



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 390**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08005732 .6**
96 Fecha de presentación : **26.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1992697**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2008**

54 Título: **Producción de TNFR-Fc.**

30 Prioridad: **27.08.2004 US 605379**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2010

73 Titular/es: **Wyeth Research Ireland Limited**
Little Connell
Newbridge Kildare, IE

72 Inventor/es: **Drapeau, Denis;**
Luan, Yen-Tung;
Mercer, James R.;
Wang, Wenge y
Lasko, Daniel R.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 341 390 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de TNFR-Fc.

5 Antecedentes de la invención

Las proteínas y polipéptidos se han hecho cada vez más importantes como agentes terapéuticos. En la mayoría de los casos, las proteínas y polipéptidos terapéuticos se producen en cultivo celular, a partir de células que se han manipulado mediante ingeniería y/o se han seleccionado para producir niveles inusualmente elevados de la proteína o polipéptido particular de interés. El control y la optimización de las condiciones del cultivo celular son críticamente importantes para la producción comercial con éxito de proteínas y polipéptidos.

Muchas proteínas y polipéptidos producidos en cultivo celular se obtienen en un proceso discontinuo o discontinuo alimentado, en el que las células se cultivan durante un período de tiempo, y después el cultivo se termina y la proteína o polipéptido producido se aísla. La cantidad y calidad últimas de la proteína o polipéptido producido pueden verse afectadas considerablemente por las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, los procesos tradicionales de cultivo discontinuo y discontinuo alimentado a menudo dan como resultado la producción de productos de desecho metabólicos que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad, y la producción o estabilidad de la proteína o polipéptido de interés. Aunque se han realizado esfuerzos para mejorar la producción de proteínas y polipéptidos en procesos de cultivo discontinuo y discontinuo alimentado, todavía existe la necesidad de mejoras adicionales.

Adicionalmente, se ha realizado un esfuerzo significativo en el desarrollo de medios definidos (es decir, medios obtenidos a partir de componentes individuales conocidos y que carecen de suero u otros subproductos animales) para uso en el cultivo de células, particularmente células de mamíferos. Las características de crecimiento celular pueden ser muy diferentes en medios definidos, en contraste con los medios derivados de suero. Existe una necesidad particular de desarrollar sistemas mejorados para producir proteínas y polipéptidos mediante cultivo celular en medios definidos.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un sistema mejorado para la producción a gran escala de proteínas y/o polipéptidos en cultivo celular. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos de cultivo a escala comercial (por ejemplo, 500 l o más) que utilizan un medio caracterizado por uno o más de: i) una cantidad acumulativa de aminoácidos por volumen unitario mayor que alrededor de 70 mM; ii) una relación molar de glutamina acumulativa a asparagina acumulativa menor que alrededor de 2; iii) una relación molar de glutamina acumulativa a aminoácidos totales acumulativos menor que alrededor de 0,2; iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulativos a aminoácidos totales acumulativos entre alrededor de 0,4 y 1; o v) una cantidad acumulativa combinada de concentración de glutamina y asparagina por volumen unitario mayor que alrededor de 16 mM. El experto ordinario en la materia entenderá que "acumulativa", como se usa anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente o componentes particulares añadidos a lo largo del cultivo celular, incluyendo componentes añadidos al comienzo del cultivo y componentes añadidos posteriormente. En ciertas formas de realización preferidas de la invención, es deseable minimizar las "alimentaciones" del cultivo a lo largo del tiempo, de forma que es deseable maximizar las cantidades presentes inicialmente. Por supuesto, los componentes del medio se metabolizan durante el cultivo, de forma que los cultivos con las mismas cantidades acumulativas de componentes dados tendrán diferentes niveles absolutos si esos componentes se añaden a diferentes tiempos (por ejemplo, todos presentes inicialmente frente a algunos añadidos mediante alimentaciones).

Según la presente invención, el uso de tal medio permite niveles elevados de producción de proteínas, y reduce la acumulación de ciertos factores indeseables, tales como amonio y/o lactato.

Un experto ordinario en la materia entenderá que las formulaciones de medios de la presente invención engloban tanto medios definidos como no definidos. En ciertas formas de realización preferidas de la presente invención, el medio de cultivo es un medio definido en el que la composición del medio es conocida y controlada.

En ciertas formas de realización preferidas de la presente invención, los métodos de cultivo incluyen cambiar el cultivo desde un primer conjunto de condiciones de cultivo a un segundo conjunto de condiciones de cultivo, de forma que se logra un cambio metabólico de las células. En algunas formas de realización, este cambio se lleva a cabo cuando el cultivo ha alcanzado alrededor de 20-80% de su densidad celular máxima. En algunas formas de realización, el cambio implica cambiar la temperatura (o intervalo de temperaturas) a la que se mantiene el cultivo. Como alternativa o adicionalmente, la presente invención proporciona métodos ajustados de forma que, tras alcanzar un pico, los niveles de lactato y/o de amonio en el cultivo disminuyen con el tiempo. En otras formas de realización, el cambio implica cambiar el pH, la osmolaridad o el nivel de inductores químicos, tales como ácidos alcanoicos o sus sales.

Los cultivos celulares de la presente invención se pueden suplementar opcionalmente con nutrientes y/u otros componentes del medio, incluyendo hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra

fuerza de energía. En ciertas formas de realización de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos tales como hexametilénbis(acetamida) ("HMBA") y butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al comienzo del cultivo, o se pueden añadir más tarde a fin de reponer los nutrientes agotados, o por otra razón. En general, es deseable seleccionar la composición inicial del medio para minimizar la suplementación según la presente invención. Según la presente invención, se pueden monitorizar diversas condiciones de cultivo, incluyendo pH, densidad celular, viabilidad celular, niveles de lactato, niveles de amonio, osmolaridad, o título del polipéptido o proteína expresado.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una comparación del Medio 1 y Medio 2 en matraces de agitación usando células anti-GDF-8.

La Figura 2 muestra el crecimiento celular y la viabilidad de células anti-GDF-8 en Medio 1.

La Figura 3 muestra el crecimiento celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

La Figura 4 muestra la viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

La Figura 5 muestra los niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

La Figura 6 muestra los niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

La Figura 7 muestra el título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

La Figura 8 muestra la densidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y de alimentación desprovista de glutamina.

La Figura 9 muestra la viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y de alimentación desprovista de glutamina.

La Figura 10 muestra los niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y desprovisto de glutamina.

La Figura 11 muestra los niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y desprovisto de glutamina.

La Figura 12 muestra el título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y desprovisto de glutamina.

La Figura 13 muestra la respuesta a la dosis de hierro de células anti-GDF-8 en Medio 1 y Medio 2.

La Figura 14 muestra la densidad celular de cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

La Figura 15 muestra la viabilidad celular de cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

La Figura 16 muestra el título de anti-Lewis Y en cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

La Figura 17 muestra los niveles de lactato en cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

La Figura 18 muestra los niveles de amonio en cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

La Figura 19 muestra la osmolaridad de cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

La Figura 20 muestra la densidad celular de células anti-Lewis Y. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hacen crecer usando las mismas condiciones.

La Figura 21 muestra la viabilidad celular de células anti-Lewis Y. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hacen crecer usando las mismas condiciones.

La Figura 22 muestra el título medio del cultivo de anti-Lewis Y. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hacen crecer usando las mismas condiciones.

La Figura 23 muestra los niveles de amonio de células anti-Lewis Y. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hacen crecer usando las mismas condiciones.

ES 2 341 390 T3

La Figura 24 muestra una bomba agitadora en cultivos discontinuos alimentados.

La Figura 25 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

5 La Figura 26 muestra la viabilidad de células anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

La Figura 27 muestra el título de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

La Figura 28 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

10 La Figura 29 muestra los niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

La Figura 30 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

15 La Figura 31 muestra el título de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

La Figura 32 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

20 La Figura 33 muestra los niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

La Figura 34 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

25 La Figura 35 muestra la viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

La Figura 36 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

30 La Figura 37 muestra niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

35 La Figura 38 muestra niveles de glutamina de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

La Figura 39 muestra el título de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

40 La Figura 40 muestra la osmolaridad de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

La Figura 41 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

45 La Figura 42 muestra los niveles de lactato de cultivos anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

La Figura 43 muestra niveles de amonio de cultivos anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

50 La Figura 44 muestra niveles de glutamina de cultivos anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

55 La Figura 45 muestra los niveles de glutamato de cultivos anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

La Figura 46 muestra el título de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

60 La Figura 47 muestra la osmolaridad de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

La Figura 48 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

65 La Figura 49 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

ES 2 341 390 T3

La Figura 50 muestra los niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

La Figura 51 muestra niveles de glutamina de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

La Figura 52 muestra el título de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

La Figura 53 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

La Figura 54 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

La Figura 55 muestra los niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

La Figura 56 muestra el título de de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

La Figura 57 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en los Medios 1, 3 y 9.

La Figura 58 muestra el título de anti-GDF-8 en el Medio 1, 3 y 9.

La Figura 59 muestra los títulos extrapolados de anti-GDF-8 para diversos niveles de glutamina sola y de glutamina y asparagina combinadas total.

La Figura 60 muestra el crecimiento celular de células anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

La Figura 61 muestra la viabilidad celular de células anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

La Figura 62 muestra los niveles de lactato de cultivos de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

La Figura 63 muestra los niveles de amonio de cultivos de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

La Figura 64 muestra el título de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

La Figura 65 muestra la osmolaridad de cultivos de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

La Figura 66 muestra el crecimiento celular de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 67 muestra la viabilidad de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 68 muestra la glucosa residual en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 69 muestra los niveles de glutamina en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 70 muestra la concentración de lactato en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 71 muestra los niveles de amonio en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 72 muestra el título relativo de TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

La Figura 73 muestra densidades celulares de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

La Figura 74 muestra títulos de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

La Figura 75 muestra los niveles de lactato de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

La Figura 76 muestra los niveles de amonio de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

Definiciones

“Alrededor de”, “aproximadamente”: como se usan aquí, las expresiones “alrededor de” y “aproximadamente”, como se aplican a una o más condiciones particulares de cultivo celular, se refieren a un intervalo de valores que son similares al valor de referencia señalado para esa condición o condiciones de cultivo. En ciertas formas de realización, la expresión “alrededor de” se refiere a un intervalo de valores comprendidos entre 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 por ciento o menos del valor de referencia señalado para esa condición o condiciones de cultivo.

“Aminoácido”: el término “aminoácido”, como se usa aquí, se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos de origen natural que se usan normalmente en la formación de polipéptidos, o análogos o derivados de esos aminoácidos. Los aminoácidos de la presente invención se proporcionan en medio a cultivos celulares. Los aminoácidos proporcionados en el medio se pueden proporcionar como sales o en forma hidratada.

“Anticuerpo”: el término “anticuerpo”, como se usa aquí, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento FAb o F(ab')₂, que contiene uno o más sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a (inmunorreaccionan con) un antígeno. Las expresiones “anticuerpos monoclonales” y “composición de anticuerpo monoclonal”, como se usan aquí, se refieren a una población clonal de moléculas de anticuerpos que contienen sólo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de un antígeno, mientras que las expresiones “anticuerpos policlonales” y “composición de anticuerpo policlonal” se refieren a una población de moléculas de anticuerpos que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interaccionar con un antígeno particular. La definición de anticuerpos monoclonales incluye tanto moléculas clonales derivadas mediante tecnologías tradicionales como moléculas de secuencia definida derivadas mediante manipulación o mutación de restos específicos, por ejemplo anticuerpos humanizados.

“Cultivo discontinuo”: la expresión “cultivo discontinuo”, como se usa aquí, se refiere a un método para cultivar células, en el que todos los componentes que se usarán finalmente en el cultivo de las células, incluyendo el medio (véase la definición de “medio” más abajo) así como las propias células, se proporcionan al comienzo del proceso de cultivo. Un cultivo discontinuo se detiene típicamente en algún momento, y las células y/o componentes en el medio se cosechan y opcionalmente se purifican.

“Biorreactor”: el término “biorreactor”, como se usa aquí, se refiere a cualquier vasija usada para el crecimiento de un cultivo de células de mamíferos. El biorreactor puede tener cualquier tamaño en tanto que sea útil para el cultivo de células de mamíferos. Típicamente, el biorreactor será de por lo menos 1 litro, y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.0000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor, incluyendo pero sin limitarse al pH y la temperatura, se controlan típicamente durante el período de cultivo. El biorreactor puede estar hecho de cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células de mamíferos suspendidos en medios en las condiciones de cultivo de la presente invención, incluyendo vidrio, plástico o metal. La expresión “biorreactor de producción”, como se usa aquí, se refiere al biorreactor final usado en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen del biorreactor de producción del cultivo celular a gran escala es típicamente por lo menos 500 litros, y puede ser 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.0000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. El experto ordinario en la materia estará informado y será capaz de escoger biorreactores adecuados para uso en la práctica de la presente invención.

“Densidad celular”: la expresión “densidad celular”, como se usa aquí, se refiere a aquel número de células presentes en un volumen dado de medio.

“Viabilidad celular”: la expresión “viabilidad celular”, como se usa aquí, se refiere a la capacidad de las células en el cultivo para sobrevivir en un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. La expresión, como se usa aquí, también se refiere a esa porción de células que están vivas en un tiempo particular en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

“Cultivo”, “cultivo celular” y “cultivo de células de mamíferos”: estas expresiones, como se usan aquí, se refieren a una población de células de mamíferos que se suspende en un medio (véase definición de “medio” más abajo) en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como será claro para los expertos ordinarios en la materia, estas expresiones, como se usan aquí, se pueden referir a la combinación que comprende la población de células de mamífero y el medio en el que se suspende la población.

“Cultivo discontinuo alimentado”: la expresión “cultivo discontinuo alimentado”, como se usa aquí, se refiere a un método para cultivar células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en algún momento subsiguiente al comienzo del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados comprenden típicamente suplementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Un cultivo discontinuo alimentado se detiene típicamente en algún momento, y las células y/o componentes en el medio se cosechan y opcionalmente se purifican.

