8,0 a 8,5%; opcionalmente, aproximadamente 6,25%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,67%, 6,7%, 6,8%, 6,95%, 7,0%, 7,24%, 7,3%, 7,33%, 7,48%, 7,5%, 7,6%, 7,76%, 7,8%, 7,9%, 8%, 8,14%, o 8,4%.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la inducción de la expresión de la proteína recombinante se inicia cuando la DO₆₀₀ del cultivo en un fermentador alcanza aproximadamente 40 a 80; opcionalmente, aproximadamente 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 55 a 60, 60 a 65, 65 a 70, 70 a 75, 75 a 80, 40, 45, 49, 52, 55, 60, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 75, 78, o 80. En una realización del método, la expresión de la proteína recombinante se induce mediante la adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), opcionalmente, aproximadamente 3 a 5 mL de aproximadamente 0,70 a 0,85 mM de IPTG.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la proteína recombinante puede ser cualquiera de VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna NY-ESO-1, eritropoyetina, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, IFN- α 2b, Pro-IFN- α 2b, anticuerpo anti-PD1, y GCSF o una combinación de los mismos.

En una realización del método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, la célula huésped procariota comprende una célula *E. coli*. En una realización, la *E. coli* es la cepa BL-21, *E.*

coli BLR-Codon Plus (DE3)-RIL, *E. coli* BLR-Codon Plus (DE3), o *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.

En una realización, el método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota incluye además una etapa de recolección del cultivo de la célula huésped de *E. coli* o de una muestra del cultivo en el uno o más fermentadores tras la inducción de la expresión de la proteína recombinante, de forma individual. En una realización, el método comprende además el procesamiento de cuerpos de inclusión en el cultivo recolectado de células o muestras de *E. coli* para obtener un extracto de proteína bruta. En una realización, la etapa de procesamiento de los cuerpos de inclusión incluye: resuspender las células de *E. coli* del cultivo o muestra recolectados en un amortiguador; homogeneizar las células de *E. coli* una o más veces a una presión de aproximadamente 800 a 1200 bar, obteniendo así una mezcla celular; centrifugar la mezcla celular para formar un sedimento celular (pellet) utilizando una centrifugación por lotes con una velocidad de centrifugación de aproximadamente 20.000 a 30.000 rpm; alternativamente, la etapa de centrifugación puede llevarse a cabo utilizando un método de flujo de centrifugación continua con una velocidad de alimentación de aproximadamente 30-60 ml/min y con una velocidad de centrifugación de aproximadamente 20.000 a 30.000 rpm; recolectar el sedimento celular; y procesar el sedimento celular para obtener un extracto de proteína bruta. En una realización del método, se puede recolectar el cultivo o la muestra después o alrededor de I_4 hasta I_8 (por ejemplo, después o alrededor de I_4 , I_5 , I_6 , I_7 , o I_8). En una realización, el tiempo total para la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados incluye aproximadamente 10 a 95 horas o más, opcionalmente aproximadamente 14 ± 1 , 16 ± 1 , 24 ± 1 , 30 ± 1 , 36 ± 1 , 48 ± 1 , 60 ± 1 , 72 ± 1 , 84 ± 1 , o 96 ± 1 horas.

En una realización, el método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota incluye además determinar el rendimiento de la proteína recombinante expresada en el extracto de proteína bruta, en donde el rendimiento se aumenta en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al

menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 167%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o más, en comparación con otro método de fermentación. En una realización, el rendimiento se determina para un fermentador que tiene aproximadamente una capacidad de 40 L y el rendimiento se aumenta en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190%, o 200%, en comparación con el rendimiento de un fermentador que tiene aproximadamente una capacidad de 5 L en el otro método de fermentación. En una realización, la proteína recombinante es GCSF, Pro-IFN- α 2b, y/o anticuerpo monoclonal anti-PD1.

En una realización, el método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota incluye además determinar el rendimiento de la proteína recombinante expresada en el extracto de proteína bruta, en donde el rendimiento es de aproximadamente 5 a 10 g de la proteína recombinante en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L; opcionalmente, en donde el rendimiento es de aproximadamente 20 a 30 g de la proteína recombinante en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 40 L; opcionalmente, la proteína recombinante es GCSF, Pro-IFN- α 2b y/o anticuerpo monoclonal anti-PD1.

En una realización, el método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota comprende además las siguientes etapas realizadas antes de la fermentación de proteína recombinante por lote alimentado: obtener un ácido nucleico optimizado por codones que codifica la proteína recombinante; transfectar dicho ácido nucleico con codones

optimizados en la célula huésped procariota; y polarizar dicha célula huésped procariota y cultivar dicha célula huésped procariota a aproximadamente 36-37 °C durante toda la noche o aproximadamente 12-18 horas, lo que da como resultado un caldo de cultivo celular completo que incluye el ácido nucleico transfectado con codones optimizados.

En otro aspecto, descrito en la presente es un mecanismo o equipo controlado por programa que comprende: (a) un aparato equipado con uno o más sensores capaces de medir el nivel de oxígeno, el pH y/o la agitación del medio de cultivo en un reactor de fermentación en un proceso de fermentación; y (b) un sistema de inyección de solución de alimentación integrado dentro de dicho mecanismo controlado por programa que está programado para suministrar una o más soluciones de alimentación a un reactor de fermentación basándose en los niveles medidos de oxígeno, pH y/o agitación en el medio de cultivo. En un aspecto, el mecanismo o equipo puede medir y/o alimentar la solución durante un intervalo periódico (por ejemplo, cada 30 minutos durante un máximo de 96 horas o más) o de manera continua.

En una realización del mecanismo o equipo controlado por programa, uno o más sensores transmiten mediciones en tiempo real al mecanismo controlado por programa; opcionalmente, el mecanismo o equipo controlado por programa comprende además una unidad de control configurada para recibir mediciones del sensor y ajustar automáticamente la velocidad de inyección y el volumen de la solución de alimentación en función de los parámetros medidos. En otra realización, el mecanismo o equipo controlado por programa comprende además una unidad de control configurada para recibir mediciones del sensor y ajustar automáticamente la velocidad de inyección y el volumen de la solución de alimentación en función de los parámetros medidos. En una realización, el sistema de inyección de solución de alimentación comprende un depósito, una bomba dosificadora y un sistema de distribución para suministrar la solución de alimentación al proceso de fermentación; opcionalmente, el sistema de inyección de solución de alimentación está programado para incluir puntos de ajuste (setpoints) predeterminados y algoritmos de control para modificar los niveles de glucosa, el oxígeno disuelto y/o el pH dentro del proceso de fermentación en el medio de cultivo.

En aún otro aspecto, esta descripción incluye un método para regular automáticamente la concentración de glucosa, el nivel de oxígeno, el pH y/o la agitación durante la fermentación, que comprende: (a) medir parámetros de nivel de oxígeno, pH y/o agitación de la fermentación con uno o más sensores; (b) transmitir los parámetros medidos a un mecanismo controlado por programa; y (c) ajustar automáticamente la velocidad de inyección, el volumen de una solución de alimentación y la agitación en función de los parámetros medidos. En otro aspecto, el método para medir, transmitir y/o ajustar la velocidad de inyección puede realizarse de manera periódica (por ejemplo, cada 30 minutos durante un máximo de 96 horas o más) o de manera continua.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la presente descripción, se remite ahora a la descripción detallada incluida en la presente invención junto con las figuras que lo acompañan, en las cuales:

La Figura 1 muestra una estructura a la que se hace referencia como prolina-IFN α 2b o también conocida como Pro-hIFN alfa 2b

La Figura 2 muestra una imagen de un SDS-PAGE de Pro-hIFN alfa 2b en varias etapas posteriores a la inducción con IPTG utilizando un método de fabricación descrito en la presente descripción. La flecha indica el tamaño y la ubicación prevista de la banda. Carril M: Marcador, Carril RS: Estándar de referencia del fármaco Pro-hIFN alfa 2b (2 μ g); Carril 0: tiempo inicial del isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) utilizado para la inducción de la proteína a las 0 h; Carril 1: IPTG tras el tiempo de inducción inicial a aproximadamente 1,0 h; Carril 2: IPTG tras el tiempo de inducción inicial a aproximadamente 2,0 h; Carril 3: IPTG tras el tiempo de inducción inicial a aproximadamente 3,0 h; Carril 4: IPTG tras el tiempo de inducción inicial a aproximadamente 4,0 h; Carril 5: IPTG tras el tiempo de inducción inicial a aproximadamente 5,0 h. El eje Y indica el tamaño.

La Figura 3 muestra una imagen de un SDS-PAGE realizado a la proteína Pro-hIFN alfa 2b después de su purificación. La flecha indica el tamaño y la ubicación prevista de la banda. M representa el Marcador, RS representa el estándar de referencia del fármaco Pro-hIFN alfa 2b (2 μ g), y SA representa la muestra de proteína purificada (carga de 5,0 μ g).

La Figura 4 muestra un gráfico de HPLC sobre la pureza de Pro-hIFN alfa 2b utilizando un método de fermentación como se describe en la presente descripción. El pico 1 representa el Pro-hIFN alfa 2b. El pico 2 es el pico de disolvente. El eje X es el tiempo de retención en minutos. El eje Y indica cantidad.

La Figura 5 representa una secuencia de aminoácidos de GCSF con metionina en el extremo N-terminal.

La Figura 6 representa una secuencia de aminoácidos de GCSF.

La Figura 7 representa la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal anti-PD-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque a continuación se describe detalladamente la fabricación y el uso de diversas realizaciones de la presente invención, debe tenerse en cuenta que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden incorporarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas que se describen en la presente invención son meramente ilustrativas de formas específicas de fabricar y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

Para facilitar la comprensión de esta invención, a continuación, se definen una serie de términos. Los términos definidos en la presente invención tienen los significados que les atribuye una persona con conocimientos normales en los ámbitos relacionados con la presente invención. Términos como "un", "una" y "el", "la" no pretenden referirse únicamente a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que se puede utilizar un ejemplo específico a modo ilustrativo. La terminología de la presente invención se utiliza para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se describe en las reivindicaciones.

Tal como se utilizan en la presente invención, todos los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. Los títulos proporcionados en la presente invención no constituyen limitaciones de los diversos aspectos de la descripción, que pueden consultarse en la memoria descriptiva en su conjunto.

A lo largo de esta descripción, los valores expresados en formato de rango deben interpretarse de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente mencionados como límites del rango, sino también todos los valores numéricos individuales o subrangos comprendidos dentro de ese rango, como si cada valor numérico y subrango se mencionara explícitamente. Por ejemplo, un rango de "aproximadamente del 0,1 % al aproximadamente 5 %" o "aproximadamente del 0,1 % al 5 %" debe interpretarse de manera que incluya no solo aproximadamente del 0,1 % al 5 %, sino también los valores individuales (por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 % y 4 %) y los subrangos (por ejemplo, del 0,1 % al 0,5 %, del 1,1 % al 2,2 %, del 3,3 % al 4,4 %) dentro del rango indicado y pueden tener hasta dos decimales. La expresión "aproximadamente X a Y" tiene el mismo significado que "aproximadamente X a aproximadamente Y", salvo que se indique lo contrario. Del mismo modo, la expresión "aproximadamente X, Y o aproximadamente Z" tiene el mismo significado que "aproximadamente X, aproximadamente Y o aproximadamente Z", salvo que se indique lo contrario.

Además, el término "aproximadamente" se refiere a un valor o una composición que se encuentra dentro de un margen de error para el valor o la composición de referencia particular, según lo determine un experto en la materia, lo que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor o la composición, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1, o más de 1 desviación estándar según la práctica habitual en la técnica. Alternativamente o adicionalmente, "aproximadamente" puede significar un rango de hasta $\pm 5\%$, 10% , 15% , 20% y/o 25% de un valor de referencia particular. Por ejemplo, en el contexto de una relación, el significado "aproximadamente" para un valor de referencia de 8,14 incluye 8,55, 8,95, 9,36, 9,77, 10,18, así como 7,73, 7,33, 6,92, 6,51 y 6,11. Además, los términos también pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta tres (3) veces $\pm$ de un valor de referencia, dependiendo del contexto conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, aproximadamente 6,0 M de IPTG pueden variar entre 2,0 M y 18,0 M de IPTG. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, salvo que se indique lo contrario, el significado de "aproximadamente" debe

interpretarse dentro de un margen de error aceptable para ese valor o composición particular.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "proteína" o "proteína de interés" se utiliza para incluir cualquier proteína (ya sea natural o recombinante), presente en una mezcla, para la que se desea la fabricación en grandes cantidades y/o la purificación. Entre las proteínas de interés se incluyen, sin limitación, el interferón alfa, beta y gamma humano o de ratón, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) y/o cualquier proteína de fusión, así como sus derivados y partes.

Las expresiones "densidad celular", "densidad celular viable" y "concentración celular", tal y como se utilizan en la presente invención, se refieren indistintamente al número de células metabólicamente activas por unidad de volumen de un cultivo celular.

Tal y como se utiliza en la presente invención, la expresión "relación de inóculo" puede referirse a la relación "S/I", que denota la relación entre el sustrato y el inóculo (S/I) expresada en porcentajes. Esta relación puede ser un factor que afecte no solo a la estabilidad de la fermentación, sino también a la capacidad del sustrato, que controla la fermentación de una célula huésped en comparación con su capacidad de rendimiento en función de factores ambientales. La preparación del inóculo consiste en obtener los organismos en un estado compatible con la inoculación en cultivos celulares, cultivos de tejidos, medios y fermentadores. Por lo general, se trata de alcanzar un nivel de biomasa viable en un estado fisiológico adecuado para su uso como inóculo. Esto tiene aplicación en microbiología industrial para la obtención de productos como antimicrobianos, enzimas, bebidas, medicamentos, toxinas, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos, disolventes, productos alimenticios, y proteínas recombinantes. Un inóculo se encuentra típicamente en una etapa de crecimiento activo y tamaño, libre de contaminación y tiene capacidad de formación de productos. Se necesitan condiciones adecuadas de cultivo y medio de producción para proporcionar el entorno adecuado para el inóculo. La calidad del inóculo puede mejorarse mediante la mejora de las cepas y la tecnología de inmovilización celular.

La expresión "banco de células" tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un almacenamiento de células biológicas.

Los términos "biorreactor" y "fermentador" pueden utilizarse indistintamente en la presente invención para referirse a cualquier recipiente u otro medio de producción y mantenimiento de un cultivo celular biológico, incluyendo, entre otros, un biorreactor de perfusión/perfundido. Un biorreactor o fermentador puede utilizarse para realizar un proceso de fermentación, incluyendo, entre otros, una fermentación por lotes alimentados. Un fermentador puede estar equipado con sensores y mecanismos para monitorear y controlar automáticamente o manualmente las condiciones dentro del fermentador (por ejemplo, el nivel de oxígeno, el nivel de pH y la velocidad de agitación) durante el proceso de fermentación. Un fermentador también puede estar equipado con mecanismos para retirar o inyectar automáticamente o manualmente células, medios de cultivo, nutrientes o cualquier compuesto o material durante el proceso de fermentación, y puede estar disponible en tamaños para producción a pequeña escala (en laboratorio) o a gran escala (comercial).

Los términos "perfusión" o "cito-perfusión" tal como se utilizan en la presente invención, se refieren a un proceso de fermentación o cultivo celular utilizado para producir un producto biológico objetivo, por ejemplo, un anticuerpo o proteína recombinante, en el que una alta concentración de células dentro de una cámara estéril recibe continuamente un medio de crecimiento fresco como el medio usado que puede contener un producto biológico objetivo que se cosecha.

En el contexto de la fermentación de la célula huésped, la letra mayúscula "I" denota la inducción de proteína en una célula huésped, por lo que la introducción de una sustancia química, típicamente IPTG, puede inducir a la célula huésped a expresar la proteína que se clonó o transfectó. La letra puede ir seguida de un subíndice numérico que indique el tiempo en horas con respecto a la inducción, por ejemplo, I_0 , que se refiere al tiempo de la inducción inicial. I_1 e I_2 denotan aproximadamente una hora y dos horas después de la inducción inicial, respectivamente. Del mismo modo, en el mismo contexto, la letra mayúscula "S" denota la siembra inicial del cultivo con el fin de hacer crecer la célula huésped en un medio de fermentación. La letra puede ir seguida de un subíndice numérico

que indique el tiempo en horas con respecto a la siembra inicial, por ejemplo, S_0 , que se refiere al momento de la siembra inicial. S_1 y S_2 denotan aproximadamente una hora y dos horas después de la siembra inicial, respectivamente.

La expresión "fermentación por lotes alimentados", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un estado operativo del biorreactor en el que se ajusta el volumen del cultivo celular biológico mediante la introducción de un medio de crecimiento celular en el biorreactor. Es una combinación de modo por lotes y continuo en donde el sustrato se añade al reactor sin retirar el medio para evitar el problema de la inhibición del sustrato. Se distingue de la fermentación por lotes por la adición, durante las operaciones, de una cierta cantidad de sustrato fresco y por la consiguiente extracción de una cantidad proporcional de caldo.

La expresión "centrifugación perfundida", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un estado operativo del biorreactor en el que se utiliza un dispositivo de perfusión para retener las células dentro del biorreactor mientras se introduce un medio de cultivo celular en el biorreactor y se recoge el medio usado del biorreactor, manteniendo el volumen del cultivo celular en un nivel sustancialmente constante.

La expresión "centrifugación por lotes alimentados", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un estado operativo del biorreactor en el que se ajusta el volumen del cultivo celular biológico mediante la introducción de un medio de crecimiento celular en el biorreactor. Es una combinación de modo por lotes y continuo en donde el sustrato se añade al reactor sin retirar el medio para evitar el problema de la inhibición del sustrato. Se distingue de la fermentación por lotes por la adición, durante las operaciones, de una cierta cantidad de sustrato fresco y por la consiguiente extracción de una cantidad proporcional de caldo.

La expresión "estado por lotes con perfusión", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un estado operativo del biorreactor en el que se utiliza un dispositivo de perfusión para retener las células dentro del biorreactor mientras se introduce un medio de cultivo celular en el biorreactor y se recoge el medio

usado del biorreactor, manteniendo el volumen del cultivo celular en un nivel sustancialmente constante.

La expresión "estado de alimentación por lotes con perfusión", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un estado operativo del biorreactor en el que se utiliza un dispositivo de perfusión para retener las células dentro del biorreactor mientras se introduce un medio de cultivo celular en el biorreactor y se recoge el medio usado del biorreactor, manteniendo la concentración celular en un nivel sustancialmente constante.

Tal como se utiliza en la presente invención, el acrónimo "Y.E." se refiere al extracto de levadura, en donde el extracto de levadura no animal puede derivarse naturalmente con el propósito de la fermentación. La expresión "estrategia de alimentación de Y.E" se refiere al momento oportuno para añadir extracto de levadura en un proceso de fermentación.