“Fragmento”: el término “fragmento”, como se usa aquí, se refiere a polipéptidos, y se define como cualquier porción discreta de un polipéptido dado que es única o que es característica de ese polipéptido. El término, como se

usa aquí, también se refiere a cualquier porción discreta de un polipéptido dado que retiene por lo menos una fracción de la actividad del polipéptido de longitud completa. Preferentemente, la fracción de actividad retenida es por lo menos 10% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferentemente, la fracción de actividad retenida es por lo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la actividad del péptido de longitud completa. Más preferentemente todavía, la fracción de actividad retenida es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Lo más preferible, la fracción de actividad retenida es 100% de la actividad del polipéptido de longitud completa. El término, como se usa aquí, también se refiere a cualquier porción de un polipéptido dado que incluye por lo menos un elemento de secuencia establecido encontrado en el polipéptido de longitud completa. Preferentemente, el elemento de secuencia se extiende por lo menos 4-5, más preferentemente por lo menos alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

“Gen”: el término “gen”, como se usa aquí, se refiere a cualquier secuencia nucleotídica, ADN o ARN, por lo menos alguna porción de la cual codifica un producto final discreto, típicamente pero sin limitarse a, un polipéptido, que funciona en algún aspecto del metabolismo o desarrollo celular. El término no quiere referirse sólo a la secuencia codificante que codifica el polipéptido u otro producto final discreto, sino también puede englobar regiones que preceden y siguen a la secuencia codificante que modulan el nivel basal de expresión (véase definición de “elemento de control genético” más abajo), así como secuencias interventoras (“intrones”) entre segmentos codificantes individuales (“exones”).

“Elemento de control genético”: la expresión “elemento de control genético”, como se usa aquí, se refiere a cualquier elemento de secuencia que modula la expresión de un gen al que está ligado operablemente. Los elementos de control genético pueden funcionar incrementando o disminuyendo los niveles de expresión, y pueden estar situados antes, dentro o después de la secuencia codificante. Los elementos de control genético pueden actuar en cualquier etapa de la expresión génica regulando, por ejemplo, la iniciación, el alargamiento o la terminación de la transcripción, el corte y empalme de ARNm, la edición de ARNm, la estabilidad de ARNm, la localización de ARNm en la célula, la iniciación, alargamiento o terminación de la traducción, o cualquier otra etapa de la expresión génica. Los elementos de control genético pueden funcionar individualmente o en combinación entre sí.

“Hibridoma”: el término “hibridoma”, como se usa aquí, se refiere a una célula creada por fusión de una célula inmortalizada, derivada de una fuente inmunológica, y una célula productora de anticuerpos. El hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales usadas para crear el hibridoma pueden ser de cualquier origen mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, rata, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra, y humana. El término también engloba estirpes celulares de triomas, que resultan cuando la progenie de fusiones de mielomas heterohíbridos, que son el producto de una fusión entre células humanas y una estirpe celular de mieloma murino, se fusionan subsiguientemente con una célula plasmática. Además, el término incluye cualquier estirpe celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos tales como, por ejemplo, cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, Nature, 537:3053 (1983)).

“Densidad de células viables integrada”: la expresión “densidad de células viables integrada”, como se usa aquí, se refiere a la densidad media de células viables durante el transcurso del cultivo multiplicada por la cantidad de tiempo que ha estado funcionando el cultivo. Suponiendo que la cantidad de polipéptido y/o proteína producido es proporcional al número de células viables presentes durante el transcurso del cultivo, la densidad de células viables integrada es una herramienta útil para estimar la cantidad de polipéptido y/o proteína producido durante el transcurso del cultivo.

“Medio”, “medio de cultivo celular”, “medio de cultivo”: estas expresiones, como se usan aquí, se refieren a una disolución que contiene nutrientes que alimentan a las células de mamífero en crecimiento. Típicamente, estas disoluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes energéticas, lípidos, y oligoelementos requeridos por la célula para el crecimiento y/o supervivencia mínimos. La disolución también puede contener componentes que potencian el crecimiento y/o supervivencia por encima de la velocidad mínima, incluyendo hormonas y factores de crecimiento. La disolución se formula preferentemente a un pH y una concentración salina óptimos para la supervivencia y proliferación celular. El medio también puede ser un “medio definido” - un medio libre de suero que no contiene proteínas, hidrolizados o componentes de composición desconocida. Los medios definidos están libres de componentes derivados de animales, y todos los componentes tienen una estructura química conocida.

“Producto de desecho metabólico”: la expresión “producto de desecho metabólico”, como se usa aquí, se refiere a compuestos producidos mediante el cultivo celular como resultado de procesos metabólicos normales o no normales que en cierta manera son perjudiciales para el cultivo celular, particularmente en relación con la expresión o actividad de un polipéptido o proteína recombinante deseado. Por ejemplo, los productos de desecho metabólicos pueden ser perjudiciales para el crecimiento o viabilidad del cultivo celular, pueden disminuir la cantidad de polipéptido o proteína recombinante producido, pueden alterar el plegamiento, estabilidad, glicosilación u otra modificación post-traducciona del polipéptido o proteína expresado, o pueden ser perjudiciales para las células y/o la expresión o actividad del polipéptido o proteína recombinante de muchas otras maneras. Los productos de desecho metabólicos ejemplares incluyen lactato, que se produce como resultado del metabolismo de la glucosa y amonio, que se produce como resultado del metabolismo de la glutamina. Un objetivo de la presente invención es ralentizar la producción de, reducir o incluso eliminar los productos de desecho metabólicos en cultivos de células de mamíferos.

“Osmolaridad” y “osmolalidad”: “osmolalidad” es una medida de la presión osmótica de partículas de soluto disueltas en una disolución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas osmóticamente activas (es decir, osmoles) disueltas en 1 kg de disolución (1 mOsm/kg de H₂O a 38°C es equivalente a una presión osmótica de 19 mm Hg). Por el contrario, “osmolaridad” se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de disolución. Cuando se usa aquí, la abreviatura “mOsm” significa “miliosmoles/kg de disolución”.

“Cultivo de perfusión”: la expresión “cultivo de perfusión”, como se usa aquí, se refiere a un método para cultivar células en el que se proporcionan continua o semicontinua componentes adicionales al cultivo después del comienzo del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados comprenden típicamente suplementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Una porción de las células y/o componentes en el medio se cosechan típicamente de forma continua o semicontinua, y opcionalmente se purifican.

“Polipéptido”: el término “polipéptido”, como se usa aquí, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos enlazados juntos vía enlaces peptídicos. El término se usa para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero el experto ordinario en la materia entenderá que el término no se limita a cadenas largas, y se puede referir a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos enlazados juntos vía un enlace peptídico.

“Proteína”: el término “proteína”, como se usa aquí, se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si la unidad que funciona como unidad discreta es un único polipéptido y requiere la asociación física permanente con otros polipéptidos a fin de formar la unidad que funciona como una unidad discreta, los términos “polipéptido” y “proteína”, como se usan aquí, se usan de forma intercambiable. Si la unidad funcional discreta comprende más de un polipéptido que se asocian físicamente entre sí, el término “proteína”, como se usa aquí, se refiere a los múltiples polipéptidos que están físicamente acoplados y funcionan juntos como la unidad discreta.

“Polipéptido expresado recombinantemente” y “polipéptido recombinante”: estas expresiones, como se usan aquí, se refieren a un polipéptido expresado a partir de una célula hospedante de mamífero que se ha manipulado mediante ingeniería genética para expresar ese polipéptido. El polipéptido expresado recombinantemente puede ser idéntico o similar a polipéptidos que son expresados normalmente en la célula hospedante de mamífero. El polipéptido expresado recombinantemente también puede ser ajeno a la célula hospedante, es decir, heterólogo a péptidos expresados normalmente en la célula hospedante de mamífero. Como alternativa, el polipéptido expresado recombinantemente puede ser quimérico por cuanto porciones del polipéptido contienen secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a los polipéptidos expresados normalmente en la célula hospedante de mamífero, mientras que otras porciones son ajenas a la célula hospedante.

“Siembra”: el término “siembra”, como se usa aquí, se refiere al proceso de proporcionar un cultivo celular a un biorreactor u otra vasija. Las células se pueden haber propagado previamente en otro biorreactor o vasija. Como alternativa, las células se pueden haber congelado y descongelado inmediatamente antes de suministrarlas al reactor o a la vasija. El término se refiere a cualquier número de células, incluyendo una única célula.

“Título”: el término “título”, como se usa aquí, se refiere a la cantidad total de polipéptido o proteína expresado recombinantemente producido por un cultivo de células de mamífero, dividida entre una cantidad dada de volumen de medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de polipéptido o proteína por mililitro de medio.

Descripción detallada de determinadas formas de realización preferidas

La presente invención proporciona sistemas mejorados para la producción de proteínas y/o polipéptidos mediante cultivo celular. En particular, la invención proporciona sistemas que minimizan la producción de uno o más productos metabólicos perjudiciales para el crecimiento celular, la viabilidad, y/o la producción o calidad de la proteína. En una forma de realización preferida de la presente invención, el cultivo celular es un cultivo discontinuo o discontinuo alimentado. Otras ciertas formas de realización preferidas de la invención se explican con detalle a continuación. Los expertos ordinarios en la materia entenderán, sin embargo, que diversas modificaciones de estas formas de realización preferidas están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Son las reivindicaciones y sus equivalentes las que definen el alcance de la presente invención, qué no está limitado o no debería estar limitado a o por esta descripción de ciertas formas de realización preferidas.

Polipéptidos

Cualquier polipéptido TNFR-Fc que sea expresable en una célula hospedante se puede producir según la presente invención. El polipéptido se puede expresar a partir de un gen que es endógeno a la célula hospedante, o a partir de un gen que es introducido en la célula hospedante mediante ingeniería genética. El polipéptido puede ser aquel que se produzca en la naturaleza, o como alternativa puede tener una secuencia que se manipuló por ingeniería o se seleccionó por la mano del hombre. Un polipéptido manipulado por ingeniería se puede ensamblar a partir de otros segmentos polipeptídicos que aparecen individualmente en la naturaleza, o puede incluir uno o más segmentos que no son de origen natural.

En otra forma de realización, el anticuerpo es aquel de los anticuerpos anti-GDF-8 humanos denominados Myo29, Myo28, y Myo22, y anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos derivados de aquellos. Estos anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad, inhibir la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* como se demuestra, por ejemplo, mediante inhibición de los ensayos de unión a ActRIIB y del gen informador, y pueden inhibir la actividad de GDF-8 asociada con la regulación negativa de la masa del músculo esquelético y de la densidad ósea. Véase, por ejemplo, Veldman, *et al*, solicitud de patente US nº 20040142382.

Receptores

Otra clase de polipéptidos que ha demostrado ser eficaz como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluye los receptores. Los receptores son típicamente glicoproteínas transmembránicas que funcionan reconociendo un ligando de señalización extracelular. Los receptores tienen típicamente un dominio de proteína cinasa además del dominio que reconoce al ligando, que inicia una ruta de señalización fosforilando moléculas intracelulares diana con la unión al ligando, conduciendo a cambios metabólicos o de desarrollo en la célula. En una forma de realización, los receptores de interés se modifican para eliminar el dominio o dominios transmembránico y/o intracelular, en cuyo lugar se puede unir opcionalmente un dominio de Ig.

En una forma de realización particularmente preferida, los inhibidores del factor de necrosis tumoral, en forma de receptores del factor alfa y beta de necrosis tumoral (TNFR-1; documento EP 417.563 publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014 publicado el 20 de marzo de 1991), son expresados según la presente invención (para un repaso, véase Naismith y Sprang, *J Inflamm.* 47 (1-2):1-7 (1995-96), incorporados a la presente memoria como referencia. Según una forma de realización, el inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un receptor de TNF soluble y preferentemente un TNFR-Ig. En una forma de realización, los inhibidores de TNF preferidos de la presente invención son formas solubles de TNFRI y TNFRII, así como proteínas de unión a TNF solubles; en otra forma de realización, la fusión TNFR-Ig es una TNFR:Fc, un término que, como se usa aquí, se refiere a "*etanercept*", que es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor de TNF-alfa p75, consistiendo cada molécula en una porción Fc de 235 aminoácidos de IgG.sub.1 humana.

En general, los practicantes de la presente invención seleccionarán su polipéptido de interés, y conocerán su secuencia de aminoácidos precisa. Las técnicas de la presente invención se han aplicado con éxito a la producción de diversos polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el factor 8 de crecimiento y diferenciación (Ejemplos 1, 3, 4, 7-14), un anticuerpo antiLewis Y humanizado (Ejemplos 5 y 6), un anticuerpo anti-ABeta (Ejemplo 15) y una proteína de fusión con Fc dimérica del receptor del factor de necrosis tumoral (Ejemplo 16), indicando que la presente invención será útil para la expresión de una variedad de diferentes polipéptidos y proteínas. Cualquier proteína dada que se vaya a expresar según la presente invención tendrá sus propias características idiosincrásicas y puede influir sobre la densidad celular o viabilidad de las células cultivadas, y se puede expresar a niveles menores que otro polipéptido o proteína que se haga crecer en condiciones idénticas de cultivo. El experto ordinario en la materia será capaz de modificar apropiadamente las etapas y composiciones de la presente invención a fin de optimizar el crecimiento celular y/o la producción de cualquier polipéptido o proteína expresado dado.

Elementos de control genético

Como resultará evidente para los expertos ordinarios en la materia, se pueden emplear elementos de control genético para regular la expresión génica del polipéptido o proteína. Tales elementos de control genético se deberían de seleccionar para que fuesen activos en la célula hospedante pertinente. Los elementos de control pueden ser constitutivamente activos, o pueden ser inducibles en circunstancias definidas. Los elementos de control inducibles son particularmente útiles cuando la proteína expresada es tóxica o tiene de otro modo efectos perjudiciales sobre el crecimiento y/o viabilidad celular. En tales casos, la regulación de la expresión del polipéptido o proteína a través de elementos de control inducibles puede mejorar la viabilidad celular, la densidad celular, y/o el rendimiento total del polipéptido o proteína expresado. Se conoce y existe en la técnica un gran número de elementos de control útiles en la práctica de la presente invención.

Los promotores mamíferos constitutivos representativos, que se pueden usar según la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), el promotor de adenosina desaminasa, el promotor de piruvato cinasa, el promotor de beta-actina, así como otros promotores constitutivos conocidos por los expertos ordinarios en la materia. Adicionalmente, los promotores víricos que han mostrado que dirigen la expresión constitutiva de secuencias codificantes en células eucariotas incluyen, por ejemplo, los promotores del virus del simio, promotores del virus del herpes simple, promotores del virus del papiloma, promotores de adenovirus, promotores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), promotores del virus del sarcoma de Rous, promotores del citomegalovirus (CMV), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia murina de Moloney y otros retrovirus, el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple, así como otros promotores víricos conocidos por los expertos ordinarios en la materia.

Los promotores inducibles dirigen la expresión de secuencias codificantes ligadas operablemente en presencia de un agente inductor, y también se pueden usar según la presente invención. Por ejemplo, en células de mamíferos,

el promotor de la metalotioneína induce la transcripción de secuencias codificantes en dirección 3' en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles serán reconocidos por y/o conocidos para los expertos ordinarios en la materia.

En general, la secuencia de expresión génica también incluirá secuencias no transcriptoras en 5' y secuencias no traductoras en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, una secuencia protectora, una secuencia CAAT, y similar. Los elementos potenciadores se pueden usar opcionalmente para incrementar los niveles de expresión de los polipéptidos o proteínas a expresar. Los ejemplos de elementos potenciadores que han demostrado que funcionan en células de mamíferos incluyen el potenciador génico temprano de SV40, como se describe en Dijkema *et al.*, EMBO J. (1985) 4:761, y el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV), como se describe en Gorman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777, y el citomegalovirus humano, como se describe en Boshart *et al.*, Cell (1985) 41:521.

Los sistemas para ligar elementos de control a secuencias codificantes son bien conocidos en la técnica (se describen técnicas generales de biología molecular y de ADN recombinante en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, incorporado a la presente memoria como referencia. También son bien conocidos en la técnica los vectores comerciales adecuados para insertar una secuencia codificante preferida para la expresión en diversas células de mamíferos en una variedad de condiciones de crecimiento e inducción.

Introducción de secuencias codificantes y elementos de control relacionados en células hospedantes

Los métodos adecuados para introducir en células hospedantes de mamíferos ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de los polipéptidos o proteínas de interés son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); Levinson *et al.*; documento EP 117.060; y el documento EP 117.058, todos ellos incorporados aquí como referencia.

Para células de mamíferos, los métodos preferidos de transformación incluyen el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb, Virology, 52:456-457 (1978) o el método de lipofectaminaTM. (Gibco BRL) de Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1193). Los aspectos generales de las transformaciones en sistemas hospedantes de células de mamíferos se han descrito por Axel en la patente U.S. nº 4.399.216 expedida el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas para transformar células de mamíferos, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology (1989), Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990), y Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988). Los ejemplos representativos no limitantes de vectores adecuados para la expresión de polipéptidos o proteínas en células de mamíferos incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, *et al.* (1985) Mol. Cell Biol. 5:1136-1142; pMCIneo Poly-A, véase Thomas, *et al.* (1987) Cell 51:503-512; y un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610.

En formas de realización preferidas, el polipéptido o proteína se transfecta de forma estable en la célula hospedante. Sin embargo, el experto ordinario en la materia reconocerá que la presente invención se puede usar con células de mamíferos transfectadas de forma transitoria o estable.

Células

Según la presente invención, se puede utilizar cualquier célula o tipo celular de mamífero susceptible al cultivo celular y a la expresión de polipéptidos. Los ejemplos no limitantes de células de mamíferos que se pueden usar según la presente invención incluyen la estirpe de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); la estirpe CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la estirpe de riñón embrionario humano (293 ó células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y estirpe de hepatoma humano (Hep G2). En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención se usa en el cultivo y expresión de polipéptidos y proteínas a partir de estirpes celulares CHO.

Adicionalmente, según la presente invención, se puede utilizar cualquier número de estirpes celulares de hibridomas comercial y no comercialmente disponibles que expresen polipéptidos o proteínas. El experto en la materia apreciará que las estirpes celulares de hibridomas pueden tener diferentes requisitos nutricionales, y/o pueden necesitar diferentes condiciones de cultivo para el crecimiento óptimo y la expresión de polipéptidos o proteínas, y será capaz de modificar las condiciones según sea necesario.

Como se ha señalado anteriormente, en muchos casos, las células se seleccionarán o se manipularán mediante ingeniería para producir niveles elevados de proteína o polipéptido. A menudo, las células se manipulan genéticamente mediante ingeniería para producir niveles elevados de proteína, por ejemplo mediante introducción de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés, y/o mediante la introducción de elementos de control que regulan la expresión del gen (ya sea endógeno o introducido) que codifica el polipéptido de interés.

Algunos polipéptidos pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o sobre alguna otra característica de las células que finalmente limita de alguna manera la producción del polipéptido o proteína de interés. Incluso entre una población de células de un tipo particular que se manipula mediante ingeniería para expresar un polipéptido específico, existe variabilidad en la población celular, de forma que algunas células individuales crecerán mejor y/o producirán más polipéptido de interés. En ciertas formas de realización preferidas de la invención, la estirpe celular se selecciona empíricamente por el practicante para el crecimiento robusto en las condiciones particulares escogidas para el cultivo de las células. En formas de realización particularmente preferidas, las células individuales manipuladas mediante ingeniería para expresar un polipéptido particular se escogen para la producción a gran escala basándose en el crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, el título del polipéptido expresado, o cualquier combinación de estas o cualesquiera otras condiciones consideradas importantes por el practicante.

Fase de cultivo celular

Los procedimientos típicos para producir un polipéptido de interés incluyen cultivos discontinuos y cultivos discontinuos alimentados. Los procedimientos de cultivo discontinuo comprenden tradicionalmente inocular un cultivo de producción a gran escala con un cultivo de siembra de una densidad celular particular, hacer crecer las células en condiciones que conduzcan al crecimiento y viabilidad celulares, cosechar el cultivo cuando las células alcanzan una densidad celular específica, y purificar el polipéptido expresado. Los procedimientos de cultivo discontinuo alimentado incluyen una etapa o etapas adicionales de suplementar al cultivo discontinuo con nutrientes y otros componentes que se consumen durante el crecimiento de las células. Un problema persistente y no resuelto con los cultivos discontinuos y discontinuos alimentados tradicionales es la producción de productos de desecho metabólicos, que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad, y la producción de polipéptidos expresados. Dos productos de desecho metabólicos que tienen efectos particularmente perjudiciales son lactato y amonio, que se producen como resultado del metabolismo de la glucosa y de la glutamina, respectivamente. Además de la producción enzimática de amonio como resultado del metabolismo de la glutamina, el amonio también se acumula en cultivos celulares como resultado de la degradación no metabólica con el tiempo. La presente invención proporciona un método mejorado de producción a gran escala de polipéptidos que minimiza los efectos perjudiciales de amonio y lactato ralentizando e incluso invirtiendo la acumulación de estos productos de desecho en cultivos celulares. El experto ordinario en la materia reconocerá que la presente invención se puede emplear en cualquier sistema en el que se cultiven células, incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas discontinuos, discontinuos alimentados, y de perfusión. En ciertas formas de realización preferidas de la presente invención, las células se hacen crecer en sistemas discontinuos o discontinuos alimentados.

Medios

Las formulaciones de medios tradicionales, incluyendo medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado de Dulbecco ([DMEM], Sigma), contienen niveles relativamente elevados de glucosa y glutamina en comparación con otros aminoácidos. Se ha pensado que estos componentes son necesarios en abundancia puesto que son las fuentes energéticas metabólicas principales para las células. Sin embargo, la rápida acumulación de estos nutrientes conduce a la acumulación de lactato y amonio como se describe anteriormente. Adicionalmente, niveles iniciales elevados de glucosa y glutamina, y la acumulación subsiguiente de lactato y amonio, dan como resultado una elevada osmolaridad, una condición que por sí misma es a menudo perjudicial para el crecimiento celular, la viabilidad celular y la producción de polipéptidos.

La presente invención proporciona una variedad de formulaciones de medios que, cuando se usan según otras etapas de cultivo descritas aquí, minimizan e incluso invierten la acumulación de lactato y amonio. Las formulaciones de medios de la presente invención que se ha mostrado que tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento y/o viabilidad celular o sobre la expresión de polipéptido o proteína incluyen una o más de: i) una cantidad acumulativa de aminoácidos por volumen unitario mayor que aproximadamente 70 mM, ii) una relación molar de glutamina acumulativa a asparagina acumulativa menor que alrededor de 2, iii) una relación molar de glutamina acumulativa a aminoácidos totales acumulativos menor que aproximadamente 0,2, iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulativos a aminoácidos totales acumulativos entre aproximadamente 0,4 y 1, y v) una cantidad acumulativa combinada de glutamina y asparagina por volumen unitario mayor que alrededor de 16 mM. El experto ordinario en la materia entenderá que “acumulativa”, como se usa anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente o componentes particulares añadidos a lo largo del cultivo celular, incluyendo componentes añadidos al comienzo del cultivo, y componentes añadidos posteriormente. Un experto ordinario en la materia entenderá que las formulaciones de medios de la presente invención engloban tanto medios definidos como no definidos.

Las formulaciones de medios tradicionales comienzan con un nivel relativamente bajo de aminoácidos totales en comparación con las formulaciones de medios de la presente invención. Por ejemplo, el medio de cultivo celular tradicional conocido como DME-F12 (una mezcla 50:50 de medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio F12 de Ham) tiene un contenido total de aminoácidos de 7,29 mM, y el medio de cultivo celular tradicional conocido como RPMI-1640 tiene un contenido total de aminoácidos de 6,44 mM (véase, por ejemplo, H.J. Morton, *In Vitro*, 6:89-108 (1970), R.G. Ham, Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA), 53:288-293 (1965), G.E. Moore *et al.*, J. Am. Medical Assn., 199:519-24 (1967), incorporados en su totalidad a la presente memoria como referencia). En ciertas formas de realización de la presente invención, la concentración de aminoácidos en los medios de cultivo es preferentemente mayor que alrededor de 70 mM. Todavía más preferible, las formulaciones de medios de la presente invención contienen concentraciones de aminoácidos mayores que alrededor de 70 mM en los medios de partida. Se ha demostrado que, cuando las concentraciones de aminoácidos de los medios de partida están en este intervalo, la densidad celular y el título aumentan durante el período de crecimiento del cultivo (véase el Ejemplo 13).

Adicionalmente, en ciertas formas de realización de la presente invención, la relación molar de glutamina a asparagina en los medios de cultivo se reduce en comparación con otros medios comercial y no comercialmente disponibles. Preferentemente, la relación molar de glutamina a asparagina en los medios de cultivo es menor que alrededor de dos.

Adicionalmente, en ciertas formas de realización de la presente invención, la relación molar de glutamina a aminoácidos totales en los medios de cultivo se reduce en comparación con otros medios comercial y no comercialmente disponibles. Preferentemente, la relación molar de glutamina a aminoácidos totales en los medios de cultivo es menor que alrededor de 0,2.

Un resultado interesante e inesperado de reducir la relación molar de glutamina a asparagina o a la concentración total de aminoácidos en los medios de partida según la presente invención fue que, además de una disminución observada en la acumulación de amonio, se observó igualmente una disminución en la acumulación de lactato. En ciertas formas de realización, los niveles acumulados de amonio y lactato no son sólo menores que aquellos en los cultivos de control, sino de hecho realmente disminuyen tras una acumulación inicial (por ejemplo, véanse los Ejemplos 3 y 7).

Boraston (patente US nº 5.871.999) ha descrito un medio de cultivo en el que la relación molar de iones inorgánicos totales a aminoácidos totales está entre 1 y 10. Boraston mostró que, proporcionando un medio de cultivo en el que la relación molar de iones inorgánicos totales a aminoácidos totales está en este intervalo, se disminuye la agregación de células CHO que se hacen crecer en el medio. En otra forma de realización preferida de la presente invención, la relación molar de iones inorgánicos totales a aminoácidos totales en el medio de cultivo se reduce incluso más, hasta una cantidad entre alrededor de 0,4 y 1. Como se muestra en el Ejemplo 13, la reducción de esta relación desde 1,75 hasta aproximadamente 0,7 da como resultado un notable incremento de la densidad celular y de la producción de polipéptido o proteína expresado, durante el período de crecimiento del cultivo.

En otra forma de realización preferida de la presente invención, el medio de cultivo contiene una concentración combinada de glutamina y asparagina de entre alrededor de 16 y 36 mM. Como se muestra en el Ejemplo 14, Tabla 22, los medios que contienen una concentración total combinada de glutamina y asparagina dentro de este intervalo muestran títulos de polipéptido expresado mayores que los medios que contienen una concentración total combinada de glutamina y asparagina fuera de este intervalo. El experto ordinario en la materia será capaz de escoger la concentración combinada exacta de glutamina y asparagina dentro de este intervalo a fin de optimizar el crecimiento y/o viabilidad celular y para maximizar la producción del polipéptido expresado.

Además, un experto ordinario en la materia reconocerá que cualquiera de las condiciones enumeradas anteriormente se pueden usar ya sea de forma individual o en diversas combinaciones entre sí. Utilizando la formulación de medios que muestra una, algunas o todas las características anteriores, un experto ordinario en la materia será capaz de optimizar el crecimiento y/o viabilidad celular, y de maximizar la producción del polipéptido expresado.

Cualquiera de estas formulaciones de medios descritas en la presente invención se pueden suplementar opcionalmente según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleóticos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales bajas), aminoácidos, lípidos, hidrolizados proteicos, o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas formas de realización de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos tales como hexametileno-bis(acetamida) ("HMBA") y butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al comienzo del cultivo, o se pueden añadir más tarde a fin de reponer los nutrientes agotados, o por otra razón. Un experto ordinario en la materia estará al tanto de cualesquiera suplementos deseables o necesarios que se pueden incluir en las formulaciones de medios descritas.