Tal como se utilizan en la presente invención, los términos "purificar", "separar" o "aislar" se utilizan indistintamente. Los términos se refieren a aumentar el grado de pureza de una proteína de interés de una composición o muestra que comprende la proteína de interés y una o más impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la proteína de interés aumenta al eliminar (total o parcialmente) al menos una impureza de la composición. Como sabe cualquier experto en la materia, a mayor número de etapas de purificación, el rendimiento disminuirá (o se verá afectado), y la magnitud de la caída del rendimiento dependerá de la cantidad de impurezas y de los métodos de purificación. En un ejemplo no limitativo, el significado de purificar incluye, entre otros, la cromatografía de intercambio iónico, que puede ser aniónica o catiónica.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "amortiguado" o "amortiguador" denota una solución en la cual los cambios de pH debidos a la adición o liberación de sustancias ácidas o básicas son nivelados por una sustancia amortiguadora. Se puede utilizar cualquier sustancia amortiguadora que produzca tal efecto. En algunas realizaciones, se utilizan sustancias amortiguadoras farmacéuticamente aceptables, como, por ejemplo, ácido fosfórico o sus sales, ácido acético o sus sales, ácido cítrico o sus sales, morfolina, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico o sus sales, histidina o sus sales, glicina o sus sales, o Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) o sus sales. En una

realización, el ácido fosfórico o sus sales, o el ácido acético o sus sales, o el ácido cítrico o sus sales, o la histidina o sus sales se utilizan como sustancia amortiguadora. Opcionalmente, la solución amortiguada puede comprender una sal adicional, como, por ejemplo, cloruro de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, sulfato de potasio, citrato de sodio o citrato de potasio. También se pueden utilizar otros amortiguadores conocidos en la técnica, como el amortiguador TEN.

El término "medio" o "medios" se refiere generalmente a un medio de cultivo celular para el mantenimiento de las células o para permitir el crecimiento celular, el cual puede comprender sales, aminoácidos, vitaminas, lípidos, detergentes, amortiguadores, factores de crecimiento, hormonas, citocinas, oligoelementos y/o carbohidratos. Algunos ejemplos de sales incluyen sales de magnesio, por ejemplo, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; sales de hierro, por ejemplo, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; sales de potasio, por ejemplo, KH_2PO_4 , KCl ; sales de sodio, por ejemplo, NaH_2PO_4 o Na_2HPO_4 ; y sales de calcio, por ejemplo, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Algunos ejemplos de aminoácidos incluyen los 20 aminoácidos proteinogénicos conocidos, por ejemplo, histidina, glutamina, treonina, serina y metionina. Algunos ejemplos de vitaminas incluyen ascorbato, biotina, colina, mioinositol y D-pantotenato, riboflavina. Algunos ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos, por ejemplo, ácido linoleico y ácido oleico; y peptona de soja y etanolamina. Algunos ejemplos de detergentes incluyen Tween 80 y Pluronic F68. Un ejemplo de un amortiguador es HEPES. Algunos ejemplos de factores de crecimiento/hormonas/citocinas incluyen IGF, hidrocortisona e insulina recombinante. Algunos ejemplos de oligoelementos son conocidos por el experto en la técnica e incluyen Zn, Mg y Se. Algunos ejemplos de carbohidratos incluyen glucosa, fructosa, galactosa y piruvato. Otros amortiguadores conocidos en la técnica también se pueden utilizar dependiendo de la célula huésped y del proceso de fermentación; un ejemplo es el medio SYN conocido en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "polipéptido" se utiliza indistintamente con "proteína" y se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. El término "proteína" abarca una molécula compuesta por uno o más polipéptidos,

que en algunos casos pueden estar asociados por enlaces distintos de los enlaces amida. Por otro lado, una proteína también puede ser una cadena polipeptídica sencilla. En este último caso, la cadena polipeptídica sencilla puede, en algunos casos, comprender dos o más subunidades polipeptídicas fusionadas entre sí para formar una proteína. Los términos "polipéptido" y "proteína" también pueden referirse a un producto de modificaciones posteriores a la expresión, incluyendo, sin limitación, glicosilación, fosforilación, derivatización mediante grupos protectores o bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido o una proteína puede derivarse de una fuente biológica natural o puede producirse por tecnología recombinante, pero no necesariamente se traduce de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluso mediante síntesis química.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "polarización" como se utiliza en biología es un proceso o acto para producir valores de carga eléctrica positiva y negativa en extremos opuestos, tales como la carga eléctrica en el interior de una célula con respecto al entorno circundante. En una realización, la polarización de las células puede movilizar la proteína intracelular para indicar a la célula que sintetice un gen de interés.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "punto isoeléctrico" o " π " de una proteína se refiere a una medida del pH de una solución en la que una proteína no lleva carga neta. Cuando una proteína se encuentra a un pH equivalente a su π , llevará una carga eléctrica neta globalmente neutra. Las proteínas que tienen un π más bajo que el pH de su solución llevarán una carga negativa neta. Asimismo, las proteínas que tienen un π mayor que el pH de su solución llevarán una carga positiva neta.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "amortiguador de carga" se refiere al amortiguador utilizado para preparar y cargar una mezcla o muestra en la unidad de cromatografía.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula huésped. Los vectores capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están ligados operativamente se denominan en la presente

invención "vectores de expresión". Los vectores pueden ser vectores virales o vectores no virales.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "célula huésped" se refiere a una célula a la que un vector o vector de expresión puede ser o ha sido introducido. Una célula huésped puede contener un vector de expresión para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína de interés en la célula huésped. Algunos ejemplos incluyen *Bacillus*, levadura del género *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, célula CHO (Chinese Hamster Ovary, ovario de hámster chino), hibridomas, célula BHK (Baby Hamster Kidney, riñón de hámster bebé), célula de mieloma, célula HEK-293, célula linfoblastoide humana y célula de ratón, por ejemplo, una célula NSO. Otros ejemplos incluyen *E. coli* (con varias modificaciones disponibles para un experto en la técnica), incluyendo, entre otros *E. coli* BL-21, *E. coli* BLR-Codon Plus (DE3)-RIL, *E. coli* BLR-Codon Plus (DE3), *E. coli* BLR- (DE3), o *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, todos conocidos por un experto en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente invención, "anticuerpo anti PD-1" o "anticuerpo monoclonal anti PD-1" se utilizan indistintamente. El anticuerpo anti-PD-1 incluye un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina (Ig) G4 humanizado dirigido contra el receptor de superficie celular humano inmunorregulador negativo de muerte celular programada 1 (PD-1), con actividad inhibidora de puntos de control inmunitario y antineoplásica.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "Pro-hIFN alfa 2b" se refiere a la fórmula química como se muestra en la Figura 1, en donde el interferón humano alfa 2b contiene una prolina adicional en el extremo N terminal. También pueden encontrarse detalles de la molécula en la patente número 8.106.160 B2 de los estados unidos, cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo que sea líquido, semisólido o sólido, inerte y no tóxico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables son azúcares como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones como almidón de maíz y

almidón de papa; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; glicoles como propilenglicol; ésteres como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes amortiguadores como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones amortiguadoras de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio; también pueden estar presentes en la composición agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes aromatizantes, conservantes y antioxidantes, según el criterio del formulador.

Científicamente, se sabe que aumentar el número de etapas y/o añadir ingredientes adicionales puede causar una disminución del rendimiento en la fabricación de proteínas al disminuir el rendimiento total del producto final. Por ejemplo, incluso si el rendimiento de cada etapa del proceso de fabricación llega a ser tan alto como el 90,0 %, tras 10 etapas, el cálculo del rendimiento consiste en multiplicar 0,9 por sí mismo 10 veces, lo que conduce a un rendimiento global del 34 %. En otras palabras, cuantas más etapas se requieran, el rendimiento se verá afectado. Sin embargo, la presente descripción sorprendente e inesperadamente demuestra el efecto contrario al concepto científico conocido mencionado anteriormente. Utilizando el método descrito en la presente, el método aumenta el número total de etapas, incluyendo, entre otras, la adición de etapas relativas a la alimentación de extracto de levadura y/o glucosa adicional; no obstante, no se observa una caída del rendimiento y, por el contrario, se muestra el efecto opuesto de un aumento del rendimiento. Además, los cambios no aumentan gradualmente el rendimiento como la optimización de rutina, sino que sorprendente e inesperadamente aumentan el rendimiento proteico en, por ejemplo, al menos aproximadamente 113,5%, 126,5%, 150%, 162,7%, 180%, 213%, 300%, 325%, 350%, 383%, 400% o más en comparación con los métodos conocidos en la técnica tras la etapa de fermentación y el procesamiento de cuerpos de inclusión (IB) para generar un extracto de proteína bruta. Adicionalmente, o alternativamente, el aumento del rendimiento puede observarse en el proceso posterior a la fermentación antes del procesamiento de cuerpos de inclusión, donde el rendimiento de la proteína bruta puede aumentar

en al menos aproximadamente 113,5, 126,5, 150, 162,7, 180, 213%, 300%, 325%, 350%, 383%, 400% o más. El aumento y/o las mejoras observadas pueden definirse en relación con el rendimiento de un método similar o sustancialmente similar que difiera esencialmente de un método descrito en la presente invención únicamente en las etapas de control de la alimentación del reactor de cultivo o de fermentación con una solución de alimentación basada en el contenido de oxígeno disuelto, la velocidad de agitación y/o el pH, tal como se analiza en la presente invención. Alternativamente, o adicionalmente, el aumento y/o las mejoras observadas pueden definirse en comparación con el método descrito en la patente número 8.106.160 B2 de los Estados Unidos.

Los productos biofarmacéuticos (o proteína) de la presente descripción en los que se puede aumentar su rendimiento de fabricación incluyen, entre otros: BOTOX, Myobloc, NeuroBloc, Dysport (u otros serotipos de neurotoxinas botulínicas), anticuerpo monoclonal anti-PD1, alglucosidasa alfa, daptomicina, YH-16, coriogonadotropina alfa, filgrastim, cetorelix, interleucina-2, aldesleucina, teceleulina, denileucina difitox, interferón alfa-n3 (inyección), interferón alfa-n1, DL-8234, interferón, Suntory (gamma-la), interferón gamma, timosina alfa 1, tasonermina, DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, nesiritide, abatacept, alefacept, rebif, eptoterminalfa, teriparatida (osteoporosis), calcitonina inyectable (enfermedad ósea), calcitonina (nasal, osteoporosis), etanercept, hemoglobina glutámero 250 (bovino), drotrecogina alfa, colagenasa, carperitida, factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (gel tópico, cicatrización de heridas), DWP401, darbepoetina alfa, epoetina omega, epoetina beta, epoetina alfa, desirudina, lepirudina, bivalirudina, nonacog alfa, Mononine, eptacog alfa (activado), factor recombinante VIII+VWF, Recombinate, factor VIII recombinante, factor VIII (recombinante), Alphanmate, octocog alfa, factor VIII, palifermina, Indikinase, tenecteplasa ("eticuloses"), alteplasa, pamiteplasa, reteplasa, nateplasa, monteplasa, folitropina alfa, rFSH, hpFSH, micafungina, pegfilgrastim, lenograstim, nartograstim, sermorelina, glucagón, exenatida, pramlintida, iniglucerasa, galsulfasa, leucotropina, molgramostirn, acetato de triptorelina, histrelina (implante subcutáneo, Hydron), deslorelina, histrelina, nafarelina, depósito de liberación sostenida de leuprolida (ATRIGEL), implante de leuprolida (DUROS), goserelina, Eutropin, programa KP-102, somatropina,

mecasermina (fracaso del crecimiento), enlfavirtida, Org-33408, insulina glargina, insulina glulisina, insulina (inhalada), insulina lispro, insulina deternir, insulina (bucal, RapidMist), rinfabato de mecasermina, anakinra, celmoleuquina, inyección de 99mTc-apcitida, mielopid, Betaseron, acetato de glatiramer, Gepon, sargramostim, oprelvequina, interferones alfa derivados de leucocitos humanos, Bilive, insulina (recombinante), insulina humana recombinante, insulina aspart, mecasermina, Roferon-A, interferón-alfa 2, alfaferona, interferón alfacon-1, interferón alfa, hormona luteinizante humana recombinante de Avonex, dornasa alfa, trafermina, ziconotida, taltirelina, diboterminalfa, atosiban, becaplermina, eptifibatida, Zemaira, CTC-111, Shanvac-B, vacuna contra el VPH (cuadrivalente), octreotida, lanreotida, ancestrina, agalsidasa beta, agalsidasa alfa, laronidasa, acetato de cobre prezatida (gel tópico), rasburicasa, ranibizumab, Actimmune, PEG-Intron, Tricomin, inyección de desensibilización de alergia al ácaro del polvo doméstico recombinante, hormona paratiroidea (PTH) 1-84 humana recombinante (sc, osteoporosis), epoetina delta, antitrombina III transgénica, Granditropin, Vitrase, insulina recombinante, interferón-alfa (pastilla oral), GEM-21S, vapreotida, idursulfasa, omeprazol, albúmina sérica recombinante, certolizumab pegol, glucaridasa, inhibidor de la esterasa CI recombinante humana (angioedema), lanoteplasa, hormona de crecimiento humano recombinante, enfuvirtida (inyección sin aguja, Biojector 2000), VGV-1, interferón (alfa), lucinactant, aripradil (inhalado, enfermedad pulmonar), icatibant, ecalantida, omiganano, Aurograb, pexigananacetato, ADI-PEG-20, LDI-200, degarelix, cintredelinbesudotox, Favld, MDX-1379, ISAtx-247, liraglutida, teriparatida (osteoporosis), tifacogina, AA4500, loción liposoma T4N5, catumaxomab, DWP413, ART-123, crisalina, desmoteplasa, amedioplasa, corifolitropina alfa, TH-9507, teduglutida, Diamyd, DWP-412, hormona de crecimiento (inyección de liberación sostenida), G-CSF recombinante, insulina (inhalada, AIR), insulina (inhalada, Technosphere), insulina (inhalada, AERx), RGN-303, DiaPep277, interferón beta (infección viral de la hepatitis C (VHC)), interferón alfa-n3 (oral), belatacept, parches de insulina transdérmica, AMG-531, MBP-8298, Xerecept, opebacan, AIDSVAX, GV-1001, LymphoScan, ranpirnasa, Lipoxysan, lusupultida, MP52 (portador de fosfato tricálcico beta, regeneración ósea), vacuna contra el melanoma, sipuleucel-T, CTP-37, Insegia, vitespen, trombina humana (congelada, sangrado quirúrgico), trombina, TransMID,

alfimeprasa, puricasa, terlipresina (síndrome hepatorrenal intravenoso), EUR-1008M, FGF-I recombinante (inyectable, enfermedad vascular), BDM-E, rotigaptide, ETC-216, P-113, MBI-594AN, duramicina (inhala da, fibrosis quística), SCV-07, OPI-45, Endostatina, Angiostatina, ABT-510, Bowman Birk Inhibidor Concentrado, XMP-629, 99 mTc-Hynic-Annexin V, kahalálido F, CTCE-9908, teverelix (liberación prolongada), ozarelix, romidepsina, BAY-504798, interleucina-4, PRX-321, Pepscan, iboctadequina, rh lactoferrina, TRU-015, IL-21, ATN-161, cilengitida, Albuferon, Biphasix, IRX-2, interferón omega, PCK-3145, CAP-232, pasireotida, huN901-DMI, vacuna inmunoterapéutica contra el cáncer de ovario, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, vacuna peptídica multi-epítipo contra el melanoma (MART-I, gp100, tirosinasa), nemifitida, rAAT (inhala da), rAAT (dermatológica), CGRP (inhala do, asma), pegsunercept, timosina beta-4, plitidepsina, GTP-200, ramoplanina, GRASPA, OBI-1, AC-100, calcitonina de salmón (oral, eligen), calcitonina (oral, osteoporosis), examorelina, capromorelina, Cardeva, velafermina, 131I-TM-601, KK-220, T-10, ularitida, depelestat, hematida, Chrysalin (tópica), rNAPc2, Factor VIII recombinante (liposómico pegilado), bFGF, variante de estafilocinasa recombinante pegilada, V-10153, SonoLysis Prolyse, NeuroVax, CZEN-002, terapia de neogénesis de células de los islotes, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, exenatida (liberación controlada, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, avorelina, ACM-9604, CETi-1, Hemospan, VAL (inyectable), insulina de acción rápida (inyectable, Viadel), insulina intranasal, insulina (inhala da), insulina (oral, eligen), leptina humana metionílica recombinante, Pro-hIFN alfa 2b, pitrakinra (inyección subcutánea, eccema), pitrakinra (polvo seco inhala do, asma), Multikine, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn10 (enfermedades autoinmunes/inflamación), talactoferrina (tópica), rEV-131 (oftálmico), rEV-131 (enfermedad respiratoria), insulina humana recombinante oral (diabetes), RPI-78M, oprelvequina (oral), CYT-99007 CTLA4-Ig, DTY-001, valategrast, interferón alfa-n3 (tópico), IRX-3, RDP-58, Tauferon, lipasa estimulada por sales biliares, Merispase, fosfatasa alcalina, EP-2104R, Melanotan-II, bremelanotida, ATL-104, microplasma humana recombinante, AX-200, SEMAX, ACV-1, Xen-2174, CJC-1008, dinorfina A, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, vacuna contra la malaria (viroso mas, PeviPRO), ALTU-135, vacuna contra parvovirus B19, vacuna contra la gripe (neuraminidasa recombinante), vacuna contra la

malaria/HBV, vacuna contra el ántrax, Vacc-5q, Vacc-4x, vacuna contra el VIH (oral), vacuna contra el VPH, toxoide Tat, YPSL, CHS-13340, crema liposómica de PTH(1-34) (Novasome), Ostabolin-C, análogo de PTH (tópico, psoriasis), MBRI-93.02, vacuna MTB72F (tuberculosis), vacuna MVA-Ag85A (tuberculosis), FARA04, BA-210, vacuna de peste recombinante FIV, AG-702, OxSODrol, rBetV1, vacuna dirigida a alérgenos Der-p1/Der-p2/Der-p7 (alergia a ácaros del polvo), antígeno peptídico PR1 (leucemia), vacuna ras mutante, vacuna de lipopéptido E7 de VPH-16, vacuna contra labirintina (adenocarcinoma), vacuna contra LMC, vacuna peptídica WT1 (cáncer), IDD-5, CDX-110, Pentrys, Norelina, CytoFab, P-9808, VT-111, icrocaptida, telbermina (dermatológica, úlcera de pie diabético), rupintrivir, tenecteplasa, rGRF, HA, alfa-galactosidasa A, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, vacuna terapéutica contra la angiotensina, D-4F, ETC-642, APP-018, rhMBL, SCV-07 (oral, tuberculosis), DRF-7295, ABT-828, inmunotoxina específica para ErbB2 (anticancerosa), DT3SSIL-3, TST-10088, PRO-1762, Combotox, péptidos de unión al receptor de gastrina/colestocinina-B, 111In-hEGF, AE-37, trastuzumab-DM1, Antagonista G, IL-12 (recombinante), PM-02734, IMP-321, rhIGF-BP3, BLX-883, CUV-1647 (tópico), radioinmunoterapéuticos basados en L-19 (cáncer), Re-188-P-2045, AMG-386, vacuna DC/1540/KLH (cáncer), VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna NY-ESO-1 (péptidos), péptidos NA17.A2, vacuna contra el melanoma (terapéutica de antígeno pulsado), vacuna contra el cáncer de próstata, CBP-501, lactoferrina humana recombinante (ojo seco), FX-06, AP-214, WAP-8294A (inyectable), ACP-HIP, SUN-11031, péptido YY [3-36] (obesidad, intranasal), FGLL, atacicept, BR3-Fc, BN-003, BA-058, hormona paratiroidea humana 1-34 (nasal, osteoporosis), F-18-CCR1, AT-1100 (enfermedad celíaca/diabetes), JPD-003, crema liposómica de PTH(7-34) (Novasome), duramicina (oftálmica, ojo seco), CAB-2, CTCE-0214, eritropoyetina, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, aminocandina, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, teverelix (liberación inmediata), EP-51216, hGH (liberación controlada, Biosphere), OGP-I, sifuvirtida, TV4710, ALG-889, Org-41259, rhCC10, F-991, timopentina (enfermedades pulmonares), r(m)CRP, insulina hepatoselectiva, subalina, proteína de fusión L19-IL-2, elafina, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, agonista del receptor de trombopoyetina (trastornos trombocitopénicos), AL-108, AL-208, antagonistas del factor de crecimiento nervioso (dolor), SLV-

317, CGX-1007, INNO-105, teriparatida oral (eligen), GEM-OSI, AC-162352, PRX-302, vacuna de fusión LFn-p24 (Therapore), EP-1043, vacuna pediátrica contra *S. pneumoniae*, vacuna contra la malaria, vacuna contra *Neisseria meningitidis* Grupo B, vacuna estreptocócica neonatal del grupo B, vacuna contra el ántrax, vacuna contra el VHC (gpE1+gpE2+MF-59), terapia para la otitis media, vacuna contra el VHC (antígeno del núcleo + ISCOMATRIX), hPTH(1-34) (transdérmica, ViaDerm), 768974, SYN-101, PGN-0052, aviscumnina, BIM-23190, vacuna contra la tuberculosis, péptido de tirosinasa multi-epítipo, vacuna contra el cáncer, enkastim, APC-8024, GI-5005, ACC-001, TTS-CD3, TNF dirigido a la vasculatura (tumores sólidos), desmopresina (liberación controlada bucal), onercept, TP-9201, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), y todas las versiones de interferones conocidos (INF), por ejemplo: IFN tipo I, tipo II o tipo III, los cuales pueden incluir IFN α , - β , - ω , - λ y - τ y versiones modificadas químicamente posteriormente.