Proporcionando un cultivo de células de mamíferos

En la técnica son bien conocidos los diversos métodos para preparar células de mamíferos para la producción de proteínas o polipéptidos mediante cultivo discontinuo y discontinuo alimentado. Como se describe anteriormente, un ácido nucleico suficiente para lograr la expresión (típicamente un vector que contiene el gen que codifica el polipéptido o proteína de interés y cualesquiera elementos de control genéticos enlazados operablemente) se puede introducir en

la estirpe celular hospedante mediante cualquier número de técnicas bien conocidas. Típicamente, las células se criban para determinar cuáles de las células hospedantes tienen realmente el vector y expresan el polipéptido o proteína de interés. Los métodos tradicionales para detectar un polipéptido o proteína particular de interés expresado mediante células de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, SDS-PAGE, transferencias Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), técnicas de cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC), ensayos de actividad biológica y cromatografía de afinidad. Un experto ordinario en la materia sabrá otras técnicas apropiadas para detectar polipéptidos o proteínas expresados. Si múltiples células hospedantes expresan el polipéptido o proteína de interés, algunas o todas las técnicas enumeradas se pueden usar para determinar qué células expresan ese polipéptido o proteína a los niveles más elevados.

Una vez que una célula que expresa el polipéptido o proteína de interés se ha identificado, la célula se propaga en cultivo mediante cualquiera de la variedad de métodos bien conocidos por un experto ordinario en la materia. La célula que expresa el polipéptido o proteína de interés se propaga típicamente haciéndola crecer a una temperatura y en un medio que conduce a la supervivencia, crecimiento y viabilidad de la célula. El volumen inicial de cultivo puede tener cualquier tamaño, pero a menudo es menor que el volumen de cultivo del biorreactor de producción usado en la producción final del polipéptido o proteína de interés, y frecuentemente las células se hacen pasar varias veces en biorreactores de volumen creciente antes de sembrar el biorreactor de producción. El cultivo celular se puede agitar mecánica o manualmente para incrementar la oxidación del medio y la dispersión de los nutrientes a las células. Como alternativa o adicionalmente, se pueden usar dispositivos rociadores especiales que son bien conocidos en la técnica para incrementar y controlar la oxigenación del cultivo. Según la presente invención, un experto ordinario en la materia entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor, incluyendo pero sin limitarse a pH, temperatura, oxigenación, etc.

La densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser escogida por un experto ordinario en la materia. Según la presente invención, la densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser tan baja como una célula individual por volumen de cultivo. En formas de realización preferidas de la presente invención, las densidades celulares de partida en el biorreactor de producción pueden estar comprendidos entre aproximadamente 2×10^2 células viables por ml y aproximadamente 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 ó 10×10^6 células viables por ml y superior.

Los cultivos celulares iniciales e intermedios se pueden hacer crecer hasta cualquier densidad deseada antes de sembrar el siguiente biorreactor de producción intermedio o final. Se prefiere que la mayoría de las células estén vivas antes de la siembra, aunque no se requiere una viabilidad total o casi total. En una forma de realización de la presente invención, las células se pueden retirar del sobrenadante, por ejemplo mediante centrifugación a baja velocidad. También puede ser deseable lavar con un medio las células retiradas antes de sembrar el siguiente biorreactor, para eliminar cualesquiera productos de desecho metabólicos indeseados o componentes del medio. El medio puede ser el medio en el que las células se hicieron crecer previamente, o puede ser un medio diferente o una disolución de lavado seleccionada por el practicante de la presente invención.

Las células se pueden diluir entonces hasta una densidad apropiada para sembrar el biorreactor de producción. En una forma de realización preferida de la presente invención, las células se diluyen en el mismo medio que se usará en el biorreactor de la producción. Como alternativa, las células se pueden diluir en otro medio o disolución, dependiendo de las necesidades y deseos del practicante de la presente invención, o para acomodarse a requisitos particulares de las propias células, por ejemplo si se van a almacenar durante un período corto de tiempo antes de sembrar el biorreactor de producción.

Fase de crecimiento inicial

Una vez que el biorreactor de producción se ha sembrado como se describe anteriormente, el cultivo celular se mantiene en la fase de crecimiento inicial en condiciones que conducen a la supervivencia, crecimiento y viabilidad del cultivo celular. Las condiciones precisas variarán dependiendo del tipo celular, del organismo del que derivó la célula, y de la naturaleza y carácter del polipéptido o proteína expresado.

Según la presente invención, el biorreactor de producción puede tener cualquier volumen que sea apropiado para la producción a gran escala de polipéptidos o proteínas. En una forma de realización preferida, el volumen del biorreactor de producción es por lo menos 500 litros. En otras formas de realización preferidas, el volumen del biorreactor de producción es 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Un experto ordinario en la materia sabrá y será capaz de escoger un biorreactor adecuado para uso en la práctica de la presente invención. El biorreactor de producción se puede construir de cualquier material que conduzca al crecimiento y viabilidad celular que no interfiera con la expresión o estabilidad del polipéptido o proteína producido.

La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento inicial se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas en el que el cultivo celular permanece viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, las células CHO crecen bien a 37°C. En general, la mayoría de las células de mamíferos crecen bien en un intervalo de alrededor de 25°C a 42°C. Preferentemente, las células de mamíferos crecen bien en el intervalo de alrededor de 35°C a 40°C. Los expertos ordinarios en la materia serán capaces de seleccionar la temperatura o

temperaturas apropiadas a las que las células crecen, dependiendo de las necesidades de las células y los requisitos de producción del practicante.

En una forma de realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene a una única temperatura constante. En otra forma de realización, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene en un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede aumentar o disminuir de manera uniforme durante la fase de crecimiento inicial. Como alternativa, la temperatura se puede aumentar o disminuir en cantidades discretas a diversos tiempos durante la fase de crecimiento inicial. Un experto ordinario en la materia será capaz de determinar si se debe de usar una única temperatura o múltiples temperaturas, y de si la temperatura se debería de ajustar de forma uniforme o mediante cantidades discretas.

Las células se pueden hacer crecer durante la fase de crecimiento inicial durante una cantidad de tiempo mayor o menor, dependiendo de las necesidades del practicante y del requisito de las propias células. En una forma de realización, las células se hacen crecer durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables, esto es, un porcentaje dado de la densidad máxima de células viables que las células alcanzarían eventualmente si se dejan crecer sin perturbarlas. Por ejemplo, las células se pueden hacer crecer durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 99 por ciento de la densidad máxima de células viables.

En otra forma de realización, las células se dejan crecer durante un período de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de partida del cultivo celular, de la temperatura a la que se hacen crecer las células, y de la velocidad de crecimiento intrínseca de las células, las células se pueden hacer crecer durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, se puede dejar que las células crezcan durante un mes o más. Las células habrían crecido durante 0 días en el biorreactor de producción si su crecimiento en un biorreactor de siembra, a la temperatura de la fase de crecimiento inicial, fue suficiente de forma que la densidad de células viables en el biorreactor de producción en el momento de su inoculación ya tiene el porcentaje deseado de la densidad máxima de células viables. El practicante de la presente invención será capaz de escoger la duración de la fase de crecimiento inicial dependiendo de los requisitos de producción de polipéptido o proteína y de las necesidades de las propias células.

El cultivo celular se puede agitar mecánica o manualmente durante la fase de cultivo inicial a fin de incrementar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. Según la presente invención, un experto ordinario en la materia entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, incluyendo, pero sin limitarse a, pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede controlar suministrando una cantidad apropiada de ácido o base, y la oxigenación se puede controlar con dispositivos rociadores que son bien conocidos en la técnica.

Cambiando las condiciones de cultivo

Según la enseñanza de la presente invención, al final de la fase de crecimiento inicial, por lo menos una de las condiciones del cultivo se puede cambiar de forma que se aplique un segundo conjunto de condiciones de cultivo y se produzca en el cultivo un cambio metabólico. La acumulación de metabolitos inhibidores, de forma muy notable lactato y amonio, inhiben el crecimiento. Un cambio metabólico, logrado, por ejemplo, mediante un cambio en la temperatura, pH, osmolalidad o nivel de inductor químico del cultivo celular, se puede caracterizar por una reducción en la relación de una velocidad específica de producción de lactato a una velocidad específica de consumo de glucosa. En una forma de realización no limitante, las condiciones de cultivo se cambian cambiando la temperatura del cultivo. Sin embargo, como se sabe en la técnica, el cambio de la temperatura no es el único mecanismo a través del cual se puede lograr un cambio metabólico apropiado. Por ejemplo, tal cambio metabólico se puede lograr cambiando otras condiciones del cultivo, incluyendo, pero sin limitarse a, pH, osmolalidad, y niveles de butirato de sodio. Como se explica anteriormente, el tiempo del cambio de cultivo se determinará por el practicante de la presente invención, basándose en los requisitos de producción de polipéptido o proteína o en las necesidades de las propias células.

Cuando se cambia la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede tomar varias horas o días completar el cambio de temperatura. Como alternativa, el cambio de temperatura puede ser relativamente abrupto. Por ejemplo, el cambio de temperatura puede estar terminado en menos de varias horas. Dado el equipo de producción y control apropiado, tal como es normal en la producción comercial a gran escala de polipéptidos o proteínas, el cambio de temperatura puede estar terminado incluso en menos de una hora.

La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento subsiguiente se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas en el que el cultivo celular sigue siendo viable y expresa polipéptidos o proteínas recombinantes a niveles comercialmente adecuados. En general, la mayoría de las células de mamíferos siguen siendo viables y expresan polipéptidos o proteínas recombinantes a niveles comercialmente adecuados dentro de un intervalo de alrededor de 25°C a 42°C. Preferentemente, las células de mamíferos siguen siendo viables y expresan polipéptidos o proteínas recombinantes a niveles comercialmente adecuados en un intervalo de alrededor de 25°C a 35°C. Los expertos ordinarios en la materia serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas apropiadas a las que las células crecen, dependiendo de las necesidades de las células y de los requisitos de producción del practicante.

En una forma de realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento subsiguiente se mantiene a una única temperatura constante. En otra forma de realización, la temperatura de la fase de crecimiento subsiguiente se mantiene en un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede incrementar o disminuir de manera uniforme durante la fase de crecimiento subsiguiente. Como alternativa, la temperatura se puede incrementar o disminuir mediante cantidades discretas a diversos tiempos durante la fase de crecimiento subsiguiente. El experto ordinario en la materia entenderá que en esta forma de realización están englobados múltiples cambios discretos de temperatura. Por ejemplo, la temperatura se puede cambiar una vez, las células se pueden mantener a esta temperatura o intervalo de temperaturas durante un cierto período de tiempo, después de lo cual la temperatura se puede cambiar nuevamente - ya sea a una mayor o menor temperatura. La temperatura del cultivo después de cada cambio discreto puede ser constante, o se puede mantener en un cierto intervalo de temperaturas. En el Ejemplo 16, se muestran datos que demuestran la eficacia de emplear dos cambios sucesivos de temperatura, aunque se entenderá por los expertos ordinarios en la materia que, según la presente invención, se pueden usar tres o más cambios sucesivos de temperatura para incrementar la viabilidad o densidad celular y/o para incrementar la expresión de polipéptidos o proteínas recombinantes. La temperatura o intervalos de temperatura del cultivo celular después de cada cambio sucesivo de temperatura puede ser mayor o menor que la temperatura o temperaturas o intervalo o intervalos de temperatura anteriores al cambio. En una forma de realización preferida de la presente invención, cada temperatura o intervalo de temperatura sucesivo es menor que la temperatura o intervalo de temperatura anterior.

20 *Fase de producción subsiguiente*

Según la presente invención, una vez que las condiciones del cultivo celular se han cambiado como se explica anteriormente, el cultivo celular se mantiene durante una fase de producción subsiguiente bajo un segundo conjunto de condiciones de cultivo que conducen a la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y que son apropiadas para la expresión del polipéptido o proteína deseado a niveles comercialmente adecuados.

Como se explica anteriormente, el cultivo se puede cambiar cambiando una o más de un número de condiciones de cultivo, incluyendo, pero sin limitarse a, temperatura, pH, osmolalidad, y niveles de butirato de sodio. En una forma de realización, se cambia la temperatura del cultivo. Según esta forma de realización, durante la fase de producción subsiguiente, el cultivo se mantiene a una temperatura o intervalo de temperatura que es menor que la temperatura o intervalo de temperatura de la fase de crecimiento inicial. Por ejemplo, durante la fase de producción subsiguiente, las células CHO expresan bien polipéptidos y proteínas recombinantes en un intervalo de 25°C a 35°C. Como se explica anteriormente, se pueden emplear múltiples cambios discretos de temperatura para incrementar la densidad o viabilidad celular, o para incrementar la expresión del polipéptido o proteína recombinante.

Según la presente invención, las células se pueden mantener en la fase de producción subsiguiente hasta que se alcance una densidad celular o título de producción deseado. En una forma de realización, las células se mantienen en la fase de producción subsiguiente hasta que el título del polipéptido o proteína recombinante alcanza un máximo. En otras formas de realización, el cultivo se puede cosechar antes de este momento, dependiendo del requisito de producción del practicante o de las necesidades de las propias células. Por ejemplo, las células se pueden mantener durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 99 por ciento de la densidad máxima de células viables. En algunos casos, puede ser deseable permitir que la densidad de células viables alcance un máximo, y después permitir que la densidad de células viables caiga hasta cierto nivel antes de cosechar el cultivo. En un ejemplo extremo, puede ser deseable permitir que la densidad de células viables se aproxime o alcance cero antes de cosechar el cultivo.

En otra forma de realización de la presente invención, se deja que las células crezcan durante un período de tiempo definido durante la fase de producción subsiguiente. Por ejemplo, dependiendo de la concentración del cultivo celular al comienzo de la fase de crecimiento subsiguiente, de la temperatura a la que se hacen crecer las células, y de la velocidad intrínseca de crecimiento de las células, las células se pueden hacer crecer durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, se puede dejar que las células crezcan durante un mes o más. El practicante de la presente invención será capaz de escoger la duración de la fase de producción subsiguiente dependiendo de los requisitos de producción de polipéptidos o proteínas y de las necesidades de las propias células.

En algunos casos, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular durante la fase de producción subsiguiente con nutrientes u otros componentes del medio que se han agotado o que han sido metabolizados por las células. Por ejemplo, puede ser ventajoso suplementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes del medio que se ve que se han agotado durante la monitorización del cultivo celular (véase la sección "Monitorización de las condiciones de cultivo" más abajo). Como alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular antes de la fase de producción subsiguiente. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía.

Estos componentes suplementarios se pueden añadir todos al cultivo celular de una sola vez, o se pueden proporcionar al cultivo celular en series de adiciones. En una forma de realización de la presente invención, los componentes

suplementarios se proporcionan al cultivo celular en múltiples tiempos en cantidades proporcionales. En otra forma de realización, puede ser deseable proporcionar inicialmente sólo algunos de los componentes suplementarios, y proporcionar más tarde los componentes restantes. Todavía en otra forma de realización de la presente invención, el cultivo celular se alimenta continuamente con estos componentes suplementarios.

Según la presente invención, el volumen total añadido al cultivo celular se debería de mantener óptimamente en una cantidad mínima. Por ejemplo, el volumen total del medio o disolución que contiene los componentes suplementarios añadidos al cultivo celular puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50% del volumen del cultivo celular antes de proporcionar los componentes suplementarios.

El cultivo celular se puede agitar mecánica o manualmente durante la fase de producción subsiguiente a fin de incrementar la oxigenación y la dispersión de los nutrientes a las células. Según la presente invención, un experto ordinario en la materia entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento subsiguiente, incluyendo, pero sin limitarse a, pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH se puede controlar suministrando una cantidad apropiada de ácido o base, y la oxigenación se puede controlar con dispositivos rociadores que son bien conocidos en la técnica.

Monitorización de las condiciones de cultivo

En ciertas formas de realización de la presente invención, el practicante puede encontrar beneficioso o necesario monitorizar periódicamente condiciones particulares del cultivo celular en crecimiento. La monitorización de las condiciones del cultivo celular permite al practicante determinar si el cultivo celular está produciendo polipéptido o proteína recombinante a niveles por debajo de los óptimos o si el cultivo celular va a entrar en una fase de producción subóptima. A fin de monitorizar ciertas condiciones del cultivo celular, será necesario retirar pequeñas alícuotas del cultivo para su análisis. Un experto ordinario en la materia entenderá que tal retirada puede introducir potencialmente contaminación en el cultivo celular, y tendrá cuidado de forma apropiada para minimizar el riesgo de tal contaminación.

Como ejemplo no limitante, puede ser beneficioso o necesario monitorizar la temperatura, el pH, la densidad celular, la viabilidad celular, la densidad integrada de células viables, los niveles de lactato, los niveles de amonio, la osmolaridad, o el título del polipéptido o proteína expresado. En la técnica se conocen numerosas técnicas que permitirán al experto ordinario en la materia medir estas condiciones. Por ejemplo, la densidad celular se puede medir usando un hemocitómetro, un contador Coulter, o un examen de densidad celular (CEDEX). La densidad de las células viables se puede determinar tiñendo una muestra de cultivo con azul de tripán. Puesto que sólo las células muertas absorben el azul de tripán, la densidad de células viables se puede determinar contando el número total de células, dividiendo el número de células que ha absorbido el colorante entre el número total de células, y tomando el inverso. Se puede usar HPLC para determinar los niveles de lactato, de amonio, o del polipéptido o proteína expresado. Como alternativa, el nivel del polipéptido o proteína expresado se puede determinar mediante técnicas estándar de biología molecular, tales como tinción con azul de Coomassie de geles de SDS-PAGE, transferencia Western, ensayos de Bradford, ensayos de Lowry, ensayos de Biuret, y absorbancia de UV. También puede ser beneficioso o necesario monitorizar las modificaciones post-traduccionales del polipéptido o proteína expresado, incluyendo la fosforilación y glicosilación.

Aislamiento del polipéptido expresado

En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar proteínas o polipéptidos expresados según la presente invención. En una forma de realización preferida, el polipéptido o proteína expresado se segrega al medio y de este modo se pueden eliminar células u otros sólidos, mediante centrifugación o filtración por ejemplo, como una primera etapa en el proceso de purificación. Esta forma de realización es particularmente útil cuando se usa según la presente invención, puesto que los métodos y composiciones descritos aquí dan como resultado un aumento de la fiabilidad celular. Como resultado, mueren muy pocas células durante el proceso de cultivo, y se liberan muy pocas enzimas proteolíticas al medio, lo que puede disminuir potencialmente el rendimiento del polipéptido o proteína expresado.

Como alternativa, el polipéptido o proteína expresado se une a la superficie de la célula hospedante. En esta forma de realización, el medio se elimina y las células hospedantes que expresan el polipéptido o proteína se destruyen como una primera etapa en el proceso de purificación. La lisis de las células hospedantes de mamíferos se puede lograr por cualquier número de medios bien conocidos por los expertos ordinarios en la materia, incluyendo la destrucción física mediante perlas de vidrio y la exposición a condiciones de pH elevado.

El polipéptido o proteína se puede aislar y purificar mediante métodos estándar, incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (*por ejemplo*, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de exclusión molecular, y de hidroxiapatita), filtración en gel, centrifugación, o solubilidad diferencial, precipitación con etanol o mediante cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véanse, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2ª Edición, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. y Flames, B.D. (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification : Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997, incorporados

en su totalidad a la presente memoria como referencia). Para la cromatografía mediante inmunoafinidad en particular, la proteína se puede aislar uniéndola a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se obtuvieron frente a esa proteína y se fijaron a un soporte estacionario. Como alternativa, se pueden unir a la proteína mediante técnicas recombinantes estándar marcadores de afinidad, tales como una secuencia de revestimiento de la gripe, polihistidina, o glutatona-S-transferasa, para permitir la purificación fácil mediante pasada sobre la columna de afinidad apropiada. Se pueden añadir inhibidores de proteasas, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina, en cualquiera o en todas las etapas a fin de reducir o eliminar la degradación del polipéptido o proteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de proteasas son particularmente deseados cuando las células se deben destruir a fin de aislar y purificar el polipéptido o proteína expresado. Un experto ordinario en la materia apreciará que la técnica exacta de purificación variará dependiendo del carácter del polipéptido o proteína a purificar, del carácter de las células a partir de las cuales se expresa el polipéptido o proteína, y de la composición del medio en el que se hacen crecer las células.

15 *Formulaciones farmacéuticas*

En ciertas formas de realización preferidas de la invención, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de fármacos. Las composiciones de la invención como se describen anteriormente se pueden administrar a un sujeto, o se pueden formular en primer lugar para el suministro mediante cualquier vía adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a, las vías parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosal, rectal, y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen típicamente un polipéptido o proteína purificado expresado a partir de una estirpe celular de mamífero, un agente de suministro (es decir, un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, un tensioactivo, etc.), como se describe anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen típicamente disoluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ), o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debería de ser estéril y debería de ser fluida hasta el grado en que se pueda inyectar fácilmente. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se deben de conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo pertinente puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similar), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el polipéptido o proteína purificado en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el polipéptido o proteína purificado, expresado en una estirpe celular de mamífero, en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado a vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución previamente filtrada de forma estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte y un vehículo comestible. Para la administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificado se puede incorporar con excipientes, y se puede usar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, *por ejemplo*, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también

se pueden preparar usando un vehículo fluido para uso como un colutorio. Como parte de la composición, se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente que proporciona deslizamiento, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, o sabor de naranja. Las formulaciones para el suministro oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad en el tubo digestivo y/o para potenciar la absorción.

Para administración mediante inhalación, las composiciones de la invención que comprenden un polipéptido o proteína purificado expresado a partir de una estirpe celular de mamífero y un agente de suministro se suministran preferentemente en forma de una pulverización en aerosol a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, *por ejemplo* un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. La presente invención contempla particularmente el suministro de las composiciones usando una pulverización nasal, un inhalador, u otro suministro directo a las vías respiratorias superiores y/o inferiores. La administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra los virus de la gripe ha demostrado que induce respuestas de células T CD8, indicando que por lo menos algunas células en el aparato respiratorio pueden captar ADN cuando se suministran por esta vía, y los agentes de suministro de la invención potenciarán la captación celular. Según ciertas formas de realización de la invención, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado expresado a partir de una estirpe celular de mamífero y un agente de suministro se formulan como grandes partículas porosas para la administración en forma de aerosol.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, *por ejemplo*, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el polipéptido o proteína purificado y los agentes de suministro se formulan en ungüentos, pomadas, geles, o cremas, como se conoce generalmente en la técnica.

Las composiciones también se pueden preparar en forma de supositorios (*por ejemplo*, con bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

En una forma de realización, las composiciones se preparan con vehículos que protegerán al polipéptido o proteína frente a la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán manifiestos para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a partir de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos víricos). Éstas se pueden preparar según métodos conocidos por los expertos en la materia, *por ejemplo* como se describe en la patente US nº 4.522.811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria por la facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de polipéptido o proteína activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

El polipéptido o proteína expresado según la presente invención se puede administrar a diversos intervalos y a lo largo de diferentes períodos de tiempo según se requiera, *por ejemplo* una vez por semana durante un período entre alrededor de 1 y 10 semanas, entre 2 y 8 semanas, entre alrededor de 3 y 7 semanas, alrededor de 4, 5, ó 6 semanas, etc. El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Generalmente, el tratamiento de un sujeto con un polipéptido o proteína como se describe aquí puede incluir un único tratamiento, o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Se entiende además que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína, y opcionalmente se pueden personalizar para el receptor particular, *por ejemplo* mediante la administración de dosis crecientes hasta que se logra una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del polipéptido o proteína específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, género, y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, cualquier combinación farmacéutica, y el grado de expresión o actividad a modular.

La presente invención incluye el uso de las composiciones de la invención para el tratamiento de animales no humanos. En consecuencia, las dosis y métodos de administración se pueden seleccionar según principios conocidos de farmacología y medicina veterinarias. En Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8ª edición, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001, *por ejemplo*, se puede encontrar una guía.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden incluir en un recipiente, envase o dispensador, junto con instrucciones para la administración.

Se entenderá que la descripción anterior se proporciona únicamente a título representativo y limitativo. Los métodos y materiales alternativos para poner en práctica la invención, y también aplicaciones adicionales, se pondrán de manifiesto para el experto en la materia, y están incluidos dentro de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Medio 1 mejorado para proceso discontinuo alimentado de anti-GDF-8

Los procesos discontinuos alimentados tradicionales para cultivar estirpes celulares tienen varios inconvenientes, incluyendo el tiempo y el esfuerzo requerido para administrar las alimentaciones, y la necesidad de equipo especial en biorreactores a gran escala. El objetivo fue desarrollar un medio discontinuo para la producción de proteínas de interés en biorreactores a gran escala que requiera alimentaciones mínimas.

Materiales y métodos

Cepas y medios: Se manipularon mediante ingeniería células de ovario de hámster chino (CHO) para expresar un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor 8 de crecimiento y diferenciación ("células 'anti-GDF-8'") (véase Veldman *et al.*, *Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor*, documento US20040142382 A1). Las células anti-GDF-8 se usaron para probar un nuevo medio discontinuo. Se comparó el Medio 1 y el Medio 2 en cuanto a sus capacidades para mantener una densidad celular elevada y la viabilidad. En la Tabla 1 se enumeran las composiciones de estos medios, así como del Medio 3. Los medios se obtienen añadiendo todos los componentes salvo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Los medios se ajustaron entonces hasta pH 7,25, se registró la osmolaridad, y entonces se añadió $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Condiciones de cultivo: Para experimentos en matraz, se hicieron crecer células anti-GDF-8 en matraces de agitación, y se hicieron pasar tres veces. Para experimentos en biorreactor, se hicieron crecer células anti-GDF-8 en medios durante 12 días, se suplementaron diariamente con 2% en volumen de medio de alimentación Medio 4 20X (Tabla 3) o 3% en volumen de Medio 4 16X (Tabla 4) después del 5º día. Para los primeros 4 días, las células se hicieron crecer a 37°C. En el 5º día, las células se cambiaron a 31°C.