Una realización de la presente descripción es el uso de los métodos descritos para fabricar composiciones farmacéuticas incluyendo proteína fermentada (por ejemplo, prolina-IFN α 2b); o para fabricar proteína GCSF, que puede modificarse en GCSF pegilado, en grandes cantidades. En una realización, el producto final modificado producido mediante estos métodos puede ser purificado, formulado por un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones se pueden administrar a un sujeto por vía parenteral, tópica, o a través de un reservorio implantado. El término "parenteral", tal como se utiliza en la presente invención, puede incluir técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intrasternal, intratecal, intralesional e intracraneal. En una realización, la composición se inyecta en un tejido desfigurante.

En algunas realizaciones, la proteína puede incluir un anticuerpo monoclonal tal como adalimumab (HUMIRA), infliximab (REMICADE, marca registrada), rituximab (RITUXAN, marca registrada / MAB THERA, marca registrada), etanercept (ENBREL, marca registrada), bevacizumab (AVASTIN, marca registrada), trastuzumab (HERCEPTIN, marca registrada), y/o cualquier combinación en cualquier proporción de cantidad de los mismos, o cualquier otro

polipéptido adecuado incluyendo biosimilares, intercambiables y/o biológicos mejorados (biobetters),

Otras proteínas son las que se enumeran a continuación y en la Tabla 1 de la Publicación de Patente de los EE. UU. N.º 2016/0097074 que se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad.

Cualquiera de las proteínas anteriores, por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), puede modificarse químicamente de forma posterior; y adicional o alternativamente, también pueden serlo todas las versiones de interferones (INF) conocidos, por ejemplo: IFN tipo I, tipo II o tipo III, los cuales pueden incluir IFN α , - β , - ω , - λ y - τ . En algunas realizaciones, pueden utilizarse los métodos de la presente descripción para aumentar la fermentación, la masa celular de cuerpos de inclusión, la proteína bruta y/o la proteína purificada, aumentando así el rendimiento total final de interferón alfa 2b, interferón alfa, interferón beta y/o interferón gamma.

En una realización, la presente descripción incluye el uso de células cultivadas utilizadas para producir otras proteínas terapéuticas, por ejemplo, anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, y/o proteínas recombinantes. En algunas realizaciones, las células cultivadas producen péptidos, aminoácidos, ácidos grasos o intermediarios bioquímicos o metabolitos útiles. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden producir moléculas que tienen un peso molecular de aproximadamente 300, 400 o 500 daltons a más de aproximadamente 100.000, 120.000, o 140.000 daltons. En ciertas realizaciones, estas moléculas pueden tener un rango de complejidad y pueden incluir modificaciones postraduccionales, incluida la glicosilación.

El método para producir una proteína recombinante típicamente comienza con la obtención de una célula huésped, la introducción en la célula huésped de un vector que puede dirigir la expresión de un ácido nucleico que codifica la proteína de interés en la célula huésped, y la fermentación de dicha célula huésped. El procedimiento típicamente utiliza una célula huésped que ha sido procesada y almacenada en un banco de células. En una realización, la célula huésped que se puede usar incluye, entre otras: Células competentes de *E. Coli* como *E. coli* BLR-Codon Plus (DE3)-RIL, *E. coli* BLR (DE3), *E. coli* BLR-Codon Plus (DE3), y/o *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, o cualquier célula adecuada disponible.

En otra realización, estas células huésped en el banco de células ya pueden estar modificadas genéticamente para expresar las proteínas de interés.

En algunas realizaciones, una cantidad de aproximadamente 1-50 μL (por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 μL) de un cultivo de células huéspedes de interés (por ejemplo, una célula huésped capaz de expresar una proteína de interés) se puede transferir a un recipiente volumétrico pequeño que ya contiene aproximadamente 100-250 mL de medio o aproximadamente 0,5 L, 1,0 L, 1,5 L, 2,0 L, 2,5 L, o 5L de medio para la producción. Un ejemplo no limitativo de medio es el medio SYN conocido en la técnica. En una realización, el medio es SYN ya premezclado con aproximadamente 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y/o aproximadamente 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol, que se puede colocar en un matraz de 1 L. Luego, las células pueden ser cultivadas a aproximadamente $36,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $37,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, o $38,0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en una incubadora agitada a aproximadamente 100, 150, 200, 225, 250, o aproximadamente 300 rpm durante aproximadamente 10 ± 1 h, 14 ± 1 h, 16 ± 1 h, o 18 ± 1 h durante la noche o aproximadamente 12 a 18 horas.

En una realización, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y la osmolaridad del medio de cultivo celular pueden depender del tipo de célula huésped elegida. El pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto (OD) y la osmolaridad se pueden seleccionar para el crecimiento y la productividad de las células. Dependiendo de la proteína y del tipo de célula, el pH puede ser de 6,6 a 7,6, en particular, aproximadamente 6,9, 7,0, 7,1 o 7,2, y la temperatura puede ser de aproximadamente 30,0 a 39 $^{\circ}\text{C}$, en particular aproximadamente 36,5 $^{\circ}\text{C}$, 36,8 $^{\circ}\text{C}$, 37,1 $^{\circ}\text{C}$, 37,4 $^{\circ}\text{C}$, 37,8 $^{\circ}\text{C}$ o 38,2 $^{\circ}\text{C}$, y la osmolaridad puede ser de aproximadamente 260 a 400 mOsm/kg.

Alternativa y/o adicionalmente, se pueden añadir al medio durante la fermentación antiespumantes y desespumantes basados en silicona o tensioactivos no iónicos, tales como polímeros de cobloque de monómeros de óxido de etileno/óxido de propileno. El medio puede ser agua.

En una realización, después del crecimiento celular durante la noche como se describe anteriormente, ciertas cantidades del cultivo pueden transferirse a un recipiente estéril. El proceso se conoce como "siembra". Por ejemplo, aproximadamente 100, 150, 200, 220 o 240 mL del cultivo inicial se pueden

transferir a una botella de siembra estéril de 250 mL y transferir a un fermentador para la fermentación por lotes alimentados. En otra realización, otra acción se puede realizar al mismo tiempo que la siembra. Según lo definido anteriormente, se puede hacer referencia al tiempo inicial de siembra como S_0 . En algunas realizaciones, la célula huésped se polariza antes de la etapa de siembra. Alternativamente, o adicionalmente, la polarización puede ocurrir antes de la fermentación.

En algunas realizaciones, cada fermentador puede contener aproximadamente 1-5 L, más particularmente, aproximadamente 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,2, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5 o 4,7 L de medio básico suplementado con aproximadamente 1-5 g/L, más particularmente, aproximadamente 1,0, 2,0, 3,1, 3,5, 4,0, 4,5, o 5,0 g/L de isoleucina, aproximadamente 8-12 g/L de glucosa básica, en particular aproximadamente 9,1, 9,5, 10,0, 10,5, o 11,0 g/L, aproximadamente 10-25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, más particularmente, aproximadamente 12, 15, 20, o 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, y aproximadamente 15-30 $\mu\text{g/ml}$, más particularmente, aproximadamente 12, 15, 20, o 25 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Durante la fermentación, se toman típicamente aproximadamente 10 a 20 ml del caldo de cultivo a intervalos de aproximadamente 2,0 h para medir la densidad óptica a una longitud de onda de luz de 600 nm. El pH de la fermentación por lotes alimentados se mantiene y se controla típicamente a un pH aproximado de 6,0 a 7,5, en particular a aproximadamente 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 o 7,4. Todos los parámetros de la presente descripción pueden ser monitoreados y controlados a través de al menos un controlador de ajuste automatizado, por ejemplo, para añadir NH_4OH para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10-26%, en particular a aproximadamente 11,0, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 17,0, 17,5, 18,0, 19,0, 20,0, 21,0, 22,0, 23,0, 24,0, 25,0, o 26,0%, u otro amortiguador que pueda ajustar el pH. La temperatura se mantiene típicamente a aproximadamente 36,0 a 37 °C, por ejemplo, aproximadamente 36,0, 36,5 y/o 37°C.

Cada fermentador utilizado en los métodos y sistemas descritos en la presente invención puede tener cualquier tamaño adecuado, por ejemplo, hasta o más de 200 L, por ejemplo, 5 L, 10 L, 20 L, 30 L, 40 L, 50 L, 80 L, 100 L, 150 L, 200 L o más de 200 L. Cada fermentador puede tener un volumen de trabajo mínimo y

máximo dependiendo de su capacidad, que sería entendido por un experto. Además, a medida que cambia el tamaño del fermentador, ya sea hacia arriba o hacia abajo, las concentraciones de los ingredientes no necesitan cambiar, excepto por la fuente de carbono y nitrógeno que puede añadirse, debido al hecho de que las adiciones de la fuente de carbono y nitrógeno dependen del volumen de cultivo. Algunos ejemplos no limitativos se ilustran en el Ejemplo 1-6, en el que la fuente de carbono añadida puede ser aproximadamente un total acumulado de aproximadamente 800 a 1500g. Cuando el tamaño del fermentador aumenta, como se indica en el Ejemplo 7, solo para ilustración, la fuente de carbono añadida puede llegar a un total acumulado de aproximadamente 6000-9000g. No obstante, a medida que el tamaño del fermentador cambia hacia arriba o hacia abajo, en la presente descripción también se contemplan cambios en las concentraciones y condiciones.

Sin embargo, en otra realización, típicamente, el rendimiento de la fermentación por lotes alimentados puede depender de los parámetros del proceso como la concentración del sustrato, la relación sustrato-inóculo, el tiempo de retención y/o la temperatura. Además, la dinámica de la comunidad microbiana, su adaptación a las condiciones operativas cambiantes y/o las condiciones inhibitoras en los biorreactores pueden determinar la estabilidad del proceso. Entre los diversos parámetros del proceso, la relación sustrato-inóculo (denominada "S:I" en adelante) puede desempeñar un papel en el aumento de la fermentación / rendimiento de proteínas. El sustrato alimentado (por ejemplo, la estrategia de alimentación) a los biorreactores puede alterar el proceso de digestión debido a la diferencia en la cantidad de componentes orgánicos. Del mismo modo, el inóculo, cuando se suministra al sustrato, puede proporcionar estabilidad funcional. En una realización, la relación de inóculo de la presente descripción es de aproximadamente 6,0 a 8,5%. Algunos ejemplos no limitativos incluyen aproximadamente 6,5 a 7%, 7,0 a 7,5%, 7,5 a 8%, o 8,0 a 8,5%; o aproximadamente 6,25%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,67%, 6,7%, 6,8%, 6,95%, 7,0%, 7,24%, 7,3%, 7,33%, 7,48%, 7,5%, 7,6%, 7,76%, 7,8%, 7,9%, 8%, 8,14% o 8,4%.

En otra realización, la concentración de OD (oxígeno disuelto) del medio de cultivo puede verse influenciada por la cantidad de aire suministrado al biorreactor y el consumo de oxígeno de las células en crecimiento. En el

transcurso de un bioproceso (por ejemplo, fermentación), el OD típicamente disminuirá, lo que refleja el consumo de oxígeno de las células en crecimiento. Si las fuentes de carbono se agotan, la actividad metabólica de las células y, por lo tanto, su consumo de oxígeno pueden disminuir repentinamente, lo que lleva a un pico en la concentración de OD. Por lo tanto, el pico de OD indica el agotamiento del sustrato y puede utilizarse para activar la alimentación automatizada del cultivo.

En una realización, el nivel de OD de la fermentación se puede mantener en aproximadamente 25,0-45,0%, pero sin incluir 35,0%. Por ejemplo, se puede mantener el OD en aproximadamente 25,0%, 26,0%, 27,0%, 28,0%, 29,0%, 30,0%, 31,0%, 32,0%, 33,0%, 34,0%, 34,5%, 34,9%, 34,99%, 35,5%, 36,0%, 37,5%, 38,5%, 40,0%, 42,0%, 43,0%, o 45,0%. En otra realización, el nivel de OD de la fermentación se puede mantener en aproximadamente 25,0-45,0%, incluyendo 35,0%. Por ejemplo, se puede mantener el OD en aproximadamente 25,0%, 26,0%, 27,0%, 28,0%, 29,0%, 30,0%, 31,0%, 32,0%, 33,0%, 34,0%, 34,5%, 34,9%, 34,99%, 35,0%, 35,5%, 36,0%, 37,5%, 38,5%, 40,0%, 42,0%, 43,0% o 45,0%. Se puede utilizar un método automatizado para mantener la saturación de aire para automatizar la alimentación basada en el pico de OD mediante el uso de un sistema automatizado de bomba/sensor controlado por software. El aparato puede incluir uno o más sensores para medir el nivel de oxígeno de una fermentación, el pH, la medición rédox y/o la fuente de carbono (por ejemplo, glucosa). El aparato también puede incluir un tubo de alimentación para inyección, suministro de gas para mezcla de aire/oxígeno, control de temperatura, control de pH y/o aparato de medición de OD. En una realización, el OD puede ser controlado por inyección automatizada de oxígeno para alcanzar y/o ajustar el nivel deseado de OD. Alternativamente, o adicionalmente, el fermentador puede agitarse y controlarse automáticamente mientras se monitorea el OD. La velocidad de agitación también puede afectar el OD. Un ejemplo no limitativo incluye ajustar la velocidad de agitación a aproximadamente 100 a 2000 rpm.

En algunos casos, el rendimiento de proteína puede no ser óptimo si se permite que un lote de fermentación al final de las fases de lote muestre un pico parcial y/o total de OD, lo que puede dar lugar a la inconsistencia del producto final. Por

lo tanto, si las fuentes de carbono se consumen a cierto nivel, el método de la presente descripción desencadena una activación automatizada de las bombas de alimentación. En la presente descripción, se pueden añadir una o más alimentaciones dependiendo de las condiciones de fermentación. Por ejemplo, durante un ciclo de fermentación se pueden inyectar en un fermentador aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alimentaciones con una solución de alimentación con fuente de carbono, que suele comprender una o más fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa). Esto se denomina en la presente invención "estrategia de alimentación con fuentes de carbono".

En una realización, el OD puede aumentar gradualmente a medida que avanza la fermentación, ya que esta aumenta gradualmente la velocidad de agitación de aproximadamente 300 a 1000 rpm (por ejemplo, aproximadamente 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 a aproximadamente 1000 rpm), lo que indica que es necesario suministrar oxígeno puro.

En una realización de la presente descripción, se puede realizar al menos una o más estrategias de alimentación con fuentes de carbono. Cada alimentación de fuente de carbono podría desencadenarse por al menos uno de dos conjuntos de condiciones: (i) cuando la agitación supera aproximadamente 300 a 1000 rpm (particularmente supera aproximadamente 320, 350, 400, 450, 500, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1.000 rpm) y el OD supera aproximadamente 25,0 a 45,0% (particularmente supera aproximadamente 35,0, 37,0, 38,0, 40,0, 42,5 o 45,0%); (ii) cuando la agitación alcanza más de aproximadamente 400 a 700 rpm (particularmente aproximadamente 400 a 500, 500 a 600, 600 a 700, 400, 450, 500, 550, 575, 600, 625 rpm o más), y el pH se eleva por encima de aproximadamente 7,0 a 7,4 (particularmente aproximadamente 7,0 a 7,2, 7,2 a 7,4, 7,0, 7,2, 7,25, 7,30 o 7,4). En algunas realizaciones, una solución de alimentación de fuente de carbono puede contener aproximadamente 600 a 900 g/L de D-(+)-glucosa anhidra y MgSO_4 , particularmente aproximadamente 750, 800, o 850 g/L de D-(+)-glucosa anhidra, y aproximadamente 20 a 600 g/L de MgSO_4 , particularmente aproximadamente 20, 80, 100, 200, 300, 400, 500 o 600 g/L de MgSO_4 .

En algunas realizaciones, se puede alimentar un total acumulado de aproximadamente 800 a 1500 g (por ejemplo, aproximadamente 850 a 950, 950

a 1000, 1000 a 1100, 1100 a 1150, 1150 a 1200, 1200 a 1300, 1300 a 1400, 1400 a 1500, 850, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 g) de glucosa a un fermentador con una capacidad de 5 L hacia el final de un ciclo de fermentación por lotes alimentados. En otra realización, se puede alimentar un total acumulado de aproximadamente 6000 a 9000 g (por ejemplo, aproximadamente 6000 a 6500, 6500 a 7000, 7000 a 7500, 7500 a 8000, 8000 a 8500, 8500 a 9000, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500 o 9000 g) de glucosa a un fermentador con una capacidad de 40 L hacia el final de un ciclo de fermentación por lotes alimentados.

En otra realización, se pueden añadir aproximadamente 30, 35, 40, 50, 55, 60 o 65 ml/L de emulsión antiespumante Y-30 para prevenir y/o disminuir el exceso de espuma durante la fermentación por lotes alimentados. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden añadir aproximadamente 80,0 a 100,0 gramos de antiespumante en aproximadamente I_2 , I_4 I_6 , y/o aproximadamente 1,0 h y/o 2,0 h luego de la adición de IPTG.

En otra realización, se puede utilizar otra estrategia de alimentación llamada alimentación de fuente de nitrógeno. La fuente de nitrógeno puede ser un extracto de levadura, peptona, peptona de soja, urea, triptona, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la estrategia de alimentación de fuente de nitrógeno puede incluir dos o más alimentaciones (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) a un fermentador en lugar de una alimentación única conocida y típica. Un ejemplo no limitativo incluye alimentar una primera fuente de nitrógeno a aproximadamente I_0 , I_1 , o I_2 y una segunda fuente de nitrógeno a aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 , o S_{10} . Alternativamente, o adicionalmente, una alimentación puede ser introducida cuando uno de los dos conjuntos de condiciones siguientes ocurre: (1) la agitación alcanza por encima de aproximadamente 500-600 rpm, tal como aproximadamente 550 rpm, y el nivel de OD alcanza por encima de aproximadamente 35-50%, tal como aproximadamente 40 o 45%; o (2) la agitación alcanza por encima de aproximadamente 500-600 rpm, tal como aproximadamente 550 o 600 rpm, y el pH alcanza por encima de aproximadamente 7,1-7,3, tal como aproximadamente 7,2, 7,25 o 7,3. En una realización, se introduce una alimentación cuando ocurren ambos conjuntos de condiciones (1) y (2).

En una realización, la fuente de nitrógeno es una solución de extracto de levadura (Y.E.). Un ejemplo no limitativo incluye añadir a aproximadamente I_0 , I_1 , o I_2 aproximadamente 90 a 120 mL (por ejemplo, 90 a 100, 100 a 110, 110 a 120, 90, 91, 96, 100, 101, 106, 110, 114 o 117 mL) de una solución de Y.E. Se puede añadir una segunda solución de Y.E. a aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 , o S_{10} a aproximadamente 45 a 60 mL (por ejemplo, 45 a 50, 50 a 55, 55 a 60, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 64, 66 o 68 mL) de la solución de Y.E. Alternativamente, o adicionalmente, una alimentación puede ser introducida cuando uno de los dos conjuntos de condiciones siguientes ocurre: (1) la agitación alcanza por encima de aproximadamente 500-600 rpm, tal como aproximadamente 550 rpm, y el nivel de OD alcanza por encima de aproximadamente 35-50%, tal como aproximadamente 40 o 45%; o (2) la agitación alcanza por encima de aproximadamente 500-600 rpm, tal como aproximadamente 550 o 600 rpm, y el pH alcanza por encima de aproximadamente 7,1-7,3, tal como aproximadamente 7,2, 7,25 o 7,3. En una realización, se introduce una alimentación cuando ocurren ambos conjuntos de condiciones (1) y (2).

En una realización, la centrifugación de cualquiera de las etapas de la presente descripción utilizadas puede ser una centrifuga de flujo continuo. Alternativamente, o adicionalmente, la centrifugación puede realizarse en modo por lotes.

Para un experto en la técnica, el potasio no se utiliza típicamente en el estado de la técnica como parte del ingrediente para la alimentación de Y.E. En una realización de la presente descripción, la solución de Y.E. tiene una concentración de aproximadamente 320 a 560 g/L, particularmente de aproximadamente 385,0, 425,2, 428,6, 429,3, 450,7, 500,0 o 520,0 g/L. A diferencia de otros métodos, el presente método permite añadir una solución inicial de potasio en forma de K_2HPO_4 , a aproximadamente 410-440 g/L, en particular a aproximadamente 415,4, 420, 421,5, 422,3, 425, 432,5 o 440 g/L para alcanzar una concentración final de aproximadamente 2,0-3,0 M; y/o KH_2PO_4 a aproximadamente 190-230 g/L, en particular a aproximadamente 192,3, 200,2, 205,7, 211,1, 225 g/L para alcanzar una concentración final de aproximadamente 1,0 a 2,0 M. Se puede añadir solución de K^+ con la

alimentación de solución de extracto de levadura, de modo que la concentración final de potasio de K^+ sea de aproximadamente 35 a 40 mM, en particular de aproximadamente 36, 37, 38, 39 o 40 mM. En una realización, se puede añadir una solución de Y.E. en I_0 y una o más S_6 , S_7 y S_8 , o I_1 y S_5 y/o S_6 , o I_0 y S_9 y/o S_{10} , con aproximadamente 50 a 100 mL, particularmente 50, 58, 65, 73 o 95 mL de una solución de Y.E.

Durante la fermentación, la expresión de la proteína puede inducirse mediante la adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) derivado de una fuente no animal, en un fermentador para alcanzar una concentración final de aproximadamente 0,5-2,5 mM, más particularmente, de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,1 o 2,2 mM. En una realización, se añaden aproximadamente 3 a 5 mL de aproximadamente 0,70 a 0,85 mM de IPTG. En una realización, la inducción inicial puede ocurrir, y una segunda solución de extracto de levadura de alimentación ocurre cuando la DO_{600} del cultivo por lotes alimentados alcanza un valor de aproximadamente 40 a 80. Por ejemplo, el agente químico de inducción puede introducirse para inducir la expresión de la proteína en la célula huésped cuando el valor de DO_{600} del cultivo en el fermentador es de aproximadamente 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 55 a 60, 60 a 65, 65 a 70, 70 a 75, 75 a 80, 40, 45, 49, 52, 55, 60, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 75, 78 u 80. Después de la inducción inicial (I_0), la densidad óptica del cultivo por lote alimentado puede tomarse aproximadamente cada hora y registrarse. Adicionalmente, se puede añadir otro medio de alimentación que contenga aproximadamente 100-600 g/L de Y.E., ya sea por separado, o en combinación con IPTG, en particular, aproximadamente 100, 117, 180, 200, 250, 280, 300, 330, 400, 420, 428, 430, 450, 453, 460, 500, 534, 550 g/L de Y.E.

En una realización, se pueden recolectar las células huésped que expresan la proteína de interés (por ejemplo, cosechar) a aproximadamente 4-8 horas después de la inducción con IPTG (por ejemplo, I_4 a I_8 , I_4 , I_5 , I_6 , I_7 , o I_8), o por ejemplo, después de aproximadamente 5,0, 6,0 o 7,0 horas (I_5 , I_6 , o I_7).

En una realización, se pueden añadir o eliminar algunos parámetros y algunas etapas para aumentar el rendimiento. Por ejemplo, se pueden eliminar ciertas etapas, tales como la etapa de centrifugación por lotes o la adición de amortiguador de precipitación con sulfato de amonio (ASP) durante la

purificación. Otras realizaciones incluyen añadir u optimizar la centrifugación de la fermentación y la homogeneización, como establecer los procedimientos de centrifugación de la presente descripción.

En otra realización, el caldo celular tras la fermentación puede recolectarse y centrifugarse a aproximadamente 6000-7000 rpm, o aproximadamente 7000-8000 rpm, tal como a aproximadamente 6000, 6500, 7000, 7500 u 8000 rpm durante aproximadamente 10-30 minutos, tal como aproximadamente 10, 15, 20 o 30 minutos a aproximadamente 2-8 °C. El sobrenadante puede descartarse y puede registrarse el peso del sedimento celular, concretamente el peso celular húmedo (WCW, por sus siglas en inglés, Wet Cell Weight).

En algunos casos, los sedimentos celulares cosechados pueden resuspenderse en amortiguador TEN de aproximadamente 10-50 mM (con pH = $7,0 \pm 0,5$) a aproximadamente 7000-12000 rpm durante aproximadamente 20-50 segundos, y repetir entre 1 y 20 veces, particularmente, 8, 9, 10, 11 o 12 veces. La suspensión puede realizarse mediante agitación utilizando una barra de acero inoxidable en una relación de aproximadamente 0,5 a 2,0 g, en particular, aproximadamente 1,0, 1,3, 1,5 o 2,0 g de sedimento celular húmedo por cada 3,0-6,0 mL de amortiguador TEN. Tras la resuspensión, la mezcla de sedimento celular y amortiguador TEN puede homogeneizarse más de una vez a aproximadamente 800-1200 bar, por ejemplo, a 800, 850, 900, 952, 1000, 1052, 1100 o 1150 bar con un homogeneizador. A continuación, la mezcla celular puede centrifugarse mediante una centrífuga de flujo continuo a aproximadamente 10000-30000 rpm, como por ejemplo aproximadamente 10000, 15000, 25000, 26370 o 23800 rpm. Alternativamente, o adicionalmente, se puede realizar simultáneamente una alimentación amortiguadora a una velocidad de aproximadamente 35-45 ml/min, tal como aproximadamente 38, 40 o 43 ml/min, en un serpentín de enfriamiento y manteniéndolo posteriormente a aproximadamente 20000-30000 rpm, tal como a aproximadamente 26370, 25000 o aproximadamente 23800 rpm durante aproximadamente 10-20 min.

Posteriormente, en una realización, los sedimentos celulares pueden lavarse con amortiguador TEN 20 mM. Después del lavado, los sedimentos celulares se pueden alimentar a una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 10-40 ml/min, en particular, aproximadamente 10, 20, 30 o 40

ml/min con una velocidad de centrifugación a aproximadamente 10000-30000 rpm, por ejemplo, a aproximadamente 20000, 25000 o 30000 rpm durante aproximadamente 30-50 minutos, como aproximadamente 33, 42 o 50 minutos en el serpentín de enfriamiento y posteriormente manteniéndolo a aproximadamente 25000 rpm durante aproximadamente 15 minutos.

En una realización, luego pueden descartarse los sobrenadantes después de la centrifugación. Los sedimentos celulares pueden mezclarse con aproximadamente 3,0-5,0 M de GnHCl ($\text{pH} = \sim 7,0 \pm 0,5$), en particular aproximadamente 3,2, 4,0 o 4,5 M de GnHCl durante aproximadamente 30-50 minutos, en particular, aproximadamente 30, 35, 42, 47 o 50 minutos, para eliminar las impurezas.

En otra realización, para cada aproximadamente 2,0-2,5 g de sedimento celular húmedo, pueden añadirse aproximadamente 0,5-3,0 mL de aproximadamente 3,0-5,0 M de GnHCl, en particular aproximadamente 3,0, 4,0 o 4,5 M. Después de mezclar con una barra de acero inoxidable, la solución se puede transferir a un recipiente con la cantidad registrada. Alternativamente, o adicionalmente, la solución puede alimentarse a una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 25-38 ml/min con aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 15-20 minutos en el serpentín de enfriamiento y manteniéndolo posteriormente a aproximadamente 20000-30000 rpm, más particularmente a aproximadamente 22000, 25000, 28000 rpm durante aproximadamente 25-35 min, y el cuerpo de inclusión puede recolectarse y pesarse.

En un ejemplo no limitativo, el cuerpo de inclusión mencionado anteriormente se puede mezclar con aproximadamente 4,0-8,0M de GdnHCl ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$), en particular aproximadamente 6,0, 6,5, 6,8, 7,0 o 8,0M de GdnHCl, para solubilizar los cuerpos de inclusión. Por cada aproximadamente 2,5 g de sedimento celular húmedo, se puede añadir y mezclar aproximadamente 1 ml de GnHCl aproximadamente 4,0-8,0 M. Después de mezclar, se pueden añadir aproximadamente 1-3 M de Ditiotreitól (TDT), en particular aproximadamente 1,0, 1,3, 1,5 o 2,0M de DTT para lograr una concentración final de DTT de aproximadamente 4-8 mM, en particular, aproximadamente 4,0, 4,3, 5,0, 6,6 o 8,0 mM. La mezcla puede entonces agitarse a una velocidad de agitación de

aproximadamente 100-500 rpm, particularmente, aproximadamente 135, 200, 366, 400 o 450 rpm a temperatura ambiente durante aproximadamente 1,0-3,0 h, en particular, aproximadamente 1,0, 1,5 o 2,0 horas. Después de agitar, la solución se puede transferir a tubos de centrifugación de 500 ml y centrifugar a aproximadamente 10.000 a 30.000 rpm, en particular, aproximadamente 10.000 o 20.000 rpm durante aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 20°C. Los sobrenadantes que contienen proteína bruta (por ejemplo, extracto de proteína bruta) se pueden agrupar y recolectar en una botella de plástico etiquetada. La proteína se puede analizar mediante el ensayo de proteínas BCA (ácido bicinconínico).

El replegamiento de la proteína puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, véase la patente de Estados Unidos N.º 8.106.160 B2, cuyo contenido se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad. Opcionalmente, la proteína bruta en el extracto de proteína bruta puede separarse mediante cromatografía de columna de Q-Sepharose.

El tiempo total final de fermentación (por ejemplo, cuando las células huésped en un fermentador son retiradas o cosechadas) puede ser de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24, 48, 72, 80 horas o más dependiendo de las condiciones de fermentación, el tipo de proteína y el rendimiento deseado y/o la necesidad de calidad.

Aún en una realización, el proceso de fermentación por lote alimentado puede ejecutarse durante un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, la duración del proceso de fermentación puede estar en el rango de aproximadamente 0,5 a 72 horas, aproximadamente 1,0 a 40 horas, aproximadamente 2,0 a 10 horas, o más de aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 30,5, 31, 31,5, 32, 32,5, 33, 33,5, 34, 34,5, 35, 35,5, 36, 36,5, 37, 37,5, 38, 38,5, 39, 39,5, 40, 40,5, 41, 41,5, 42, 42,5, 43, 43,5, 44, 44,5, 45, 45,5, 46, 46,5, 47, 47,5, 48, 48,5, 49, 49,5, 50, 50,5, 51, 51,5, 52, 52,5, 53, 53,5, 54, 54,5, 55, 55,5, 56, 56,5, 57, 57,5, 58, 58,5, 59, 59,5, 60, 60,5, 61, 61,5, 62, 62,5, 63, 63,5, 64, 64,5, 65, 65,5, 66, 66,5, 67, 67,5, 68,

68,5, 69, 69,5, 70 ,70,5, 71, 71,5, 72, 80, 92 horas o más. La duración de la fermentación puede controlarse y puede depender del tamaño del fermentador.

En una realización, la proteína bruta puede purificarse mediante una columna de Q Sepharose Fast Flow para separar los restos celulares y la proteína. Véase el ejemplo 2 y/o 3 de la Pat. de EE. UU. N.º 8.106.160 B2, cuyo contenido se incorpora como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, las proteínas producidas usando el método de la presente descripción pueden adicionalmente, y/o alternativamente, someterse a cromatografía de intercambio iónico con el propósito de purificación. La cromatografía de intercambio iónico es típicamente una cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio aniónico utiliza una resina de intercambio iónico cargada positivamente con una afinidad por las moléculas que tienen cargas superficiales negativas netas. La cromatografía de intercambio aniónico se puede utilizar tanto con fines preparativos como analíticos y puede separar una amplia gama de moléculas, desde aminoácidos y nucleótidos hasta proteínas grandes.

En una realización, la proteína purificada puede determinarse también mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras utilizando geles de placa NuPAGE al 4-12%. La Figura 3 muestra un ejemplo de gel SDS-PAGE de producción de proteínas con varios tiempos de inducción. La banda marcada muestra el producto final.

En otra realización, la proteína puede ser sometida alternativamente y/o adicionalmente a C₁₈ RP-HPLC y SEC-HPLC para la evaluación de la calidad. Un ejemplo se puede ver en la Figura 4. El pico 2, tal como está etiquetado, puede ser el pico del disolvente.

En otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para la fabricación de productos biofarmacéuticos, que incluye, entre otros: proporcionar al menos un equipo configurado para la entrada de células; proporcionar al menos un equipo configurado para la expansión del inóculo; proporcionar al menos un equipo configurado para la perfusión en la etapa de producción; proporcionar al menos un equipo configurado para el intercambio de volumen; proporcionar al menos un equipo configurado para la purificación continua; proporcionar al

menos un equipo configurado para la filtración de reducción viral; proporcionar al menos un equipo configurado para ultrafiltración/diafiltración; proporcionar al menos un equipo configurado para el llenado masivo (bulk fill) automatizado; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para la entrada de células y el al menos un equipo configurado para la expansión del inóculo; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para la expansión del inóculo y al menos un equipo configurado para la perfusión en la etapa de producción; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para la perfusión en la etapa de producción y el al menos un equipo configurado para el intercambio de volumen; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para el intercambio de volumen y el al menos un equipo configurado para la purificación continua; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para la purificación continua y el al menos un equipo configurado para la filtración de reducción viral; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para la filtración de reducción viral; proporcionar al menos un conector entre el al menos un equipo configurado para ultrafiltración y diafiltración y el al menos un equipo configurado para el llenado masivo automatizado.

En otro aspecto de la descripción, un sistema de fabricación de productos biofarmacéuticos puede incluir, al menos, entre otros: al menos un equipo configurado para la entrada de células; al menos un equipo configurado para la expansión del inóculo; al menos un biorreactor de etapa de producción; al menos un equipo configurado para la recuperación primaria; al menos un equipo configurado para el intercambio de volumen; al menos un equipo configurado para la purificación continua; al menos un equipo para la alimentación automatizada durante la fermentación; al menos un equipo configurado para la filtración de reducción viral; y al menos un equipo configurado para el llenado masivo automatizado; y en donde los equipos están conectados, y en donde el al menos un equipo está conectado a través de al menos un tramo de tubería y al menos un conector, de tal manera que el contenido pueda pasar de un tramo del equipo a otro a través de la tubería.

En una realización, se puede determinar el rendimiento de la proteína de interés después del proceso de fermentación por lotes alimentados descrito en la presente invención. En algunas realizaciones, un extracto de proteína bruta obtenido como se describe en la presente invención puede ser sometido a una columna de intercambio iónico para eliminar impurezas grandes. La concentración de proteína puede ser analizada usando el ensayo de proteína BCA u otros métodos conocidos en la técnica.

En una realización, con el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción se puede aumentar el rendimiento de la proteína de interés en la proteína bruta después de la fermentación, en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En una realización, con el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción se puede aumentar el rendimiento de la proteína de interés en la proteína bruta tras la fermentación a aproximadamente 5 a 10 g o más (por ejemplo, aproximadamente 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 g o más) de la proteína de interés en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L. En otra realización, con el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción se puede aumentar el rendimiento de la proteína de interés en la proteína bruta tras la fermentación a aproximadamente 20 a 30 g o más (por ejemplo, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 g o más) de la proteína de interés en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 40 L.