Análisis de muestras: Se tomaron diariamente muestras de los cultivos y se analizaron para determinar los niveles de aminoácidos, vitaminas, hierro, fosfato, glucosa y glutamina.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 341 390 T3

TABLA 1

Composiciones del Medio 1, Medio 2 y Medio 3

	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
Aminoácidos	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
alanina	96,03	1,08	17,80	0,20	24,87	0,28
arginina	1186,99	6,82	347,97	2,00	423,43	2,43
asparagina•H ₂ O	713,59	4,76	75,00	0,50	173,90	1,16
ácido aspártico	318,53	2,39	26,20	0,20	52,72	0,40
cisteína•HCl•H ₂ O	70,01	0,40	70,19	0,40	70,01	0,40
cisteína•2HCl	297,09	0,95	62,25	0,20	62,09	0,20
ácido glutámico	158,59	1,08	29,40	0,20	41,08	0,28
glutamina	1892,40	12,96	1163,95	7,97	1162,40	7,96
glicina	95,88	1,28	30,00	0,40	35,92	0,48
histidina•HCl•N ₂ O	369,10	1,76	46,00	0,22	75,27	0,36
isoleucina	623,63	4,76	104,99	0,80	151,90	1,16
leucina	852,31	6,51	104,99	0,80	172,89	1,32
lisina•HCl	945,96	5,20	145,99	0,80	218,38	1,20
metionina	291,82	1,96	29,80	0,20	53,55	0,36
fenilalanina	428,62	2,60	65,99	0,40	98,81	0,60
prolina	372,25	3,24	68,99	0,60	96,40	0,84
serina	904,71	8,62	126,00	1,20	273,07	2,60
treonina	513,39	4,31	94,99	0,80	132,81	1,12
triptófano	159,32	0,78	16,00	0,08	28,99	0,14
tirosina•2Na•2H ₂ O	560,81	2,15	103,79	0,40	145,10	0,56
valina	505,36	4,32	93,99	0,80	131,17	1,12
Vitaminas	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l	μM
biotina	2,00	8,21	0,20	0,82	0,36	1,49
pantotenato de calcio	22,02	46,27	2,24	4,71	4,03	8,47
cloruro de colina	87,67	630,74	8,98	64,60	16,11	115,92
ácido fólico	25,95	58,84	2,65	6,01	4,76	10,80
inositol	123,39	685,47	12,60	69,99	22,64	125,79
nicotinamida	19,60	160,70	2,02	16,56	3,61	29,62
piridoxal•HCl	1,99	9,83	2,00	9,85	1,99	9,83

ES 2 341 390 T3

	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
piridoxina•HCl	18,06	87,67	0,03	0,15	1,67	8,10
riboflavina	2,20	5,85	0,22	0,59	0,40	1,06
tiamina•HCl	21,51	63,84	2,17	6,44	3,92	11,64
vitamina B12	6,93	5,12	0,78	0,58	1,34	0,99
Sales inorgánicas	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
CaCl ₂	115,78	1,04	116,09	1,05	115,78	1,04
KCl	310,94	4,17	311,77	4,18	310,94	4,17
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50	70,99	0,50	70,81	0,50
NaCl	1104,96	18,92	5539,00	94,85	3704,96	63,44
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	636,33	4,61	62,49	0,45	114,33	0,83
MgSO ₄	48,70	0,41	48,83	0,41	48,70	0,41
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,03	95,00			8,60	95,00
MgCl ₂	28,53	0,30	28,61	0,30	28,53	0,30
NaHCO ₂	2000,00	23,81	2440,00	29,04	2440,00	29,04
Oligoelementos	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
Selenito de sodio	28,00	161,94	5,00	28,92	7,00	40,49
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	49,86	123,42	50,00	123,75	49,86	123,42
CuSO ₄	2,69	16,80	0,80	5,00	0,97	6,06
CuSO ₄ •5H ₂ O	11,24	45,00			7,49	30,00
FeSO ₄ •7H ₂ O	2503,85	9006,64	839,96	3021,45	1542,85	5649,81
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2734,77	9528,82	429,96	1498,12	1383,80	4821,59
MnSO ₄ •H ₂ O	0,26	1,51			0,17	1,01
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	210,00	739,27			140,00	492,84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,86	1,50			1,24	1,00
NH ₄ VO ₃	0,98	8,33			0,65	5,56
NiSO ₄ •6H ₂ O	0,20	0,74			0,13	0,49
SnCl ₂ •2N ₂ O	0,18	0,80			0,12	0,53
Otros componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Hidrocortisona	0,23	0,64	0,04	0,10	0,09	0,24
Putrescina•2HCl	6,48	40,22	1,08	6,70	2,48	15,39
ácido linoleico	0,22	0,80	0,04	0,14	0,06	0,20
ácido tióctico	0,56	2,73	0,10	0,49	0,14	0,69
D-glucosa (Dextrosa)	16039,43	89107,92	6150,72	34170,64	11042,24	61345,76
PVA	2560,00		2400,00		2520,00	
Insulina	54,00		10,00		14,00	
Piruvato de sodio	54,85	498,63	55,00	499,95	54,85	498,63

Resultados y conclusiones

La Figura 1 muestra que la velocidad de crecimiento de las células anti-GDF-8 fue similar tanto en el Medio 1 como en el Medio 2 en los experimentos en matraz.

La Figura 2 muestra que, en biorreactores, el Medio 1 mostró un incremento significativo en la densidad celular final y en la viabilidad con respecto al Medio 3. El título final también aumentó significativamente, desde 551 mg/l para el procedimiento de plataforma hasta 976 mg/l con el Medio 1 (datos no mostrados). La temperatura se cambió desde 37°C hasta 31°C en el 5° día. Debido al elevado crecimiento celular inesperado, los cultivos se alimentaron diariamente después del 5° día con 2% en volumen de Medio 4 20X o 3% en volumen de Medio 4 16X. De este modo, éste no es un experimento discontinuo verdadero como se pretendía originalmente. Se suplementaron asparagina y tiamina en los medios de alimentación, comenzando en el 10° día.

Al desarrollar un medio discontinuo concentrado, es necesario considerar varios problemas posibles. En primer lugar, los nutrientes concentrados pueden ser tóxicos para las células. En los medios desarrollados en este Ejemplo, se determinó que todos los nutrientes y componentes estaban por debajo de los límites de toxicidad (datos no mostrados).

En segundo lugar, el medio discontinuo concentrado tiene necesariamente una osmolaridad mayor que un medio no concentrado, lo que se ha demostrado que tiene efectos perjudiciales sobre el crecimiento y viabilidad celulares. Este problema se puede evitar disminuyendo la cantidad de NaCl en el medio de partida. Además, el medio discontinuo concentrado contiene niveles insuficientes de glucosa para sostener el crecimiento durante todo el período de cultivo. De este modo, los cultivos se suplementaron diariamente después del 5° día con una alimentación de glucosa.

En tercer lugar, la insulina y la glutamina son susceptibles de ser degradadas durante el período de cultivo de 12 días. De este modo, el cultivo se suplementó con estos componentes, además de glucosa.

Finalmente, el hierro precipitará en la disolución que contiene concentraciones elevadas de fosfato a pH elevado. Este problema se puede evitar añadiendo hierro al final del procedimiento de preparación del medio, después de que el pH se haya ajustado a un nivel apropiado.

*Ejemplo 2**Desarrollo de medio de alimentación concentrado (Medio 5) para células anti-GDF-8 en un proceso discontinuo alimentado*

En el Ejemplo 1, se desarrolló un proceso discontinuo para cultivar células anti-GDF-8 usando Medio 1. Debido a la elevada densidad celular que se obtuvo durante el proceso, se determinó que la suplementación de nutrientes, además de glucosa y glutamina, todavía era ventajosa. Sin embargo, la suplementación del lote con medio de alimentación Medio 4 8X daría como resultado una dilución excesiva de cultivo. A fin de evitar este problema, se desarrolló un medio de alimentación más concentrado.

Materiales y métodos y resultados

La Tabla 2 enumera las composiciones de Medio 4A-1, Medio 4B, Oligo B y Oligo D usadas en las formulaciones de las Tablas 3-7.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 341 390 T3

TABLA 2

Composiciones de Medio 4A-1, Medio 4B, Oligo B y Oligo D usadas en las formulaciones de las Tablas 3-7

	Medio 4A-1		Medio 4B		Oligoelementos B		Oligoelementos D	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
Aminoácidos								
alanina	17,80	0,20						
arginina	191,00	1,10						
asparagina•H ₂ O	135,00	0,90						
ácido aspártico			66,50	0,50				
ácido glutámico			29,40	0,20				
glicina	15,00	0,20						
histidina•HCl•H ₂ O	73,50	0,35						
isoleucina	118,00	0,90						
leucina	170,00	1,30						
lisina•HCl	182,00	1,00						
metionina	59,60	0,40						
fenilalanina	82,50	0,50						
prolina	69,00	0,60						
serina	158,00	1,60						
treonina	95,20	0,80						
triptófano	32,60	0,16						
tirosina•2Na•2H ₂ O			104,00	0,40				
valina	93,60	0,80						
Vitaminas	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l	mM	mg/l	mM
biotina	0,41	1,68						
pantotenato de calcio	4,50	9,45						
cloruro de colina	17,90	128,78						
ácido fólico			5,30	12,02				
Inositol	25,20	140,00						
nicotinamida	4,00	32,79						
piridoxina•HCl	4,10	19,90						
riboflavina	0,45	1,20						
tiamina•HCl	4,40	13,06						
vitamina B12	1,40	1,03						
Oligoelementos	μg/l	nM	mg/l	μM	μg/l	nM	μg/l	nM
(NH ₄) ₅ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O					1,24	1,00		
CuSO ₄	0,43	2,69						
CuSO ₄ •5H ₂ O							7,49	30,00
FeSO ₄ •7H ₂ O							834	3000
MnSO ₄ •H ₂ O					0,17	1,01		
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O					140,00	492,84		
NH ₄ VO ₃					0,65	5,56		
NiSO ₄ •6H ₂ O					0,13	0,49		

ES 2 341 390 T3

	Medio 4A-1		Medio 4B		Oligoelementos B		Oligoelementos D	
SnCl ₂ •2H ₂ O					0,12	0,53		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	230,00	801,38					863	3007
Other Components	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
ácido linoleico			42,00	0,15				
ácido tióctico			105,00	0,51				
D-glucosa (Dexuosa)			1000000	5555,56				

Medio 4 20X

El primer medio concentrado se desarrolló como Medio 4 20X. La formulación del medio para el Medio 4 20X se proporciona en la Tabla 3.

TABLA 3

Hoja de trabajo del medio de alimentación Medio 4 20X

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	31,120	g/l
	Nucellin™	40,000	ml/l
	Lote de H/P	20,000	ml/l
	Lote de selenito	2,000	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,610	g/l
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,430	g/l
	Ácido aspártico	1,330	g/l
	Ácido glutámico	0,588	g/l
	Ácido linoleico	0,840	ml/l
	Ácido tióctico	2,100	ml/l
	Tirosina•2Na (Pm 225)	1,790	g/l
	1000X Oligo B	6,000	ml/l
	Glucosa	100,000	g/l
	Glutamina	14,600	g/l
	pH hasta 7,0		
	Osmolaridad máxima	1064,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Añádanse 108 ml Oligo D, 0,25 g FeSO ₄ •7H ₂ O a 280 ml de lote de Cisteína	
III	Ácido fólico	720 ml de ácido fólico 6 mM	
Nota: Nucellin™ es fabricada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); Lote de H/P = 0,036 mg/ml de Hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.			

La formulación del medio consiste en 3 partes: I, II, III. La parte I es la versión concentrada del Medio 4 8X con los componentes individuales del Medio 4B excepto el ácido fólico debido a los problemas de la solubilidad de esta vitamina. La parte II es un lote de hierro, Oligo D y cisteína ácida, para evitar la posible precipitación de hierro si se añade en la parte I. La parte III es un lote de ácido fólico. La parte I se añade diariamente en una cantidad de 2% en volumen comenzando el 5º día, y las partes II y III se añaden una sola vez en el 5º día junto con la parte I.

El pH final del medio de alimentación se ajustó a 7,0, y la osmolaridad fue alrededor de 1064 mOsm. Una alimentación del 2% dará como resultado un incremento de 2 g/l de glucosa, de 2 mM de glutamina y de 14 mOsm de la osmolaridad al cultivo.

ES 2 341 390 T3

2. Medio 4 16X

Para reducir el incremento de la osmolaridad, el medio de alimentación se cambió de medio 4 20X (2% en volumen diario) a Medio 4 16X (3% en volumen diario). En la Tabla 4 se proporciona la formulación del medio para Medio 4 16X.

TABLA 4

Hoja de trabajo del medio de alimentación Medio 4 16X

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	24,896	g/l
	Nucellin TM	32,000	ml/l
	Lote de H/P	16,000	ml/l
	Lote de selenito	1,600	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,088	g/l
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,344	g/l
	Ácido aspártico	1,064	g/l
	Ácido glutámico	0,470	g/l
	Ácido linoleico	0,672	ml/l
	Ácido tióctico	1,680	ml/l
	Tirosina•2Na (Pm 225)	1,432	g/l
	1000X Oligo B	9,000	ml/l
	Glutamina	6,280	g/l
	pH a 7,0		
	Osmolaridad máxima	295,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Añádanse 108 ml de Oligo D, 0,25 g FeSO ₄ •7H ₂ O a 280 ml de lote de Cisteína	
III	Ácido fólico	720 ml de ácido fólico 6 mM	

Nota: NucellinTM es fabricada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); Lote de H/P = 0,036 mg/ml de Hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

En este Medio 4 16X modificado, también se eliminó la glucosa para reducir adicionalmente la osmolaridad y dar cierta flexibilidad a la alimentación de glucosa. La osmolaridad total del medio de alimentación es ahora 295 mOsm.

3. Medio 4 16X

Se realizaron cambios a la formulación de Medio 4 16X. La disolución madre de hierro se añadió a la alimentación dando como resultado una adición de 0,45 μ M en cada alimentación. Adicionalmente, se añadió nuevamente glucosa para dar una adición de 1,5 g/l a cada alimentación. La formulación del medio para este Medio 4 16X modificado se proporciona en la Tabla 5.

ES 2 341 390 T3

TABLA 5

Hoja de trabajo del medio de alimentación Medio 4 16X

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	24,896	g/l
	Nucellin TM	32,000	ml/l
	Lote de H/P	16,000	ml/l
	Lote de selenito	1,600	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,088	g/l
	MgSO ₄ •7H ₂ O	0,344	g/l
	Ácido aspártico	1,064	g/l
	Ácido glutámico	0,470	g/l
	Ácido linoleico	0,672	ml/l
	Ácido tióctico	1,680	ml/l
	Tirosina•2Na (Pm 225)	1,432	g/l
	1000X Oligo B	9,000	ml/l
	Glucosa	50,000	g/l
	Glutamina	7,300	g/l
	pH a 7,0		
	FeSO ₄ •7H ₂ O (lote 1 mM)	15,000	ml/l
	Osmolaridad máxima	607,000	mOsm
II	Ácido fólico	720 ml de ácido fólico 6 mM	
III	Cisteína (400 mM)	Añádanse 108 ml de Oligo D, 0,25 g FeSO ₄ •7H ₂ O a 280 ml de lote de Cisteína	

Nota: NucellinTM es fabricada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); Lote de H/P = 0,036 mg/ml de Hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.

4. Medio 4 16X

Aquí, el medio de alimentación (Medio 4 16X) se obtuvo en medio combinado en lugar de 3 alimentaciones separadas como en los últimos varios lotes. Se realizaron ensayos para asegurarse de que el ácido fólico se podría disolver a la concentración requerida, y que ni el hierro ni el ácido fólico precipitaban en la disolución tras almacenarla a 4°C o a la temperatura ambiente durante 6 días. En la Tabla 6 se proporciona la formulación del medio para el Medio 4 16X combinado.