Aún en una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción aumenta el rendimiento proteico total de la proteína de interés producida después de la fermentación y del procesamiento de los cuerpos de inclusión, en donde el rendimiento final de proteína se puede aumentar en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%,

110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

Aún en una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción aumenta el rendimiento proteico total de la proteína purificada final de interés producida después de la fermentación, del procesamiento de los cuerpos de inclusión, y de la purificación, en donde el rendimiento final de proteína se puede aumentar en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción puede aumentar el rendimiento de la proteína bruta de interés, como todos los tipos de interferón (Tipo I, Tipo II, a, b, o alfa, beta...etc.). La proteína bruta de

interferón producida tras la fermentación se puede aumentar en, al menos, aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta de interferón a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción puede aumentar el rendimiento de la proteína bruta de interés, como todos los tipos de interferón (Tipo I, Tipo II, a, b, o alfa, beta...etc.). La proteína bruta de interferón producida tras la fermentación se puede aumentar hasta aproximadamente 5 a 10 g o más (por ejemplo, aproximadamente 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 g o más) de la proteína de interés en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L. En otra realización, la proteína bruta de interferón producida tras la fermentación se puede aumentar hasta aproximadamente 5 a 30 g o más (por ejemplo, aproximadamente 20, 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 g o más) de la proteína de interés en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 40 L.

Aún en una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción aumenta el rendimiento total de proteína purificada para proteínas tales como interferón (a, b, o alfa, beta... etc.) tras la fermentación, el procesamiento de cuerpos de inclusión y las etapas de purificación, en donde el rendimiento final de interferón se puede aumentar en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta a partir de la fermentación de dichos interferones. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción aumenta el rendimiento de la proteína de interés, tal como prolina-interferón alfa-2b. La proteína bruta de prolina-interferón alfa-2b producida tras la fermentación se puede aumentar en al menos, aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos

15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta de prolina-interferón alfa-2b a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En otra realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción aumenta el rendimiento de la proteína de interés, tal como prolina-interferón alfa-2b. La proteína bruta de prolina-interferón alfa-2b producida tras la fermentación se puede aumentar hasta aproximadamente 5 a 10 g o más (por ejemplo, aproximadamente 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 g o más) de la proteína de interés en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L, o hasta aproximadamente 20 a 30 g o más (por ejemplo, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 g o más) de la proteína de interés en un fermentador con una capacidad de aproximadamente 40 L.

Aún en una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción aumenta el rendimiento total de proteína tal como prolina-interferón alfa-2b tras la fermentación, el procesamiento de cuerpo de inclusión, y la

purificación, en donde el rendimiento final de prolina-interferón alfa-2b aumentó en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta o purificada de prolina-interferón alfa-2b a partir de la fermentación. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En una realización, el uso de los métodos o sistemas de la presente descripción puede aumentar el rendimiento de proteína bruta GCSF. La proteína bruta GCSF producida tras la fermentación se puede aumentar en, al menos, aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%,

al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta GCSF a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método se puede aumentar en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

Aún en una realización, el uso de los métodos de la presente descripción aumenta el rendimiento total de proteína de GCSF purificado tras la fermentación, el procesamiento de cuerpos de inclusión, y la purificación, en donde el rendimiento final de GCSF se aumenta en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína

bruta y/o GCSF purificado a partir de la fermentación. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método puede aumentarse en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

En una realización, el uso de los métodos de la presente descripción puede aumentar el rendimiento de la proteína bruta del anticuerpo anti-PD-1. La proteína bruta de anticuerpo anti-PD-1 producida tras la fermentación se puede aumentar en, al menos, aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir el anticuerpo anti-PD-1 bruto a partir de la fermentación de dicha proteína de interés. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método puede aumentarse en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

Aún en una realización, el uso de los métodos de la presente descripción aumenta el rendimiento total de proteína de anticuerpo anti-PD-1 purificado tras la fermentación, el procesamiento de cuerpos de inclusión, y la purificación, en donde el rendimiento final de anticuerpo anti-PD-1 se aumenta en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos aproximadamente 51,7%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos aproximadamente 73,7%, al menos 75%, al menos 80%, al menos aproximadamente 84,7%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, o más, en comparación con el método conocido existente para producir proteína bruta y/o anticuerpo anti-PD-1 purificado a partir de la fermentación. En algunas realizaciones, en el caso de un fermentador de 40 L, el rendimiento del presente método puede aumentarse en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con 8 veces el rendimiento de un fermentador con una capacidad de aproximadamente 5 L en el método de fermentación conocido existente.

Modo de operación no limitativo

En una realización, el monitoreo de la velocidad de agitación, el pH y/o el oxígeno disuelto se puede realizar de forma continua a lo largo del proceso de fermentación, con la adición de fuentes de carbono y/o nitrógeno según sea necesario. Alternativamente, o adicionalmente, el monitoreo se puede realizar en intervalos de tiempo fijos. Los ejemplos no limitativos incluyen aproximadamente cada 1, 1,5, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5,

20, 20,5, 21, 21,5, 22,5 y/o 23 horas. Alternativamente, o adicionalmente, los intervalos de tiempo fijos pueden ser cada 30 minutos hasta 80 horas o más, dependiendo de la escala de fermentación. En otras realizaciones, la adición de la fuente de carbono y/o nitrógeno acumulada total puede depender de si se realiza un monitoreo continuo o por lotes de la velocidad de agitación, del pH y/o del oxígeno disuelto.

Resultados sorprendentes e inesperados

Es conocido en el estado de la técnica que el aumento de escala de la producción de proteínas en un bioproceso es un reto y resulta imprevisible. Por ejemplo, un aumento de escala de ocho veces, como de un fermentador de 5 L a uno de 40 L, no daría como resultado un aumento correspondiente de ocho veces en el rendimiento. De hecho, el resultado típico es una disminución en el rendimiento en relación con el aumento de escala; se sabe que el aumento en el volumen no proporciona un aumento teórico lineal. Además, a medida que aumenta el grado de aumento de escala, el rendimiento no solo no muestra un aumento lineal, sino que exhibe una disminución de la curvatura a medida que el bioproceso aumenta de tamaño.

Por lo tanto, la presente descripción demuestra más de un resultado inesperado. Por ejemplo, la adición de más etapas normalmente disminuiría el rendimiento por etapa; sin embargo, las etapas adicionales en los métodos descritos en la presente invención presentan el efecto contrario de conducir a un aumento del rendimiento. Además, la presente descripción demuestra que las condiciones aquí descritas, cuando se utilizan en una fermentación a mayor escala (por ejemplo, un fermentador de 40 L), no presentan la típica disminución del rendimiento de forma curva a medida que el volumen aumenta. De hecho, la presente descripción muestra que el rendimiento del método de fermentación descrito en la presente invención no solo puede aumentar más allá del rendimiento teórico lineal (es decir, multiplicando el rendimiento de una fermentación a menor escala por el factor de aumento del volumen del fermentador) del método conocido, sino que supera sustancialmente dicho rendimiento teórico (véanse, por ejemplo, los datos presentados en el Ejemplo 7 a continuación). Por lo tanto, la presente descripción demuestra resultados inesperados que se apartan de lo conocido en el estado de la técnica y la

sorprendente superioridad de los métodos mejorados descritos en la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Método para producir Pro-hIFN- α 2b a partir del método conocido

La patente de EE. UU. n.º 8.106.160 B2 describe un método conocido de fermentación de células para producir una proteína llamada Pro-hIFN alfa 2b. En este ejemplo, al método previamente descrito le siguió la realización de las etapas descritas. Más particularmente, se llevaron a cabo las siguientes etapas.

Un primer ácido nucleico que codifica hIFN- α 2b se purificó mediante PCR usando ADN genómico humano como patrón. Se designaron los cebadores de PCR en función de las secuencias flanqueantes de la región codificante del gen hIFN- α 2b. El producto de PCR así obtenido se clonó en un vector y luego se subclonó en pET-24a, un vector de expresión de proteínas.

Un segundo ácido nucleico que codifica Pro-hIFN- α 2b se obtuvo modificando el primer ácido nucleico descrito anteriormente mediante amplificación por PCR utilizando cebadores diseñados de acuerdo con la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la Figura 2 de la patente de EE. UU. n.º 8.106.160 B2. En resumen, se añadieron dos codones adicionales, que codifican Met y Pro al 5' del codón TGT que codifica Cys₁ de hIFN- α 2b maduro. También se clonó este ácido nucleico en el vector de expresión pET-24a.

Los vectores pET-24a, portadores de los genes de hIFN- α 2b y Pro-hIFN- α 2b, se transformaron entonces en la cepa BLR-CodonPlus (DE3)-RIL de *E. coli*. Se seleccionaron los clones de *E. coli* que expresaban altos niveles de estas dos proteínas. Tal como se diseñó, la proteína naciente expresada a partir del gen Pro-hIFN- α 2b tiene una metionina (Met) en su extremo N-terminal (Met-Pro-Cys-). Este residuo Met se eliminó en *E. coli* mediante digestión enzimática interna, dando como resultado una proteína madura que tiene una Pro en el extremo N terminal, que está ligado a la Cys₁ de hIFN- α 2b (Pro-Cys-).

El clon de *E. coli* que expresa ya sea hIFN- α 2b o Pro-hIFN- α 2b se cultivó en un matraz de 1000 ml que contenía 250 ml de medio de caldo SYN Broth (peptona de soja (soytone), extracto de levadura y NaCl) con kanamicina (50 µg/mL) y cloranfenicol (50 µg/ml) a 37 °C y 200 rpm durante 16 horas. Luego se

transfirieron 220 ml del cultivo nocturno a un fermentador de frasco de 5 litros que contenía 3 L de medio definido (10g/L de glucosa, 0,7g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3g/L de KH_2PO_4 , 6g/L de K_2HPO_4 , 1,7g/L de citrato, 10g/L de extracto de levadura, 10ml/L de oligoelemento, y g/L de isoleucina) con kanamicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 0,4% de glicerol, y 0,5% (v/v) de oligoelementos (10g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,25g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3g/L de H_3BO_3 , 2g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,84g/L de EDTA, y 50ml/L de HCl).

La concentración de oxígeno en el medio se controló al 30-40%, pero no al 35%, y su pH se mantuvo en aproximadamente 7,0 mediante la adición de agua amoniacal al 25% aproximadamente siempre que fue necesario. Se preparó una solución de alimentación que contenía aproximadamente 700-800g/L de glucosa y aproximadamente 15-20g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cuando el oxígeno disuelto aumentó a un valor mayor que el punto de ajuste, se añadió un volumen apropiado de la solución de alimentación para aumentar la concentración de glucosa en el medio de cultivo. La expresión del gen hIFN- $\alpha 2\text{b}$ o Pro-hIFN- $\alpha 2\text{b}$ se indujo por IPTG a una concentración final de aproximadamente 0,5-0,85 mM, luego la adición de material de alimentación (extracto de levadura y oligoelemento). Las células de *E. coli* que expresaban estas proteínas se recolectaron después de aproximadamente 3-5 horas después de la inducción con IPTG.

Las células de *E. coli* recolectadas se resuspendieron en amortiguador TEN (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM y NaCl 100 mM) en una relación de aproximadamente 1:10 (g de peso húmedo/mL), se rompieron mediante un homogeneizador y luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 min.

El sedimento que contenía los cuerpos de inclusión (CI) se lavó dos veces con amortiguador TEN y se centrifugó como se describió anteriormente, suspendiéndose en una relación de aproximadamente 1 ml de solución: 2,5 g de peso húmedo del sedimento por mL de una solución acuosa de HCl de guanidinio (GnHCl) 4 M, y luego se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 min. Los CI, que contenían hIFN- $\alpha 2\text{b}$ recombinante, se solubilizaron posteriormente en aproximadamente 50 mL de GnHCl 6 M con DTT aproximadamente 5 mM, lo cual se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h, seguido de una

centrifugación a 20.000 rpm durante 20 min a 25 °C. Se recolectó el sobrenadante. En este proceso, las proteínas recombinantes hIFN- α 2b o Pro-hIFN se desnaturalizaron.

Se realizó el análisis SDS-PAGE 13% usando el método conocido en el estado de la técnica. Los datos mostraron una concentración creciente de proteína a medida que aumenta el tiempo de inducción (datos no mostrados).

Los CI descritos anteriormente se mezclaron con 1,5 L de amortiguador de replegamiento recientemente preparado (Tris-HCl aproximadamente 100 mM (pH 7,0), L-Arginina aproximadamente 0,5 M, y EDTA aproximadamente 2 mM). La mezcla de reacción así formada se incubó durante aproximadamente 24-36 h sin agitar a temperatura ambiente para permitir el replegamiento de las proteínas recombinantes hIFN- α 2b y Pro-hIFN- α 2b. A continuación, las proteínas replegadas se dializaron contra amortiguador Tris-HCl aproximadamente 20 mM, pH 7,0 y se purificaron adicionalmente mediante cromatografía en columna Q-Sepharose descrita a continuación.

Se preequilibró una columna Q-Sepharose y se lavó con un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7,0). Las proteínas recombinantes replegadas se cargaron en la columna Q-Sepharose equilibrada y se eluyeron con un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) que contenía aproximadamente 80 mM de NaCl. Se recolectaron fracciones que contenían Pro-hIFN- α 2b en función de su absorbancia a 280 nm. Las concentraciones de estas proteínas se determinaron mediante un kit de ensayo de proteínas utilizando el método Bradford.

La conformación de las proteínas recombinantes replegadas se determinó mediante HPLC de fase inversa C₁₈ (RP-HPLC), en la que se separaron proteínas nativas y monómeros lentos. El análisis RP-HPLC se realizó en un sistema HPLC equipado con un controlador de gradiente automatizado, dos bombas de amortiguación, detector UV y un grabador-integrador. Una columna de HPLC C₁₈ (46 mm x 250 mm, 5 μ m tamaño de partícula; 300 Å tamaño de poro) se equilibró en un amortiguador A al 80%: TFA al 0,2% (v/v) en acetonitrilo:agua 30:70 (grado HPLC). Las proteínas se eluyeron de la columna de HPLC C₁₈ utilizando el amortiguador B (TFA al 0,2 % en acetonitrilo:agua 80:20) a una velocidad de flujo de 1 ml/min de acuerdo con el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	Eluyente A	Eluyente B
0	72	28
1	72	28
5	67	33
20	63	37
30	57	43
40	40	60
42	40	60
50	72	28

Los resultados obtenidos del análisis de HPLC C₁₈ indican que una cantidad sustancial de las proteínas recombinantes replegadas hIFN- α 2b son monómeros lentos. De manera diferente, solo hay poca contaminación de monómeros lentos en las proteínas Pro-hIFN- α 2b recombinantes replegadas.

hIFN- α 2b se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna Q-Sepharose como se describió anteriormente. Las isoformas de hIFN- α 2b, incluyendo oligómeros y monómeros lentos, contenidas en las proteínas purificadas, se retiraron de acuerdo con el método descrito en la patente de EE. UU. n.º 4.534.906. En resumen, las proteínas se mezclaron con el amortiguador ASP (sulfato de amonio aproximadamente 3 M y NaOAc aproximadamente 1 M) hasta alcanzar la concentración final (sulfato de amonio aproximadamente 0,9 M y NaOAc aproximadamente 20 mM) a un valor de pH de aproximadamente 4,5. La mezcla se incubó a temperatura ambiente (por ejemplo, 34 a 40 °C) durante 20 minutos para efectuar la formación de precipitados de proteína, que incluyen monómeros lentos y oligómeros. Se retiraron los precipitados por centrifugación y se recolectó el sobrenadante que contenía hIFN- α 2b en forma nativa. Las muestras de proteínas antes y después del tratamiento con sulfato de amonio/cloruro de sodio se analizaron mediante HPLC de fase reversa C18. Las proteínas hIFN- α 2b preparadas mediante purificación en columna de Q-Sepharose incluyen un cierto número de isoformas. Estas isoformas se han retirado después del tratamiento con sulfato de amonio/cloruro de sodio.

Ejemplo 2: Cantidad de rendimiento de proteína del método conocido

La proteína bruta se pasó por una columna de intercambio iónico para eliminar las impurezas. Posteriormente, algunas proteínas purificadas se sometieron a otro SDS-PAGE realizado mediante un método conocido en el estado de la

técnica para determinar si la proteína producida coincide con el tamaño de un estándar.

La Tabla 1 muestra el resultado de la técnica anterior, donde la columna izquierda muestra el número de lote, y la columna derecha muestra el rendimiento de proteína entre paréntesis, junto con el nuevo número de lote. Además, como se describe en una realización anterior, se pueden preparar dos (2) o más lotes de fermentación y combinar en un solo lote con el fin de tener suficiente proteína para realizar cualquier modificación química adicional deseable. La Tabla 1 muestra la información de rendimiento para la proteína utilizando el método conocido, por ejemplo, para la patente de EE. UU. número 8.106.160.

Tabla 1

Número de lote	Rendimiento de proteína
7002	4,26 g
7003	
7004	4,42 g
7007	
7008	4,04 g
7009	

Los lotes 7002 y 7003 se fermentaron por separado cada uno en volumen de 5L, se combinaron. Del mismo modo, los lotes 7004 y 7007 se fermentaron por separado y combinaron. Igualmente, para los lotes 7008 y 7009. El rendimiento promedio para 6 lotes de fermentación es de aproximadamente 2,12 g de la proteína de interés por un fermentador de 5L.

Ejemplo 3

Nuevo método para producir Pro-hIFN- α 2b

A diferencia de los ejemplos 1-2, este ejemplo ilustra un nuevo método de fermentación para mejorar el rendimiento de proteínas, incluso cuando se añadieron más etapas, cuyo resultado es sorprendente e inesperado. Estas nuevas etapas no son la optimización rutinaria por un experto en la técnica. En este caso, la proteína particular elegida es también IFN α -2b modificado con

prolina en el extremo N-terminal, para realizar una comparación del rendimiento entre el Ejemplo 1 y el Ejemplo 3.

En este ejemplo, se utilizó un vial de BLR de *E. coli* (DE3) recombinante al cual ya se le ha transfectado el vector de expresión para expresar el gen IFNa-2b modificado con metionina-prolina en el extremo N-terminal mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. La célula se tomó de nitrógeno líquido. Después de descongelar y equilibrar a temperatura ambiente, las células de *E. coli* se transfirieron a 250 ml del medio SYN en un matraz estéril de 1L. El medio se premezcló con aproximadamente 50 µg/ml de kanamicina y aproximadamente 50 µg/ml de cloranfenicol. Las células se cultivaron a 37°C en una incubadora agitadora a aproximadamente 100-200 rpm durante aproximadamente 10 a 20 horas de cultivo, en particular, aproximadamente 16 ± 1 h de cultivo durante la noche.