TABLA 6

Hoja de trabajo del medio de alimentación Medio 4 16X

Componente	Cantidad	Unidad
Medio 4A-1	24,896	g/l
Nucellin TM	32,000	ml/l
Lote de H/P	16,000	ml/l
Lote de selenito	1,600	ml/l
PVA	2,400	g/l
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	2,088	g/l
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,344	g/l

Componente	Cantidad	Unidad
Ácido aspártico	1,064	g/l
Ácido glutámico	0,470	g/l
Ácido linoleico	0,672	ml/l
Ácido tióctico	1,680	ml/l
Tirosina-2Na (Pm 225)	1,432	g/l
Glucosa	66,700	g/l
Glutamina	7,300	g/l
Ácido fólico	70,560	mg/l
Acidic cisteína (400 mM)	6,250	ml/l
Lote de FeSO ₄ (1 mM)	23,000	ml/l
1000x Oligo B	9,000	ml/l
1000x Oligo D	3,300	ml/l
pH expected 6,11	Ajustado a 7,0	
Osmolaridad máxima	724,000	mOsm
Nota: Nucellin™ es fabricada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); Lote de H/P = 0,036 mg/ml de Hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.		

La osmolaridad final del medio es 724 mOsm, con una adición diaria de glucosa de 2 g/l y una adición de glutamina de 1,5 mM.

5. Medio 4 12X

Aquí, se realizaron varios cambios al medio de alimentación. Se usó polvo de Medio 4B en lugar de añadir cada ingrediente individual al Medio 4B. El polvo de Medio 4B se mezcló con glucosa y se disolvió separadamente en condiciones básicas valorando la disolución hasta pH 10,25. Se añadieron asparagina y tiamina adicionales, puesto que los resultados del análisis de aminoácidos y vitaminas mostraron que estos dos componentes estaban agotados al final del proceso discontinuo alimentado. El uso de Medio 4 12X redujo adicionalmente el incremento de la osmolaridad cuando se alimentó al cultivo. En la Tabla 7 se proporciona la formulación del medio para Medio 4 12X.

TABLA 7

Hoja de trabajo del medio de alimentación Medio 4 12X

Componente	Cantidad	Unidad
Medio 4A-1	18,672	g/l
Nucellin™	24,000	ml/l
Lote de H/P	12,000	ml/l
Lote de selenito	1,200	ml/l
PVA	2,400	g/l
Asparagina.H ₂ O	1,620	g/l
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,566	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,258	g/l
Glutamina	5,475	g/l
Tiamina	0,040	g/l
Medio 4B predisoluto y Glucosa	~175	ml/l
Cisteína ácida (400 mM)	4,688	ml/l

ES 2 341 390 T3

Componente	Cantidad	Unidad
pH máximo		
Ajustar pH hasta 7,2 con HCl 5N		
Lote de FeSO ₄ (1 mM)	17,250	ml/l
1000x Oligo B	6,750	ml/l
1000x Oligo D	2,475	ml/l
pH máximo (esperado 7,18)		
Osm. máxima	566,000	
Medio 4B predisuelto y Glucosa* (para medio de alimentación de 1l)		
Agua	150 ml	
Mezclar el Medio 4B (14,5 g) con glucosa (38,3 g)	Añadir	
Ajustar el pH usando NaOH al 25% hasta que se disuelva (pH aproximadamente 10,25)		
Nota: Nucellin™ es fabricada por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); Lote de H/P = 0,036 mg/ml de Hidrocortisona, 1,08 mg/ml de Putrescina•2HCl.		

La osmolaridad final es 566 mOsm. Una alimentación diaria de 4% en volumen da un incremento aproximado de la osmolaridad de 8,6, un incremento en la glucosa de 2 g/l, y un incremento en la glutamina de 1,5 mM. La formulación del medio Medio 4 12X es conocida también como Medio 5. El Medio 5 es fácil de obtener en comparación con Medio 4 20X o Medio 4 16X, y es estable durante 10 días a temperatura ambiente o a 4°C (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Proceso discontinuo alimentado desprovisto de glutamina para cultivo de células anti-GDF-8

Las células CHO requieren glutamina en el medio de partida para que puedan sobrevivir. Tradicionalmente, los niveles iniciales de glutamina son elevados, y la glutamina se alimenta diariamente después del 5° día hasta el final del proceso discontinuo alimentado. Los procesos discontinuos alimentados tradicionales normalmente dan como resultado niveles elevados de lactato y amonio en los cultivos celulares, que se sabe que tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento celular, la densidad celular y la expresión de proteína recombinante. Se ha demostrado que los procesos discontinuos alimentados en los que se añade lentamente glucosa reducen la producción de lactato y mejoran el crecimiento celular, la densidad celular y la expresión de proteína recombinante. Sin embargo, los métodos de la técnica anterior para la manipulación de la adición de glucosa no son prácticos para la fabricación a gran escala. Aquí, utilizando medios de cultivo con menores niveles de partida de glutamina, y eliminando la glutamina de la alimentación, se demuestra que se producen menores niveles de amonio y lactato, conduciendo a un aumento de la viabilidad celular. Adicionalmente, en cultivos desprovistos de glutamina, se incrementa la expresión de proteína recombinante y se reduce la osmolaridad final.

Materiales y métodos

Cepas y medios: Se cultivaron células anti-GDF-8 en un modo discontinuo alimentado en Medio 1 en un biorreactor de 1 l.

Condiciones de cultivo: Las células se hicieron crecer durante doce días en biorreactores de 1 l. La temperatura se cambió de 37°C a 31°C en el 4° día o en el 5° día, dependiendo del crecimiento celular. Se ensayaron tres procesos discontinuos alimentados: un proceso normal (control), un proceso de alimentación sin glutamina, y un proceso desprovisto de glutamina. En la Tabla 8 y en la Tabla 9 se enumeran los detalles pertinentes de estos procesos.

ES 2 341 390 T3

TABLA 8

Proceso discontinuo alimentado en biorreactores de 1 l con proceso de alimentación sin glutamina

	Proceso de control	Proceso sin alimentación de glutamina
Medio de partida Glutamina (mM)	13 mM	13 mM
Alimentación de glutamina	5 mM en el 4º día	Sin alimentación de glutamina
Medio de alimentación	Medio 5 (con 37,5 mM de glutamina)	Medio 5 sin glutamina
Programa de alimentación	4% diario desde el 5º día	4% diario desde el 5º día
Cambio de temperatura a 31 °C	4º día	5º día

TABLA 9

Proceso discontinuo alimentado en biorreactores de 1 l con proceso desprovisto de glutamina

	Proceso de control	Proceso con bajo contenido de glutamina
Medio de partida Glutamina (mM)	13 mM	4 mM
Alimentación de glutamina	5 mM en el 4º día	Sin alimentación de glutamina
Medio de alimentación	Medio 5 (con 37,5 mM de glutamina)	Medio 5 sin glutamina
Programa de alimentación	4% diario desde el 5º día	4% diario desde el 5º día
Cambio de temperatura a 31 °C	4º día	5º día

Análisis de muestras: Se tomaron diariamente muestras de los cultivos y se analizaron para determinar la densidad celular, la viabilidad celular, los niveles de lactato, glutamina y amonio. También se midió diariamente el título de anticuerpo anti-GDF-8 expresado.

Resultados y conclusiones

La Figura 3 muestra la densidad celular de cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas sin alimentación de glutamina o de control. En ambos casos, la densidad celular fue similar durante todo el experimento.

La Figura 4 muestra el porcentaje de viabilidad celular en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas sin alimentación de glutamina o de control. El cultivo sin alimentación de glutamina mostró una viabilidad celular notablemente superior hacia el final del experimento, empezando en el día 6.

La Figura 5 muestra niveles de amonio en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas sin alimentación de glutamina o de control. El cultivo sin alimentación de glutamina mostró una notable disminución en los niveles de amonio hacia el final del experimento, empezando en el 4º día.

La Figura 6 muestra los niveles de lactato en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas sin alimentación de glutamina o de control. Los niveles de lactato fueron ligeramente menores en el cultivo sin alimentación de glutamina durante todo el experimento.

La Figura 7 muestra el título de anticuerpos anti-GDF-8 en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas sin alimentación de glutamina o de control. El título final de anticuerpos anti-GDF-8 fue mayor en el cultivo sin alimentación de glutamina.

La Figura 8 muestra la densidad celular de cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas desprovistas de glutamina o de control. En ambos casos, la densidad celular fue similar durante todo el experimento.

ES 2 341 390 T3

La Figura 9 muestra la viabilidad celular en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas privadas de glutamina o de control. En ambos casos, la viabilidad celular fue similar durante todo el experimento.

La Figura 10 muestra los niveles de amonio en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas privadas de glutamina o de control. El cultivo privado de glutamina mostró una notable disminución de los niveles de amonio durante todo el experimento.

La Figura 11 muestra los niveles de lactato en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas desprovistas de glutamina o de control. El cultivo desprovisto de glutamina mostró una notable disminución de los niveles de lactato hacia el final del experimento, empezando en el 4° día.

La Figura 12 muestra el título de anticuerpos anti-GDF-8 en cultivos que se hicieron crecer en condiciones discontinuas alimentadas desprovistas de glutamina o de control. El título final de anticuerpos anti-GDF-8 fue mayor en el cultivo desprovisto de glutamina.

Colectivamente, estos resultados indican que niveles reducidos de glutamina son beneficiosos para cultivos celulares reduciendo la cantidad de producción de amonio, incrementando la viabilidad celular e incrementando el título de anticuerpo anti-GDF-8 expresado. Además, en los cultivos desprovistos de glutamina, se observaron niveles bajos de lactato, posiblemente debido a la disminución de la velocidad de consumo de glucosa. La disminución de los niveles de amonio y lactato también tiene el efecto de reducir la osmolaridad total. También es conocido que una osmolaridad elevada tiene efectos inhibidores sobre el crecimiento y viabilidad celulares. Niveles iniciales bajos de glutamina, junto con la eliminación de la alimentación de glutamina, también tiene el efecto positivo de reducir el amonio producido como resultado de la degradación no enzimática de la glutamina en medios almacenados. La eliminación de la glutamina en la alimentación también simplifica el proceso de cultivo de las células anti-GDF-8.

Ejemplo 4

Respuesta a la dosis de hierro de células anti-GDF-8 en Medio 1 y Medio 2

El Medio 1 es mucho más concentrado en nutrientes que el Medio 2. Se determinaron los niveles óptimos de hierro para el crecimiento celular en Medio 1 a fin de evitar problemas con la deficiencia de hierro durante el cultivo celular.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 en cápsulas para una pasada en Medio 1 o Medio 2. Las concentraciones de hierro de estos medios se manipularon mediante adición de diferentes cantidades de disolución madre de hierro. Las densidades celulares finales se midieron mediante CEDEX.

Resultados y conclusión

La Figura 13 muestra la respuesta a la dosis de Fe de células anti-GDF-8 en Medio 1 y Medio 2 que contienen diferentes concentraciones de hierro. En Medio 2, la densidad celular fue relativamente constante para concentraciones de hierro que oscilan de 3 μM a 15 μM . En el Medio 1, la densidad celular aumenta al aumentar la concentración de hierro, pero alcanza un máximo después de aproximadamente 5 μM . Esta diferencia podría ser debida al elevado contenido de nutrientes en Medio 1, que puede reducir la disponibilidad del hierro a las células como consecuencia de la quelación del hierro en el medio. Estos resultados indican que los niveles de hierro se deberían de mantener por encima de 5 μM para evitar problemas con la deficiencia de hierro en Medio 1.

Ejemplo 5

Sustitución de glutamina por glutamato en el proceso en biorreactor

Se llevaron a cabo tres experimentos para ensayar los efectos de la sustitución de glutamina por glutamato en un proceso de cultivo de células anti-Lewis Y.

Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en biorreactores de 10 l a pH 7,1, 30% de oxígeno disuelto, y una temperatura de partida de 37°C, con un cambio a 31°C en el 5° día. Los gases de rociado y de la cámara de aire fueron 88% de una mezcla de 93% de aire/7% de CO₂ y 12% de oxígeno. El medio de partida en todos los experimentos fue Medio 1, que contiene glutamina. En la Tabla 10 se muestra el medio de alimentación y el programa de alimentación que incluye alimentaciones suplementarias de glucosa y glutamina. Las columnas etiquetadas "Glutamato" se alimentaron

ES 2 341 390 T3

con Medio 5 modificado, que no contiene glutamina, pero que contiene una concentración molar de glutamato igual a la concentración molar de glutamina en Medio 5 estándar. Las columnas etiquetadas como glutamina se alimentaron con Medio 5 estándar.

TABLA 10

Programa de alimentación

Día	9040-44		9040-56		9040-64	
	Glutamato 1	Glutamina 1	Glutamato 2	Glutamina 2	Glutamato 3	Glutamina 3
0						
1						
2						
3						
4		5 mM gln		5 mM gln	3 g/l gluc	7,7 mM gln 2,9 g/l gluc
5	3,6 g/ gluc	5 mM gln 5,5 g/l gluc	3,5 g/l gluc	5 mM gln 6 g/l gluc	3 g/l gluc	3 g/l gluc
6	12% Medio 4 16X	12% Medio 4 16X	17% Medio 5	17% Medio 4 16X	29% Medio 5	29% Medio 5
7		4 mM gln				
8						
9		2,5 g/l gluc				
10	10% Medio 4 16X	10% Medio 4 16X	8% Medio 5	5% Medio 4 16X		
11		1 g/l gluc				
12						
13		1 g/l gluc				

Resultados y conclusiones

En cada experimento, la densidad celular es similar, como se muestra en la Figura 14. Las densidades celulares son bajas en los experimentos de Glutamina 2 y Glutamato 2, debido a una desviación del pH a aproximadamente 6,7 en el 3^{er} día del proceso. La caída en la densidad entre el 6° y el 7° día en los experimentos de Glutamina 3 y Glutamato 3 es debida a la alimentación del medio de 29% en el 6° día.