Después del crecimiento celular, se transfirieron por separado aproximadamente 200 a 230 ml, por ejemplo, aproximadamente 205, 210 o 220 ml del cultivo inicial a botellas de siembra estériles de 250 ml en una campana de flujo laminar y luego se bombearon a fermentadores. Inicialmente, cada fermentador contenía aproximadamente 1-3L de medio básico suplementado con aproximadamente 1-3 g/L de isoleucina, tal como aproximadamente 1,4, 2,0, o 2,6 g/L de isoleucina, aproximadamente 5-10 g/L de glucosa básica, aproximadamente 25 µg/ml de kanamicina, y aproximadamente 25µg/ml de cloranfenicol y se polarizó a aproximadamente 36-38°C, tal como 36,5 o 37°C durante la noche. Posteriormente, el cultivo se introdujo en un fermentador de 5 L y se inoculó durante aproximadamente 3-5 minutos, lo cual se considera como el punto de tiempo cero para medir el crecimiento celular. Durante la fermentación, se tomaron individualmente aproximadamente 10-20 ml del caldo de cultivo a intervalos de aproximadamente 1,0-2,0 h para medir la densidad óptica a 600 nm mediante un espectrómetro de absorción. El pH de la fermentación por lotes alimentados se controló a aproximadamente pH 7,0-7,5, tal como pH 7,1, 7,2 o 7,5 mediante la adición automatizada de NH₄OH. El nivel de oxígeno disuelto (OD) se controló para que se encuentre a menos de aproximadamente 35,0% (pero no igual al 35,0%, por ejemplo, al 30,0%, ocasionalmente podría cruzar el 35,0% para alcanzar un OD superior) de saturación de aire a medida que la

velocidad de agitación aumentó gradualmente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 rpm. Se suministró oxígeno puro cuando la velocidad de agitación alcanzó su límite superior y se requirió más oxígeno. Se añadió solución de glucosa usando una bomba controlada por programa que se ajustó para alimentar cuando (1) el nivel de OD superaba (o registraba un pico por encima de) aproximadamente 30-40% o por encima de aproximadamente 40%, y la velocidad de agitación superaba aproximadamente 350-450 rpm; y/o (2) cuando la velocidad de agitación superaba aproximadamente 500-650 rpm y el pH superaba aproximadamente 7,0-7,2. Se añadieron aproximadamente 30-50 ml/L de una emulsión de antiespumante Y-30 para evitar el exceso de espuma durante la fermentación por lote alimentado. Se bombearon aproximadamente 50-60 ml de solución de alimentación de extracto de levadura al fermentador tras la inoculación inicial (semilla) a aproximadamente 5,0, 6,0, 7,0 u 8,0 horas (o S_5 , S_6 , S_7 o S_8) post-siembra dependiendo de la DO_{600} o de las condiciones generales de fermentación. La expresión de proteína se logró mediante la adición de aproximadamente 3 a 5 ml de aproximadamente 0,75, 1,0 o 1,5 M de IPTG (también conocida como inducción inicial, o I_0) en el fermentador junto con aproximadamente 120 ml de solución de alimentación de extracto de levadura cuando la DO_{600} del cultivo alimentado por lotes alcanzó un valor de aproximadamente 70-80, por ejemplo, aproximadamente 71, 73, 75, 77, 79 u 80. La cantidad exacta depende de la DO_{600} y de las condiciones generales de fermentación. Tras la inducción, se midió y registró cada hora la densidad óptica del cultivo por lotes alimentados.

Después de aproximadamente 4-8 horas de inducción mediante IPTG, (I_4 a I_8), se recolectó el cultivo por lotes alimentados. El caldo de cultivo celular se recolectó en una botella de centrifugación de aproximadamente 500 ml y se centrifugó a aproximadamente 7000-9000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se registró el peso del sedimento celular, concretamente el peso celular húmedo (WCW). Se determinó el nivel de expresión de proteína mediante SDS-PAGE reductora usando geles de placas NuPAGE al 4-12%. Luego, los sedimentos celulares se transfirieron a una caja de almacenamiento.

Los sedimentos celulares obtenidos de la etapa de cosecha celular se resuspendieron por completo en amortiguador TEN 20 mM ($\text{pH}=7,0 \pm 0,5$) con una agitación de aproximadamente 7000 a aproximadamente 12000 rpm usando una barra de acero inoxidable en una relación de aproximadamente 1 g de sedimento celular húmedo a aproximadamente 1,0, 3,0 o 5,0 ml de amortiguador TEN. Después de la resuspensión completa, la mezcla de sedimento celular/amortiguador TEN se homogeneizó dos veces a aproximadamente 800-1200 bar, particularmente a aproximadamente 950, 1000, 1050 o 1100 bar con un homogeneizador. La mezcla celular se centrifugó posteriormente mediante centrifugación de flujo continuo a aproximadamente 20000-30000 rpm, con una alimentación de materiales que debían centrifugarse nuevamente a una velocidad de aproximadamente 30-50 ml/min en el serpentín de enfriamiento, y manteniéndose posteriormente a aproximadamente 20000-30000 rpm durante aproximadamente 10-30 min. El sedimento se recolectó tras la centrifugación.

Los sedimentos celulares se lavaron con amortiguador TEN 20 mM ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$) en la relación de aproximadamente 0,8-1,2 g de sedimento celular húmedo a 1,0 a 3 ml de amortiguador TEN. Tras el lavado, los sedimentos celulares se introdujeron en la centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 30-40 ml/min, con una velocidad de centrifugación de aproximadamente 25000 rpm durante aproximadamente 40-45 minutos en el serpentín de enfriamiento, manteniéndose posteriormente a aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 10-15 min. Los sobrenadantes se descartaron tras la centrifugación de flujo continuo.

Luego, los sedimentos celulares se mezclaron con GnHCl de aproximadamente 4-6 M ($\text{pH}= 7,0 \pm 0,5$) durante aproximadamente 30 minutos para eliminar las proteínas no deseadas. Por cada aproximadamente 2,0-2,5 g de sedimento celular húmedo, se añadieron aproximadamente 0,5-1,0 ml de GnHCl de aproximadamente 4-6 M. Tras una mezcla exhaustiva utilizando una barra de acero inoxidable, la solución se transfirió a un vaso de precipitados de 1 L, registrándose la cantidad obtenida. La solución se introdujo en una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 20-30 ml/min con aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos en el serpentín de enfriamiento y posteriormente manteniéndose a

aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 20-30 min. Se descartaron los sobrenadantes después de la centrifugación y se recolectaron los cuerpos de inclusión lavados dos veces.

Luego se mezclaron los cuerpos de inclusión lavados anteriormente con GdnHCl de aproximadamente 4,0-6,0 M para solubilizar los cuerpos de inclusión. Por cada aproximadamente 2,0-2,5 g de sedimento celular húmedo, se añadieron aproximadamente 0,5-1,0 ml de GdnHCl. Tras una mezcla completa, la solución se transfirió a una botella de plástico y se añadió una cantidad designada de ditiotreitól (DTT) de aproximadamente 0,5 a 2,0 M para alcanzar una concentración final de DTT de aproximadamente 4,0-6,0 mM. La mezcla de la muestra se agitó a una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm a temperatura ambiente durante aproximadamente 1,0-3,0 horas. Después de agitar, la solución se transfirió de nuevo a los tubos de centrifuga de 500 ml. Los sobrenadantes que contenían proteína se agruparon y recolectaron en una botella de plástico etiquetada.

Ejemplo 4

Ensayo de proteína

Como se muestra en la Figura 2, las proteínas brutas de lisado celular post inducción mediante IPTG se analizaron en gel SDS. De izquierda a derecha: Marcador (M), patrón de referencia (2µg) (RS), inducción obtenida a 0h (I₀), inducción obtenida a 1h (I₁), inducción obtenida a 2h (I₂), inducción obtenida a 3h (I₃), inducción obtenida a 4h (I₄), inducción obtenida a 5h (I₅). Las concentraciones de proteína bruta se determinaron mediante el ensayo de proteína BCA.

El replegamiento de proteínas se realizó mediante procesos conocidos en la técnica. Por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 8.106.160 B2, que se incorpora al presente por referencia.

Ejemplo 5

Análisis de proteína purificada

Se determinó la presencia de Pro hIFN-α2b purificado mediante SDS-PAGE reductora. La proteína bruta se pasó por una columna de intercambio iónico para

eliminar las impurezas grandes. Posteriormente, las muestras se sometieron a otro SDS-PAGE realizado mediante un método conocido en la técnica para determinar si la proteína producida coincide con el tamaño de un patrón. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de proteína BCA. Como se observa en la Figura 3, el marcador (M), Pro hIFN- α 2b (2 μ g) (SA), la proteína estándar (5 μ g) (RS), todos mostraron que el producto final de la muestra coincide con el patrón. También se llevó a cabo la HPLC de fase inversa C₁₈, siendo la Figura 4 una curva representativa.

Ejemplo 6

Comparación de rendimiento

Los nuevos métodos se realizaron varias veces, ya que cada lote podría presentar un rendimiento ligeramente diferente. Los resultados mostraron que se obtuvo un promedio de 8,13 gram/5L de fermentador de Pro-hIFN- α 2b. En comparación con el método conocido en la técnica, esto representa un aumento significativo de 2,12 g a 8,13 g en un fermentador de 5 L, un aumento de aproximadamente 383% en el rendimiento. Este aumento, mucho menos el grado significativo del mismo, es sorprendente e inesperado debido al aumento del número de etapas, lo que debería disminuir el rendimiento en cada etapa adicional. Este resultado no se puede lograr mediante optimización rutinaria.

Ejemplo 7

Aumento de escala en fermentador de 40 L

En este ejemplo, se utilizó un fermentador de mayor capacidad de 40 L en comparación con el ejemplo 3. Para aumentar la escala, se incrementaron proporcionalmente las cantidades de todos los ingredientes sin cambiar la concentración final, en este caso, ocho veces más que lo descrito en el ejemplo 3. Sin embargo, las condiciones de fermentación no se modificaron, por ejemplo, las alimentaciones con fuentes de carbono y nitrógeno.

Más particularmente, se extrajo del nitrógeno líquido un vial de BLR (DE3) de *E. coli* recombinante con el vector del gen IFN α -2b modificado en el extremo N terminal con metionina-prolina, que ya se había transfectado mediante método conocidos en la técnica. Después de descongelar y equilibrar a temperatura ambiente, las células de *E. coli* se transfirieron a 250 ml del medio SYN en un

matraz estéril de 1L. El medio se premezcló con aproximadamente 50 µg/ml de kanamicina y aproximadamente 50 µg/ml de cloranfenicol. Luego, las células se cultivaron a 37°C en una incubadora agitadora a aproximadamente 100-200 rpm durante aproximadamente 10 a 20 horas de cultivo. En particular, aproximadamente 14 ± 3 h o 16 ± 1 h de cultivo nocturno.

Tras el crecimiento celular, aproximadamente 200 a 230 ml, tal como aproximadamente 205, 210 o 220 ml del cultivo inicial, se transfirieron por separado a botellas de siembra estériles de 250 ml en una campana de flujo laminar y, a continuación, se bombearon a fermentadores de 40 l, con un medio básico suplementado con aproximadamente 1-3 g/L de isoleucina, tal como aproximadamente 1,4, 2,0 o 2,6 g/L de isoleucina, aproximadamente 5-10 g/L de glucosa básica, aproximadamente 25 µg/ml de kanamicina y aproximadamente 25 µg/ml de cloranfenicol, y se polarizó a aproximadamente 36-38, tal como 36,5 o 37°C, durante toda la noche. Posteriormente, el cultivo se introdujo en un fermentador y se inoculó durante aproximadamente 3-5 minutos, lo cual se considera como el punto de tiempo cero para medir el crecimiento celular. Durante la fermentación, se tomaron individualmente aproximadamente 10-20 ml del caldo de cultivo a intervalos de aproximadamente 1,0-2,0 h para medir la densidad óptica a 600 nm mediante un espectrómetro de absorción. El pH de la fermentación por lotes alimentados se controló a aproximadamente pH 7,0-7,5, tal como aproximadamente pH 7,1, 7,2 o 7,5 mediante la adición automatizada de NH₄OH. El nivel de oxígeno disuelto (OD) se controló para que se encuentre a menos de aproximadamente 30,0-35,0% (pero no igual al 35,0%) de saturación de aire a medida que la velocidad de agitación aumentó gradualmente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 rpm. Se suministró oxígeno puro cuando la velocidad de agitación alcanzó su límite superior y se requirió más oxígeno. Se añadió solución de glucosa usando una bomba controlada por programa que se ajustó para alimentar cuando (1) el nivel de OD superaba (o registraba un pico por encima de) aproximadamente 30-40% y la velocidad de agitación superaba aproximadamente 350-450 rpm; y/o (2) cuando la velocidad de agitación superaba aproximadamente 500-600 rpm y el pH superaba aproximadamente 7,0-7,2. Se añadieron aproximadamente 30-50 ml/L de una emulsión de antiespumante Y-30 para evitar el exceso de espuma durante la

fermentación. Se bombearon aproximadamente 400-480 ml de solución de alimentación de extracto de levadura al fermentador tras la inoculación inicial (semilla) a aproximadamente 5,0, 6,0, 7,0 u 8,0 horas (o S₅, S₆, S₇ o S₈) post-siembra dependiendo de la DO₆₀₀ o de las condiciones generales de fermentación. La expresión de proteína se logró mediante la adición de aproximadamente 35-45 ml de aproximadamente 0,75, 1,0 o 1,5 M de IPTG (también conocida como inducción inicial, o I₀) en el fermentador junto con aproximadamente 900-1000 ml de solución de alimentación de extracto de levadura cuando la DO₆₀₀ del cultivo alimentado por lotes alcanzó un valor de aproximadamente 70-80, por ejemplo, aproximadamente 71, 73, 75, 77, 79 u 80. La cantidad exacta depende de la DO₆₀₀ y de las condiciones generales de fermentación. Tras la inducción, se midió y registró cada hora la densidad óptica del cultivo por lotes alimentados.

Después de aproximadamente 4-8 horas de inducción mediante IPTG, (I₄ a I₈), se recolectó el cultivo por lotes alimentados. El caldo de cultivo celular se recolectó en botellas de centrifugación y se centrifugó a aproximadamente 7000-9000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos a 4°C. Posteriormente, se descartaron los sobrenadantes y se registraron los pesos de los sedimentos celulares, concretamente el peso celular húmedo (WCW). Se determinó el nivel de expresión de proteína mediante SDS-PAGE reductora usando geles de placas NuPAGE al 4-12%. Luego, los sedimentos celulares se transfirieron a una caja de almacenamiento.

Los sedimentos celulares obtenidos de la etapa de cosecha de células se pueden procesar en lotes o de inmediato. Aquí, los sedimentos se resuspendieron por completo en amortiguador TEN 20 mM (pH=7,0 ± 0,5) con una agitación de aproximadamente 7000 a aproximadamente 12000 rpm usando una barra de acero inoxidable en una relación de aproximadamente 1 g de sedimento celular húmedo a aproximadamente 1,0, 3,0 o 5,0 ml de amortiguador TEN. Después de la resuspensión completa, la mezcla de sedimento celular/amortiguador TEN se homogeneizó dos veces a aproximadamente 800-1200 bar, particularmente a aproximadamente 950, 1000, 1050 o 1100 bar con un homogeneizador. La mezcla celular se centrifugó posteriormente a aproximadamente 20000-30000 rpm durante aproximadamente 30-50 ml/min en el serpentín de enfriamiento, y

manteniéndose posteriormente a aproximadamente 20000-30000 rpm durante aproximadamente 10-30 min. El sedimento se recolectó tras la centrifugación.

Los sedimentos celulares se lavaron con amortiguador TEN 20 mM ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$) en la relación de aproximadamente 0,8-1,2 g de sedimento celular húmedo a aproximadamente 1,0 y 3 ml de amortiguador TEN. Tras el lavado, los sedimentos celulares se introdujeron en una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 30-40 ml/min con una velocidad de centrifugación de aproximadamente 25000 rpm durante aproximadamente 40-45 minutos en el serpentín de enfriamiento y manteniéndose posteriormente a aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 10-15 min. Los sobrenadantes se descartaron tras la centrifugación.

Luego, los sedimentos celulares se mezclaron con GnHCl de aproximadamente 4-6 M ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$) durante aproximadamente 30 minutos para eliminar las proteínas no deseadas. Por cada aproximadamente 2,0-2,5 g de sedimento celular húmedo, se añadieron aproximadamente 0,5-1,0 ml de aproximadamente 4-6 M de GnHCl . Tras una mezcla exhaustiva utilizando una barra de acero inoxidable, la solución se transfirió a un recipiente con la cantidad registrada. La solución se introdujo en una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 20-30 ml/min con aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos en el serpentín de enfriamiento y posteriormente manteniéndose a aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 20-30 min. Se descartaron los sobrenadantes después de la centrifugación y se recolectaron los cuerpos de inclusión lavados dos veces.

Luego se mezclaron los cuerpos de inclusión lavados anteriormente con GdnHCl de aproximadamente 4,0-6,0 M para solubilizar los cuerpos de inclusión. Por cada aproximadamente 2,0-2,5 g de sedimento celular húmedo, se añadieron aproximadamente 4-8 ml de GnHCl . Tras una mezcla completa, la solución se transfirió a una botella de plástico y se añadió una cantidad designada de ditiotreitól (DTT) de aproximadamente 0,5 a 2,0 M para alcanzar una concentración final de DTT de aproximadamente 4,0-6,0 mM. La mezcla de la muestra se agitó a una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm a temperatura ambiente durante aproximadamente 1,0-3,0 horas. Después de

agitar, la solución se transfirió de nuevo a la centrífuga. Los sobrenadantes que contenían proteína se agruparon y recolectaron.

El replegamiento de proteínas también se realizó mediante procesos descritos en la patente de EE. UU. n.º 8.106.160 B2, y el ensayo SDS PAGE en la escala de 40L mostró sustancialmente los mismos resultados en comparación con el Ejemplo 5 y/o la Figura 4 de la presente descripción.

El rendimiento promedio de los ciclos de fermentación de 40 L fue de aproximadamente 24-26 g. En comparación con el Ejemplo 1, este rendimiento es un aumento de 1132% a aproximadamente 1226%. Más importante aún, en función del rendimiento teórico del aumento de escala, suponiendo el mejor escenario ideal de aumento lineal del rendimiento (que no es el consenso científico), el aumento de escala de 5L a 40L podría haber dado lugar a un aumento del rendimiento de 2,12 g a 16,96 g (8 veces más, en función del cambio de 5L a 40L). Sin embargo, sorprendentemente y ventajosamente, los datos muestran un rendimiento de aproximadamente 24-26g en promedio. Esto representa un aumento de aproximadamente 141% a aproximadamente 155%. Es conocido en la técnica que, a medida que aumenta el grado de aumento de escala, el rendimiento no solo no aumenta linealmente, sino que presenta una disminución de la curvatura con el aumento del tamaño. Por lo tanto, el rendimiento del aumento de escala a 40 L demuestra un resultado sorprendente, inesperado e impredecible en función de lo que se conoce en la técnica.

Ejemplo 8

GCSF

Del mismo modo, el presente método de fermentación se puede aplicar para producir diversas proteínas. Un ejemplo es la producción de GCSF. Como GCSF puede fermentarse en *E. coli*, se añade típicamente una metionina ("M") en el extremo N terminal. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína se encuentra en SEQ ID NO:1 y en la Figura 5.

En este caso, un primer ácido nucleico que codifica GCSF puede amplificarse mediante PCR usando ADN genómico humano como patrón. Los cebadores de PCR pueden diseñarse en función de las secuencias flanqueantes de la región codificante del gen GCSF. El producto de PCR, por ende, puede clonarse en un

vector pGEM-T y luego subclonarse en pET-24a, un vector de expresión de proteínas.

Los vectores pET-24a, portadores de los genes GCSF, pueden ser luego transformados en *E. coli* BL21 o *E. coli* BLR-CodonPlus (DE3) con la cepa del vector RIL. Pueden seleccionarse los clones de *E. coli* que expresan altos niveles de las proteínas.

Las células de *E. coli* pueden ser transferidas a 250 ml del medio SYN en un matraz estéril de 1L. El medio puede premezclarse con aproximadamente 50 µg/ml de kanamicina y aproximadamente 50 µg/ml de cloranfenicol. Luego, las células pueden cultivarse a aproximadamente 37°C en una incubadora agitadora a aproximadamente 100-300 rpm durante aproximadamente 10 a 20 horas de cultivo, en particular, aproximadamente 16 ± 1 h de cultivo durante la noche.

Después del crecimiento celular, aproximadamente 200 a 230 ml, tal como aproximadamente 205, 210 o 220 ml del cultivo inicial pueden transferirse por separado a botellas de siembra estériles de 250 ml en una campana de flujo laminar y luego pueden bombearse a fermentadores. Inicialmente, cada fermentador contiene aproximadamente 1-3L de medio básico suplementado con aproximadamente 1-3 g/L de isoleucina, tal como aproximadamente 1,4, 2, o 2,6 g/L de isoleucina, aproximadamente 10 g/L de glucosa básica, aproximadamente 25 µg/ml de kanamicina, y aproximadamente 25µg/ml de cloranfenicol y se polarizó a aproximadamente 36-38°C, tal como 36,5 o 37°C durante la noche. Posteriormente, el cultivo puede introducirse en un fermentador e inocularse durante aproximadamente 2-4 minutos, lo cual se considera como el punto de tiempo cero para medir el crecimiento celular. Durante la fermentación, pueden tomarse individualmente aproximadamente 20 ml del caldo de cultivo a intervalos de aproximadamente 1,5-2 h para medir la densidad óptica a 600 nm mediante un espectrómetro de absorción. El pH de la fermentación por lotes alimentados puede controlarse a aproximadamente pH 7, tal como aproximadamente pH 7,1, 7,2 o 7,5 mediante la adición automatizada de NH₄OH. El nivel de oxígeno disuelto (OD) puede mantenerse en menos de aproximadamente 35% (sin incluir 35%) de saturación de aire a medida que la velocidad de agitación puede aumentarse gradualmente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 rpm y suministrando oxígeno puro cuando la

velocidad de agitación alcanza su límite superior, y se requiere más oxígeno. Puede añadirse solución de glucosa usando una bomba controlada por programa que puede ajustarse para alimentar cuando el nivel de OD supere aproximadamente 35-40% y la velocidad de agitación supere aproximadamente 300-450 rpm; y/o cuando la velocidad de agitación supere aproximadamente 500-600 rpm y el pH supere aproximadamente 7,2. Pueden añadirse aproximadamente 50 ml/L de una emulsión de antiespumante Y-30 para evitar el exceso de espuma durante la fermentación por lote alimentado. Pueden bombearse aproximadamente 50-60 ml de solución de alimentación de extracto de levadura al fermentador tras la inoculación inicial (semilla) a aproximadamente 5, 6, 7 u 8 horas (o S_5 , S_6 , S_7 o S_8) post-siembra dependiendo de la DO_{600} o de las condiciones generales de fermentación. La expresión de proteína puede lograrse mediante la adición de aproximadamente 5 ml de aproximadamente 0,75, 1 o 1,5 M de IPTG (también conocida como inducción inicial, o I_0) en el fermentador junto con aproximadamente 120 ml de solución de alimentación de extracto de levadura cuando la DO_{600} del cultivo por lote alimentado alcanza un valor de aproximadamente 70-80, por ejemplo, aproximadamente 71, 73, 75, 77, 79 u 80. La cantidad exacta depende de la DO_{600} y de las condiciones generales de fermentación. Tras la inducción, puede medirse y registrarse cada hora la densidad óptica del cultivo por lotes alimentados.

Después de aproximadamente 4-8 horas de inducción mediante IPTG, (I_4 a I_8), puede recolectarse el cultivo por lotes alimentados. El caldo de cultivo celular puede recolectarse en una botella de centrifugación de aproximadamente 500 ml y centrifugarse a aproximadamente 7000-9000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos a 4°C. Posteriormente, puede descartarse el sobrenadante y puede registrarse el peso del sedimento celular, concretamente el peso celular húmedo (WCW). El nivel de expresión de proteína puede determinarse mediante SDS-PAGE reductora usando geles de placas NuPAGE al 4-12%. Luego, puede transferirse el sedimento celular a una caja de almacenamiento y almacenarse.

Los sedimentos celulares pueden obtenerse de la etapa de cosecha celular y resuspenderse en amortiguador TEN 20 mM (pH=7,0 $\pm$ 0,5) con una agitación

de aproximadamente 7000 y aproximadamente 12000 rpm usando una barra de acero inoxidable en una relación de aproximadamente 1 g de sedimento celular húmedo a aproximadamente 1, 3 o 5 ml de amortiguador TEN. Después de la resuspensión completa, la mezcla de sedimento celular/amortiguador TEN puede homogeneizarse dos veces a aproximadamente 800-1200 bar, particularmente a 950, 1000, 1050 o 1100 bar con un homogeneizador. La mezcla celular puede centrifugarse posteriormente mediante CEPA LE GP de flujo continuo a aproximadamente 20000-30000 rpm, con una alimentación de materiales que debían centrifugarse nuevamente a una velocidad de aproximadamente 30-50 ml/min en el serpentín de enfriamiento, y posteriormente puede mantenerse a aproximadamente 20000-30000 rpm durante aproximadamente 10-30 min. El sedimento puede recolectarse tras la centrifugación.

Los sedimentos celulares pueden lavarse con amortiguador TEN 20 mM (pH = $7,0 \pm 0,5$) en la relación de 1 g de sedimento celular húmedo a aproximadamente 1 y 3 ml de amortiguador TEN. Tras el lavado completo, los sedimentos celulares pueden introducirse en la centrífuga a una velocidad de alimentación de 40 ml/min, con una velocidad de centrifugación de aproximadamente 25000 rpm durante aproximadamente 30-42 minutos en el serpentín de enfriamiento y pueden mantenerse posteriormente a aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 15 min. Los sobrenadantes pueden descartarse tras la centrifugación de flujo continuo.

Luego, los sedimentos celulares pueden mezclarse con GnHCl 4 M (pH= $7,0 \pm 0,5$) durante 30 minutos para eliminar las proteínas no deseadas. Por cada aproximadamente 2,5 g de sedimento celular húmedo, pueden añadirse aproximadamente 0,5-1 ml de aproximadamente 3-5 M de GnHCl. Después de una mezcla exhaustiva con una barra de acero inoxidable, la solución puede transferirse a un vaso de laboratorio de 1 L con la cantidad registrada. La solución puede introducirse en una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 20-30 ml/min con aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos en el serpentín de enfriamiento y posteriormente mantenerse a aproximadamente 20000-25000 rpm durante

aproximadamente 20-30 min. Los sobrenadantes pueden descartarse después de la centrifugación y se recolectan los cuerpos de inclusión lavados dos veces. Luego los cuerpos de inclusión mencionados anteriormente pueden mezclarse con aproximadamente 4-6 M de GdnHCl para solubilizar los cuerpos de inclusión. Por cada 1,5-2,5 g aproximadamente de sedimento celular húmedo, se pueden añadir aproximadamente 0,5-1 ml de GdnHCl. Tras una mezcla completa, la solución puede transferirse a una botella de plástico y luego puede añadirse una cantidad designada de aproximadamente 0,5 a 2 M de ditioneol (DTT) para alcanzar una concentración final de DTT de aproximadamente 4-6 mM. La mezcla de la muestra puede agitarse a una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm a temperatura ambiente durante aproximadamente 1,5 horas. Después de aproximadamente 1,5 horas de agitación, la solución de color marrón oscuro puede transferirse de nuevo a los tubos de centrífuga de 500 ml. Los sobrenadantes que contenían GCSF pueden agruparse y recolectarse en la botella de plástico etiquetada. Típicamente, la metionina inicial puede eliminarse enzimáticamente, produciendo la proteína GSCF final con la secuencia de aminoácidos denotada en la Figura 6 como SEQ ID NO: 2.

Como se indica en los ejemplos anteriores, las proteínas brutas de los lisados celulares tras la inducción con IPTG pueden analizarse en gel de SDS. Las concentraciones de proteína bruta pueden determinarse mediante el ensayo de proteína BCA. El replegamiento de proteínas puede realizarse mediante procesos conocidos en la técnica.

La concentración de proteína puede determinarse mediante el ensayo de proteína BCA. También puede observarse un aumento significativo del rendimiento de al menos aproximadamente 300% o más.

Ejemplo 9

mAb contra PD-1

El presente método de fermentación se puede aplicar para producir anticuerpos. Un ejemplo es para producir un anticuerpo monoclonal contra PD-1, también conocido como receptor de muerte celular programada 1 de la superficie celular humana.

En este caso, un primer ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal deseado puede amplificarse mediante PCR usando ADN genómico humano como patrón. Los cebadores de PCR pueden diseñarse en función de las secuencias flanqueantes de la región codificante del gen del anticuerpo monoclonal. El producto de PCR, por ende, puede clonarse en un vector pGEM-T y luego subclonarse en pET-24a, un vector de expresión de proteínas. La secuencia de aminoácidos para la proteína a clonar se denota en la Figura 7 como SEQ ID NO: 3.

Los vectores pET-24a, portadores de los genes del anticuerpo monoclonal, pueden luego transformarse en las cepas de *E. coli* BL21, *E. coli* BLR-CodonPlus (DE3), o *E. coli* BLR21 (DE3)-RIL. Pueden seleccionarse los clones de *E. coli* que expresan altos niveles de estas dos proteínas.

Las células de *E. coli* pueden transferirse a 250 ml del medio SYN en un matraz estéril de 1L. El medio puede premezclarse con aproximadamente 30-60 µg/ml de kanamicina y aproximadamente 50 µg/ml de cloranfenicol. Luego, las células pueden cultivarse a aproximadamente 36-37°C en una incubadora agitadora a aproximadamente 200 rpm durante aproximadamente 10 a 20 horas de cultivo, en particular, aproximadamente 16 ± 1 h de cultivo durante la noche.

Después del crecimiento celular, aproximadamente 200 a 230 ml, tal como aproximadamente 205, 210 o 220 ml del cultivo inicial pueden transferirse por separado a botellas de siembra estériles de 250 ml y luego pueden bombearse a fermentadores. Inicialmente, cada fermentador contiene aproximadamente 1-3L de medio básico suplementado con aproximadamente 1-3 g/L de isoleucina, tal como aproximadamente 1,4, 2, o 2,6 g/L de isoleucina, aproximadamente 10 g/L de glucosa básica, aproximadamente 25 µg/ml de kanamicina, y aproximadamente 25µg/ml de cloranfenicol y se polarizó a aproximadamente 36-38, tal como 36,5 o 37°C durante la noche. Posteriormente, el cultivo puede introducirse en un fermentador e inocularse durante aproximadamente 3 minutos, lo cual se considera como el punto de tiempo cero para medir el crecimiento celular. Durante la fermentación, pueden tomarse individualmente aproximadamente 20 ml del caldo de cultivo a intervalos de aproximadamente 2 h para medir la densidad óptica a 600 nm mediante un espectrómetro de absorción. El pH de la fermentación por lotes alimentados puede controlarse a

aproximadamente pH 7, tal como aproximadamente pH 7,1, 7,2 o 7,5 mediante la adición automatizada de NH_4OH . El nivel de oxígeno disuelto (OD) puede mantenerse en menos de aproximadamente 25-40% (sin incluir 35%) de saturación de aire a medida que la velocidad de agitación puede aumentarse gradualmente de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 rpm y suministrando oxígeno puro cuando la velocidad de agitación alcanza su límite superior, y se requiere más oxígeno. Puede añadirse solución de glucosa usando una bomba controlada por programa que puede ajustarse para alimentar cuando el nivel de OD supere aproximadamente 30-40% y la velocidad de agitación supere aproximadamente 300-450 rpm; y/o cuando la velocidad de agitación supere aproximadamente 600 rpm y el pH supere aproximadamente 7,2. Pueden añadirse aproximadamente 50 ml/L de una emulsión de antiespumante Y-30 para evitar el exceso de espuma durante la fermentación por lote alimentado. Pueden bombearse aproximadamente 50-60 ml de solución de alimentación de extracto de levadura al fermentador tras la inoculación inicial (semilla) a aproximadamente 5, 6, 7 u 8 horas (o S_5 , S_6 , S_7 o S_8) post-siembra dependiendo de la DO_{600} o de las condiciones generales de fermentación. La expresión de proteína puede lograrse mediante la adición de aproximadamente 3 a 5 ml de aproximadamente 0,70 a 0,85, 1 o 1,5 M de IPTG (también conocida como inducción inicial, o I_0) en el fermentador junto con aproximadamente 120 ml de solución de alimentación de extracto de levadura cuando la DO_{600} del cultivo por lote alimentado alcanza un valor de aproximadamente 70-80, por ejemplo, aproximadamente 71, 73, 75, 77, 79 u 80. La cantidad exacta depende de la DO_{600} y de las condiciones generales de fermentación. Tras la inducción, puede medirse y registrarse cada hora la densidad óptica del cultivo por lotes alimentados.

Después de aproximadamente 4-8 horas de inducción mediante IPTG, (I_4 a I_8), puede recolectarse el cultivo por lotes alimentados. El caldo de cultivo celular puede recolectarse en una botella de centrifugación de aproximadamente 500 ml y centrifugarse a aproximadamente 7000-9000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos a 4°C. Posteriormente, puede descartarse el sobrenadante y puede registrarse el peso del sedimento celular, concretamente el peso celular húmedo (WCW). El nivel de expresión de proteína puede

determinarse mediante SDS-PAGE reductora usando geles de placas NuPAGE al 4-12%. Luego, puede transferirse el sedimento celular a una caja de almacenamiento y almacenarse.

Los sedimentos celulares pueden obtenerse de la etapa de cosecha celular y resuspenderse en aproximadamente 15-20 mM de amortiguador TEN ($\text{pH}=7,0 \pm 0,5$) con una agitación de aproximadamente 7000 y aproximadamente 12000 rpm usando una barra de acero inoxidable en una relación de aproximadamente 1 g de sedimento celular húmedo a aproximadamente 1, 3 o 5 ml de amortiguador TEN. Después de la resuspensión completa, la mezcla de sedimento celular/amortiguador TEN puede homogeneizarse dos veces a aproximadamente 800-1200 bar, particularmente a 950, 1000, 1050 o 1100 bar con un homogeneizador. La mezcla celular puede centrifugarse posteriormente mediante CEPA LE GP de flujo continuo a aproximadamente 20000-30000 rpm, con una alimentación de materiales que debían centrifugarse nuevamente a una velocidad de aproximadamente 30-50 ml/min en el serpentín de enfriamiento, y posteriormente puede mantenerse a aproximadamente 20000-30000 rpm durante aproximadamente 10-30 min. El sedimento puede recolectarse tras la centrifugación.

Los sedimentos celulares pueden lavarse con amortiguador TEN 20 mM ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$) en la relación de 1 g de sedimento celular húmedo a 1 y 3 ml de amortiguador TEN. Tras el lavado completo, los sedimentos celulares pueden introducirse en la centrífuga a una velocidad de alimentación de 40 ml/min, con una velocidad de centrifugación de aproximadamente 25000 rpm durante aproximadamente 30-42 minutos en el serpentín de enfriamiento y pueden mantenerse posteriormente a aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 15 min. Los sobrenadantes pueden descartarse tras la centrifugación de flujo continuo.

Luego, los sedimentos celulares pueden mezclarse con GnHCl 4 M ($\text{pH}= 7,0 \pm 0,5$) durante 30 minutos para eliminar las proteínas no deseadas. Por cada aproximadamente 2,5 g de sedimento celular húmedo, pueden añadirse aproximadamente 0,5-1 ml de aproximadamente 3-5 M de GnHCl . Después de una mezcla exhaustiva con una barra de acero inoxidable, la solución puede transferirse a un vaso de laboratorio de 1 L con la cantidad registrada. La

solución puede introducirse en una centrífuga a una velocidad de alimentación de aproximadamente 20-30 ml/min con aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 10-20 minutos en el serpentín de enfriamiento y posteriormente mantenerse a aproximadamente 20000-25000 rpm durante aproximadamente 20-30 min. Los sobrenadantes pueden descartarse después de la centrifugación y se recolectan los cuerpos de inclusión lavados dos veces.

Luego los cuerpos de inclusión mencionados anteriormente pueden mezclarse con aproximadamente 4-6 M de GdnHCl para solubilizar los cuerpos de inclusión. Por cada 1,5-2,5 g aproximadamente de sedimento celular húmedo, se pueden añadir aproximadamente 0,5-1 ml de GdnHCl. Tras una mezcla completa, la solución puede transferirse a una botella de plástico y luego puede añadirse una cantidad designada de aproximadamente 0,5 a 2 M de ditioneitol (DTT) para alcanzar una concentración final de DTT de aproximadamente 4-6 mM. La mezcla de la muestra puede agitarse a una velocidad de agitación de aproximadamente 200 rpm a temperatura ambiente durante aproximadamente 1,5 horas. Después de aproximadamente 1,5 horas de agitación, la solución de color marrón oscuro puede transferirse de nuevo a los tubos de centrífuga de 500 ml. Los sobrenadantes que contenían anticuerpo anti-PD1 pueden agruparse y recolectarse en la botella de plástico etiquetada.

Como se indica en los ejemplos anteriores, las proteínas brutas de los lisados celulares tras la inducción con IPTG pueden analizarse en gel de SDS. Las concentraciones de proteína bruta pueden determinarse mediante el ensayo de proteína BCA. El replegamiento de proteínas puede realizarse mediante procesos conocidos en la técnica.

La concentración de proteína puede determinarse mediante el ensayo de proteína BCA. También puede observarse un aumento significativo del rendimiento de al menos aproximadamente 200-600% o más.

Se contempla que cualquier realización descrita en esta memoria descriptiva puede ser implementada con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de la descripción, y viceversa. Además, las composiciones de la descripción pueden utilizarse para lograr los métodos de la descripción.

Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en la presente invención se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la descripción. Las características principales de esta descripción pueden emplearse en diversas realizaciones sin apartarse del alcance de la descripción. Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes de los procedimientos específicos descritos en la presente invención. Tales equivalentes se consideran dentro del alcance de la presente descripción y están cubiertos por las reivindicaciones.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan a la presente invención por referencia en la misma medida que si se hubiera indicado específica e individualmente la incorporación por referencia de cada publicación o solicitud de patente individual.

El uso de los artículos "un" o "una" en combinación con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno/a", pero también es consistente con el significado de "uno/a o más", "al menos uno/a" y "uno/a o más de uno/a". El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza con el significado de "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, si bien la descripción respalda una definición que se refiere tanto a alternativas únicamente como a "y/o".

Tal como se utilizan en esta memoria descriptiva y en la(s) reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tiene" y "tienen"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos adicionales no enumerados o etapas del método.

La expresión "o combinaciones de los mismos" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden a la expresión. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones

de los mismos" pretende incluir al menos uno de los siguientes: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, y si el orden es importante en un contexto en un contexto en particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la técnica comprenderá que, por lo general, no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto indique lo contrario.

Todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en la presente invención pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Si bien las composiciones y los métodos de esta invención han sido descritos en términos de ciertas realizaciones, resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o los métodos, así como en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente invención, sin apartarse del concepto, el espíritu y el alcance de la misma. Se considera que todos los sustitutos y modificaciones similares que resulten evidentes para los expertos en la técnica se encuentran dentro del espíritu, alcance y concepto de la descripción, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Lo que se reivindica es:

1. Un método para aumentar la producción de proteína recombinante en una célula huésped procariota, que comprende:

realizar una fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados que incluye las etapas de:

realizar la siembra (tiempo S_0) de un cultivo de célula huésped procariota modificada genéticamente para expresar induciblemente una proteína recombinante y transferir el cultivo a uno o más fermentadores que contengan cada uno un medio de cultivo;

medir un nivel de oxígeno disuelto (OD), una velocidad de agitación y un pH en uno o más fermentadores;

suministrar una solución de alimentación de fuente de carbono a cualquiera de uno o más fermentadores, individualmente, siempre que se cumplan las condiciones (i) y/o (ii):

- (i) dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% a 45% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 1000 rpm.
- (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 400 a 700 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,4; y

suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de los uno o más fermentadores en los que se haya iniciado la inducción de expresión de la proteína recombinante, individualmente, aproximadamente en I_0 (tiempo en el inicio de la inducción) o I_1 o ambos;

opcionalmente, suministrar una fuente de nitrógeno a cualquiera de uno o más fermentadores, individualmente, en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} .

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (i) dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% a 40% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 700 rpm, opcionalmente aproximadamente 300 a 500 rpm.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (i) dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% a 40% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm, opcionalmente, aproximadamente 300 a 400 rpm, 350 a 450 rpm o 350 a 500 rpm.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (i) dicho nivel de OD supera aproximadamente 35% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 500 rpm, aproximadamente 350 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 450 rpm, aproximadamente 450 a 500 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 450 rpm, o aproximadamente 500 rpm.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (i) dicho nivel de OD supera aproximadamente 37% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 500 rpm, aproximadamente 350 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 450 rpm, aproximadamente 450 a 500 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 450 rpm, o aproximadamente 500 rpm.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (i) dicho nivel de OD supera aproximadamente 40% y dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 500 rpm; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 300 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 500 rpm, aproximadamente 350 a 400 rpm, aproximadamente 400 a 450 rpm, aproximadamente 450 a 500 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 450 rpm, o aproximadamente 500 rpm.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera

aproximadamente 7,0 a 7,4; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,2; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,2; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,4; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,4; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0 a 7,2; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,0; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,2; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde (ii) dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 a 600 rpm y dicho pH supera aproximadamente 7,4; opcionalmente, dicha velocidad de agitación supera aproximadamente 500 rpm, 550 rpm, o 600 rpm.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se suministra una solución de alimentación de fuente de carbono siempre que se cumpla la condición (i) o (ii).
18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se suministra una solución de alimentación de fuente de carbono siempre que se cumplan ambas condiciones (i) y (ii).
19. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra, individualmente, en aproximadamente I_0 y uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; opcionalmente, en aproximadamente I_0 y uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , y S_8 .
20. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra, individualmente, en aproximadamente I_0 y en uno a tres puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; opcionalmente, en aproximadamente I_0 y en uno o dos puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 ; opcionalmente, en

aproximadamente I_0 y en un punto de tiempo seleccionado entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 .

21. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra, individualmente, en aproximadamente I_1 y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; opcionalmente, en aproximadamente I_1 y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 .

22. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra, individualmente, en aproximadamente I_1 y en uno a tres puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; opcionalmente, en aproximadamente I_1 y en uno o dos puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 ; opcionalmente, en aproximadamente I_1 y en un punto de tiempo seleccionado entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 .

23. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra, individualmente, en aproximadamente I_0 y aproximadamente I_1 , y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; opcionalmente, en aproximadamente I_0 y aproximadamente I_1 , y en uno o más puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 .

24. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fuente de nitrógeno se suministra, individualmente, en aproximadamente I_0 y aproximadamente I_1 , y en uno a tres puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 , S_8 , S_9 y S_{10} ; opcionalmente, en aproximadamente I_0 y aproximadamente I_1 , y en uno o dos puntos de tiempo seleccionados entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 ; opcionalmente, en aproximadamente I_0 y aproximadamente I_1 , y en un punto de tiempo seleccionado entre aproximadamente S_5 , S_6 , S_7 y S_8 .

25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 19-24, en donde se suministra una solución de alimentación de fuente de carbono al menos una vez a al menos un fermentador durante la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados; opcionalmente, en donde se suministra una solución de alimentación de fuente de carbono dos o más veces separadas a al menos un fermentador durante la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados; opcionalmente, la solución de alimentación de fuente de carbono es una solución de alimentación de glucosa, solución de alimentación de fructosa, solución de alimentación de galactosa, solución de alimentación de piruvato, o cualquier combinación de las mismas.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde la solución de alimentación de fuente de carbono es una solución de alimentación de glucosa.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde se suministra un total acumulado de aproximadamente 800 a 1500 g de glucosa a al menos un fermentador, por cada 5 L aproximadamente de capacidad del fermentador, al finalizar la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde se suministra un total acumulado de aproximadamente 6000 a 9000 g de glucosa a al menos un fermentador al finalizar la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados, el al menos un fermentador tiene una capacidad aproximada de 40 L.

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28, en donde la solución de alimentación de glucosa suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, incluye D-(+)-glucosa; opcionalmente, en donde la solución de alimentación de glucosa suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, contiene aproximadamente 600 a 900 g/L de D-(+)-glucosa anhidra.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la solución de alimentación de glucosa suministrada al uno o más fermentadores,

individualmente, contiene además H_3BO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, EDTA, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12N (37%) HCl, y/o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; opcionalmente, aproximadamente 20 a 600 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

31. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-30, en donde la fuente de nitrógeno suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, comprende potasio, opcionalmente en forma de K_2HPO_4 y/o KH_2PO_4 ; o en donde se suministra potasio, opcionalmente en forma de K_2HPO_4 y/o KH_2PO_4 al uno o más fermentadores, individualmente, aproximadamente al mismo tiempo que se suministra la fuente de nitrógeno.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la fuente de nitrógeno contiene aproximadamente 1,0 a 3,0 M de potasio, o en donde se suministra potasio para alcanzar una concentración final de potasio de aproximadamente 35 a 40 mM en el uno o más fermentadores, individualmente.

33. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28 o 30-32, en donde la fuente de nitrógeno suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, comprende un extracto de levadura, peptona, soytone (peptona de soja), urea, triptona o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente, la fuente de nitrógeno es una solución de extracto de levadura.

34. El método de acuerdo con la reivindicación 33, en donde la solución de extracto de levadura suministrada al uno o más fermentadores, individualmente, tiene una concentración de aproximadamente 100 a 600 g/L, 200 a 300 g/L, 300 a 400 g/L, 400 a 500 g/L, 500 a 600 g/L, 150 a 200 g/L, 200 a 250 g/L, 250 a 300 g/L, 300 a 350 g/L, 350 a 400 g/L, 400 a 450 g/L, 450 a 500 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 250 g/L, 300 g/L, 350 g/L, 400 g/L, 428 g/L, 450 g/L, 500 g/L, o 600 g/L.

35. El método de la reivindicación 34, en donde se suministran aproximadamente 40 a 150 mL de una solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores cada vez, individualmente; opcionalmente, se suministran

aproximadamente 300 a 1500 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores cada vez, individualmente.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde se suministran de aproximadamente 45 a 60 ml de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si se suministran en cualquier punto de tiempo seleccionado entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, S₈, S₉ y S₁₀; en donde se suministran de aproximadamente 90 a 120 ml de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si se suministran en aproximadamente I₀ o I₁.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde se suministran de aproximadamente 350 a 500 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si se suministran en cualquier punto de tiempo seleccionado entre aproximadamente S₅, S₆, S₇, S₈, S₉ y S₁₀; en donde se suministran de aproximadamente 700 a 1200 mL de la solución de extracto de levadura al uno o más fermentadores, individualmente, si se suministran en aproximadamente I₀ o I₁.

38. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28, 30-32 o 34-37, en donde el uno o más fermentadores tienen, individualmente, una capacidad de aproximadamente 5 L a 200 L o mayor; opcionalmente, el uno o más fermentadores tienen cada uno una capacidad de aproximadamente 5 L; opcionalmente, el uno o más fermentadores tienen cada uno una capacidad de aproximadamente 40 L; opcionalmente, el uno o más fermentadores tienen, individualmente, de 1 a 200 L del medio.

39. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28, 30-32 o 34-37, en donde el método comprende el uso de un mecanismo de control programado que incluye uno o más sensores que miden el nivel de OD, el pH, la medición rédox, y/o la cantidad de carbono en el uno o más fermentadores, y en donde dicho mecanismo controlado por programa inyecta automáticamente la solución de alimentación de fuente de carbono en el uno o más fermentadores.

40. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28, 30-32, o 34-35, en donde la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados se realiza con una relación de inóculo de aproximadamente 6,0 a 8,5%; opcionalmente, aproximadamente 6,5 a 7%, 7,0 a 7,5%, 7,5 a 8%, o 8,0 a 8,5%; opcionalmente, aproximadamente 6,25%, 6,3%, 6,4%, 6,5%, 6,67%, 6,7%, 6,8%, 6,95%, 7,0%, 7,24%, 7,3%, 7,33%, 7,48%, 7,5%, 7,6%, 7,76%, 7,8%, 7,9%, 8%, 8,14%, o 8,4%.

41. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28, 30-32, o 34-37, en donde la inducción de la expresión de la proteína recombinante se inicia cuando la DO₆₀₀ del cultivo en un fermentador alcanza aproximadamente 40 a 80; opcionalmente, aproximadamente 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 55 a 60, 60 a 65, 65 a 70, 70 a 75, 75 a 80, 40, 45, 49, 52, 55, 60, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 75, 78, o 80.

42. El método de la reivindicación 41, en donde la expresión de la proteína recombinante se induce mediante la adición de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), opcionalmente, aproximadamente 3 a 5 mL de aproximadamente 0,70 a 0,85 mM de IPTG.

43. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28, 30-32, 34-37, o 42, en donde dicha proteína recombinante comprende VX-001, AVE-9633, AC-9301, vacuna NY-ESO-1, eritropoyetina, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, IFN- α 2b, Pro-IFN- α 2b, anticuerpo anti-PD1, y/o GCSF.

44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, 19-24, 26-28, 30-32, 34-37, o 42, en donde dicha célula huésped procariota comprende una célula de *E. coli*, opcionalmente, BLR-Codon Plus (DE3)-RIL de *E. coli*, BLR-Codon Plus (DE3) de *E. coli* o BL21-CodonPlus (DE3)-RIL de *E. coli*.

45. El método de acuerdo con la reivindicación 44, que comprende además una etapa de recolección del cultivo de la célula huésped de *E. coli* o de una muestra del cultivo en el uno o más fermentadores tras la inducción de la expresión de la proteína recombinante, individualmente.

46. El método de acuerdo con la reivindicación 45, que comprende además el procesamiento de cuerpos de inclusión en el cultivo recolectado de la célula o muestra de *E. coli* para obtener un extracto de proteína bruta.

47. El método de acuerdo con la reivindicación 46, en donde la etapa de procesamiento de los cuerpos de inclusión incluye:

resuspender las células de *E. coli* en el cultivo o muestra recolectada en un amortiguador;

homogeneizar las células de *E. coli* una o más veces a entre aproximadamente 800 y 1200 bar, obteniendo así una mezcla celular;

centrifugar la mezcla celular para formar un sedimento celular utilizando un método de flujo de centrifugación con una velocidad de alimentación de entre aproximadamente 30-60 ml/min, y con una velocidad de centrifugación de entre aproximadamente 20.000 y 30.000 rpm; opcionalmente, dicha centrifugación utiliza una centrífuga continua;

recolectar el sedimento celular; y

procesar el sedimento celular para obtener un extracto de proteína bruta.

48. El método de la reivindicación 46, en donde el cultivo o la muestra se recolectan después o en aproximadamente I_4 a I_8 .

49. El método de la reivindicación 46, en donde el tiempo total para la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados incluye aproximadamente 10 a 95 horas o más, opcionalmente aproximadamente 14 ± 1 , 16 ± 1 , 24 ± 1 , 30 ± 1 , 36 ± 1 , 48 ± 1 , 60 ± 1 , 72 ± 1 , 84 ± 1 , o 96 ± 1 horas.

50. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46-49, que comprende además determinar el rendimiento de la proteína recombinante expresada en el extracto de proteína bruta, en donde el rendimiento se aumenta

en al menos aproximadamente 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos aproximadamente 62,7%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, al menos 150%, al menos 160%, al menos 170%, al menos 167%, al menos 180%, al menos 190%, al menos 200%, al menos 210%, al menos 220%, al menos 230%, al menos 240%, al menos 250%, al menos 260%, al menos 270%, al menos 280%, al menos 290%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 383%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650%, al menos 700%, al menos 748%, al menos 750%, al menos 800%, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o más, en comparación con otro método de fermentación.

51. El método de acuerdo con la reivindicación 50, en donde el rendimiento se determina para un fermentador que tiene aproximadamente una capacidad de 40 L y el rendimiento se aumenta en al menos aproximadamente 100% a 200%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 190% o 200%, en comparación con el rendimiento de un fermentador que tiene una capacidad de aproximadamente 5 L en el otro método de fermentación; opcionalmente, la proteína recombinante es eritropoyetina, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, Factor XIII, IFN- α 2b, Pro-IFN- α 2b, anticuerpo anti-PD1 y/o GCSF.

52. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46-49, que comprende además determinar el rendimiento de la proteína recombinante expresada en el extracto de proteína bruta, en donde el rendimiento es de aproximadamente 5 a 10 g de la proteína recombinante en un fermentador que tiene una capacidad de aproximadamente 5 L; opcionalmente, en donde el rendimiento es de aproximadamente 20 a 30 g de la proteína recombinante en un fermentador que tiene una capacidad de aproximadamente 40 L; opcionalmente, la proteína recombinante es eritropoyetina, EPO-Fc, CNTO-528,

AMG-114, JR-013, Factor XIII, IFN- α 2b, Pro-IFN- α 2b, anticuerpo anti-PD1 y/o GCSF.

53. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además las siguientes etapas realizadas antes de la fermentación de proteína recombinante por lotes alimentados:

obtener un ácido nucleico con optimización de codones que codifica la proteína recombinante;

transfectar dicho ácido nucleico con optimización de codones en la célula huésped procariota; y

polarizar dicha célula huésped procariota y cultivar dicha célula huésped procariota a aproximadamente 36-37°C durante la noche o aproximadamente 12-18 horas.

54. El método de acuerdo con la reivindicación 53, en donde dicha célula huésped procariota es BLR21(DE3).

55. El método de acuerdo con la reivindicación 54, en donde dicha BLR21(DE3) contiene más de un vector.

56. Un mecanismo o equipo controlado por programa que comprende:

a. un aparato equipado con uno o más sensores capaces de medir el nivel de oxígeno, el pH y/o la agitación del medio de cultivo en un reactor de fermentación en un proceso de fermentación en modo periódico o continuo; y

b. un sistema de inyección de solución de alimentación integrado dentro de dicho mecanismo controlado por programa que está programado para proporcionar una o más soluciones de alimentación a un reactor de fermentación en función de los niveles de oxígeno medidos, el pH y/o la agitación en el medio de cultivo en un intervalo periódico o continuo.

57. El mecanismo o equipo controlado por programa de acuerdo con la reivindicación 56, en donde uno o más sensores transmiten mediciones en tiempo real al mecanismo controlado por programa.

58. El mecanismo o equipo controlado por programa de acuerdo con la reivindicación 56, que comprende además una unidad de control configurada para recibir mediciones del sensor y ajustar automáticamente la velocidad de inyección y el volumen de la solución de alimentación en función de los parámetros medidos.

59. El mecanismo o equipo controlado por programa de acuerdo con la reivindicación 56, en donde el sistema de inyección de la solución de alimentación comprende un reservorio, una bomba dosificadora y un sistema de distribución para suministrar la solución de alimentación al proceso de fermentación.

60. El mecanismo o equipo controlado por programa de acuerdo con la reivindicación 56, en donde el sistema de inyección de solución de alimentación está programado para incluir puntos de ajuste predeterminados y algoritmos de control para modificar los niveles de glucosa, el oxígeno disuelto y/o el pH dentro del proceso de fermentación en el medio de cultivo.

61. Un método para regular automáticamente la concentración de glucosa, el nivel de oxígeno, el pH y/o la agitación durante la fermentación, que comprende:

- a. parámetros de medición del nivel de oxígeno, del pH y/o de la agitación de la fermentación con uno o más sensores;
- b. transmitir los parámetros medidos a un mecanismo controlado por programa; y
- c. ajuste automáticamente la velocidad de inyección, el volumen de una solución de alimentación y la agitación en función de los parámetros medidos.

62. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde los parámetros medidos se monitorean continuamente y se utilizan para controlar dinámicamente el nivel de oxígeno, el pH y/o la agitación de la fermentación.

63. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde cualquiera de las etapas (a), (b) y/o (c) se lleva a cabo en un intervalo periódico o de manera continua.

64. El método de la reivindicación 1, en donde dicha medición de un nivel de oxígeno disuelto (OD), una velocidad de agitación y un pH en uno o más fermentadores; y/o el suministro de una solución de alimentación de fuente de carbono a cualquiera de los uno o más fermentadores utilizando un mecanismo controlado por programa se mide y/o se suministra en un intervalo de tiempo periódico, o se mide y/o se suministra continuamente.

65. El método de acuerdo con la reivindicación 63 o 64, en donde dicho intervalo periódico comprende aproximadamente cada 1, 1,5, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22,5 y/o 23 horas; opcionalmente cada 30 minutos hasta 80 o más de 80 horas.

RESUMEN

La presente descripción incluye un método mejorado para producir una proteína. Las etapas y condiciones se describieron y llevaron a cabo con un rendimiento de proteína significativamente mejorado, reduciendo así el costo de fabricación.