La Figura 15 muestra la viabilidad celular de los cultivos alimentados con glutamato y glutamina. Las viabilidades siguieron siendo elevadas durante la segunda mitad del proceso en los biorreactores que contienen cultivos alimentados con glutamato.

En el Experimento 1, el título de anti-Lewis Y es similar entre los cultivos alimentados con glutamato y con glutamina. La Figura 16 muestra que, en los Experimentos 2 y 3, los títulos de anti-Lewis Y son menores en los reactores alimentados con glutamina. El menor título de anti-Lewis Y observado en estos reactores podría ser debido a los elevados niveles de lactato producidos, como se muestra en la Figura 17.

Los biorreactores que se hicieron funcionar con glutamato en el medio de alimentación tienen una menor concentración de amonio (Figura 18) y una menor osmolaridad (Figura 19).

El ensayo de unión de ELISA se usó para ensayar la actividad de muestras procedentes de los experimentos de Glutamina 1 y Glutamato 1. Las actividades fueron similares: 110% de referencia para la muestra de Glutamina 1, y 122% de referencia para la muestra de Glutamato 1 (datos no mostrados).

La sustitución de glutamina por glutamato en estos experimentos no tiene un efecto significativo sobre la densidad celular. Sin embargo, la viabilidad celular es menor en los biorreactores alimentados con glutamina. El amonio, el lactato y la osmolaridad son menores en los biorreactores alimentados con glutamato, en comparación con los alimentados con glutamina. De media, el título de anti-Lewis Y es mayor en los biorreactores alimentados con glutamato, y la actividad es esencialmente la misma en ambas condiciones.

Ejemplo 6

Sustitución de glucosa y glutamina en el proceso de cultivo de células anti-Lewis Y

5 El fin de este experimento fue ensayar los efectos de la sustitución de glucosa y glutamina con el medio de alimentación enumerado en la Tabla 11 a continuación, en el cultivo de células anti-Lewis Y (véase Bogheart *et al.*, Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts, Clin. Can. Res. 10:4538-49 (2004)). Se midieron la densidad celular, la viabilidad celular, el título de anti-Lewis Y y los niveles de amonio.

Materiales y métodos

15 El experimento se llevó a cabo en matraces de agitación de 250 ml con un volumen de partida de 75 ml. Todos los matraces de agitación se sembraron a $0,25 \times 10^6$ células/ml en Medio 2. Los matraces se incubaron a 37°C en una incubadora con CO₂ al 7%, durante 14 días. En el 3^{er} y 4^o día, los matraces se alimentaron con 5% en volumen de medio de alimentación Medio 6. En la Tabla 11 se enumera la composición del Medio 6. En los días 5-13, los matraces se alimentaron con 5% en volumen de una de las disoluciones de alimentación enumeradas en la Tabla 12. Cada condición se llevó a cabo por duplicado. Se tomaron diariamente muestras para recuentos celulares mediante CEDEX y ensayos para amonio, glucosa, y lactato.

TABLA 11

Composición de Medio 6

Aminoácidos	mg/l	mM	Oligoelementos	µg/l	nM
alanina	142,48	1,60	Selenito de sodio	40,00	231,35
arginina	1528,84	8,79	CuSO ₄	3,44	21,51
asparagina•H ₂ O	1080,60	7,20	CuSO ₄ •5H ₂ O	7,49	30,00
ácido aspártico	532,40	4,00	FeSO ₄ •7H ₂ O	2534	9115
cisteína•2HCl	473,00	1,51	ZnSO ₄ •7H ₂ O	2704	9421
ácido glutámico	235,38	1,60	MnSO ₄ •H ₂ O	0,17	1,01
glutamina	4820,00	33,01	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140	492,84
glicina	120,07	1,60	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,24	1,00
histidina•HCl•H ₂ O	588,32	2,80	NH ₄ VO ₃	0,65	5,56
isoleucina	944,52	7,21	NiSO ₄ •6H ₂ O	0,13	0,49
leucina	1360,75	10,39	SnCl ₂ •2H ₂ O	0,12	0,53
lisina•HCl	1456,80	8,00	AlCl ₃ •6H ₂ O	1,20	4,97
metionina	477,06	3,20	AgNO ₃	0,17	1,00
fenilalanina	660,36	4,00	Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	2,55	9,98
prolina	552,31	4,80	KBr	0,12	1,01
serina	1264,70	12,04	CdCl ₂ •2,5H ₂ O	2,28	9,99

Aminoácidos	mg/l	mM	Oligoelementos	µg/l	nM
treonina	762,02	6,40	CoCl ₂ •6H ₂ O	2,38	10,00
triptófano	260,94	1,28	CrCl ₃	0,32	2,02
tirosina•2Na•2H ₂ O	832,62	3,19	NaF	4,20	100,02
valina	749,21	6,40	GeO ₂	0,53	5,07
			KI	0,17	1,02
Vitaminas	mg/l	mM	RbCl	1,21	10,01
biotina	3,28	0,01	ZrOCl ₂ •8H ₂ O	3,22	9,99
pantotenato de calcio	36,02	0,08			
cloruro de colina	143,28	1,03	Otros componentes	µg/l	nM
ácido fólico	42,43	0,10	Hidrocortisona	288	0,79
inositol	201,71	1,12	Putresceina•2HCl	8000	49,66
nicotinamida	32,02	0,26	ácido linoleico	336,25	1,20
piridoxina•HCl	32,82	0,16	ácido tióctico	840,63	4,08
riboflavin	3,60	0,01			
tiamina•HCl	35,22	0,10	Otros componentes	mg/l	mM
vitamina B12	11,21	0,01	D-glucosa (Dextrosa)	33005,99	183,37
			PVA	2400,00	
Sales inorgánicas	mg/l	mM	Nucellin™	80,00	
KH ₂ PO ₄	1635,00	12,02			
MgSO ₄ •7H ₂ O	171,98	0,70			

TABLA 12

Alimentaciones en los días 5-13. El Medio 6 modificado no contiene glucosa ni glutamina

GluGln	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa+4,82 g/l glutamina (control)
Glu	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 4,82 g/l glutamato
GluAsp	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 4,36 g/l asparagina
GluGlyGln	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 6,71 g/l glicilglutamina
GluGlu	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 4,82 g/l glutamina
GalGlu	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 4,82 g/l glutamato
GalGln	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 4,36 g/l asparagina
GalGlyGln	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 6,71 g/l glicilglutamina
GalAsp	Medio 6 + 43 g/l glucosa

Resultados y conclusiones

La mayor densidad celular se observó cuando se sustituyó glutamina por glutamato o glicilglutamina en presencia de glucosa o galactosa en el medio de alimentación. La densidad celular fue generalmente menor en los cultivos alimentados con glucosa/glutamina, galactosa/glutamina, o glucosa solamente (Figura 20). La viabilidad final fue más elevada en los cultivos alimentados con glucosa solamente, seguido de los cultivos alimentados con glucosa/glutamato. La viabilidad más baja se observó en los cultivos alimentados con glutamina o asparagina combinadas con glucosa o con galactosa (Figura 21).

El título en el día 14 fue más elevado en los cultivos alimentados con glucosa/glicilglutamina y glucosa/glutamato, a alrededor de 700 µg/ml. El título fue más bajo en los cultivos alimentados con galactosa/glicilglutamina y galactosa/asparagina, a aproximadamente 500 µg/ml. El título en el control de glucosa/glutamina fue de aproximadamente µg/ml (Figura 22).

Los menores niveles de amonio se observaron en los matraces alimentados con glucosa/glutamato o glucosa solamente. Los matraces alimentados con galactosa/glutamato, glucosa/glutamina, glucosa/glicilglutamina, y glucosa/asparagina mostraron niveles intermedios de amonio. Los matraces alimentados con galactosa/asparagina, galactosa/glicilglutamina y galactosa/glutamina tuvieron los niveles más elevados de amonio (Figura 23).

Los niveles de glucosa siguieron estando por encima de 1 g/l en todos los matraces alimentados con galactosa hasta el día 11. Desde el día 11 hasta el día 14, la glucosa en estos cultivos nunca se agotó completamente, permaneciendo entre 0,6 y 1 g/l, sin diferencia significativa entre los diferentes cultivos.

ES 2 341 390 T3

Los niveles de glucosa aumentaron en todos los matraces alimentados con glucosa o glucosa combinada con otro sustrato, hasta el día 10. Desde el día 10 hasta el día 14, en estos cultivos, los niveles de glucosa permanecieron bastante constantes y similares entre sí. En el día 14, en los cultivos alimentados con glucosa/glutamato, la glucosa se mantuvo a aproximadamente 8,4 g/l, y en los cultivos alimentados con glucosa solamente la glucosa se mantuvo a aproximadamente 10,8 g/l.

Los niveles de lactato alcanzaron un máximo de alrededor de 2,4 g/l en el día 5, cuando las condiciones fueron las mismas para todas las células, y cayeron a esencialmente cero en todos los cultivos en el día 14. Los niveles de lactato fueron más elevados desde el día 10 hasta el día 14 en el control de glucosa/glutamina, pero estuvieron por debajo de 1 g/l durante este tiempo (datos no mostrados).

Todas las condiciones ensayadas en este experimento dieron como resultado una densidad celular mayor que la condición de control de glucosa/glutamina. Todas las condiciones ensayadas, excepto la condición de galactosa/asparagina, dieron como resultado una viabilidad final mayor que la condición de control de glucosa/glutamina o la condición alimentada con galactosa/glutamina. El título en el control de glucosa/glutamina fue alrededor de 570 µg/ml en comparación con un máximo de alrededor de 700 µg/ml en la condición alimentada con glucosa/glicilglutamina y en la condición alimentada con glucosa/glutamato.

Ejemplo 7

Evaluación de un proceso discontinuo desprovisto de glutamina para la producción de anti-GDF-8

Los métodos de producción discontinua alimentada típicos requieren múltiples alimentaciones a lo largo del período de cultivo. Estas alimentaciones se diseñan para sustituir los nutrientes en el medio que pueden haber sido agotados por las células o se pueden haber degradado durante el proceso discontinuo. Estas alimentaciones crean complicaciones cuando el proceso se aumenta de tamaño para ser usado en reactores más grandes, tales como la necesidad de una bomba agitadora (véase la Figura 24). Además, las alimentaciones diluyen la cantidad de anti-GDF-8 ya segregada en el cultivo, y por lo tanto afectan al título de la cosecha. El uso de un proceso discontinuo permitiría la inoculación del biorreactor a volumen completo, en lugar de a un volumen parcial, para adaptar las alimentaciones, lo que eliminaría la necesidad de una bomba agitadora y reduciría enormemente cualquier efecto de la dilución sobre la productividad.

La glutamina es una de las razones más importantes de que se use el enfoque discontinuo alimentado, puesto que no es estable a 37°C y se ha pensado que es necesario reponerla durante un cultivo discontinuo. Sin embargo, los resultados de los Ejemplos 2, 5 y 6, en los que se ensayó la estrategia de privación de glutamina, mostraron un incremento significativo en la productividad en comparación con un reactor de control que se alimentó con glutamina. Este resultado se combinó con el proceso discontinuo para crear un proceso discontinuo desprovisto de glutamina que se ensayó en este Ejemplo.

Materiales y métodos

Se hicieron crecer células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 l durante 12 días según las siguientes cuatro condiciones de crecimiento. Los parámetros de los biorreactores se mantuvieron iguales para todas las condiciones. El oxígeno disuelto se mantuvo a una cantidad no menor que 25% de saturación de aire pulverizando con aire, y el pH se mantuvo a 7,00 mediante adición de una disolución que contiene bicarbonato sódico a 0,58 M y carbonato sódico a 0,71 M. La temperatura de todos los cultivos se mantuvo a 37°C durante los primeros cuatro días del lote. En el cuarto día del lote, la temperatura de todos los biorreactores se redujo hasta 31°C, y se mantuvo en este punto durante el resto del proceso discontinuo. Los cultivos de control y discontinuo alimentado se alimentaron con 8%, 12%, y 8% del volumen total del reactor de sus medios de alimentación respectivos en los días 5, 7 y 10, respectivamente.

1) Control.

- Medio de inoculación Medio 7 (véase la Tabla 13).
- Medio 8 de alimentación, alimentado en los días 5°, 7° y 10° (véase la Tabla 13).
- Alimentación 5 mM de glutamina en el 4° día.
- Reducción de la temperatura hasta 31°C en el 4° día.

2) Privación de glutamina en discontinuo alimentado.

- Medio de inoculación Medio 7 con solamente 4 mM de glutamina (véase la Tabla 13).
- Medio 8 de alimentación sin glutamina, alimentado en los días 5°, 7° y 10° (véase la Tabla 13).
- Sin alimentación de glutamina en el 4° día.
- Reducción de la temperatura hasta 31°C en el 4° día.

ES 2 341 390 T3

3) Privación de glutamina de discontinuo.

- Medio de inoculación nuevo medio discontinuo con solamente 4 mM de glutamina (véase la Tabla 13).
- Ningún medio de alimentación.
- Sin alimentación de glutamina.
- Reducción de la temperatura hasta 31°C en el 4º día.
- Añadir 5 g/l de glucosa en el 8º día.

4) Privación de glutamina de discontinuo suplementado en el 8º día.

- Medio de inoculación nuevo medio discontinuo con solamente 4 mM de glutamina (véase la Tabla 13).
- Sin medio de alimentación.
- Sin alimentación de glutamina.
- Reducción de la temperatura hasta 31°C en el 4º día.
- Añadir 4 g de glucosa, 375 mg de asparagina, 3 ml de lote 1 mM de FeSO₄, 3,33 ml de lote de 5 g/l de Nucellin™, 2,57 ml de hidrocortisona 36 mg/ml y disolución madre 1,0 g/l de putrescina, 0,23 ml de lote de 50 mg/l de selenito de sodio, y 13,1 mg de tiamina en el 8º día.

TABLA 13

Composiciones de los medios usados

	Pm	Medio 7	Medio 8	Medio discontinuo
Aminoácidos		mM	mM	mM
L-Alanina	89,0	1,08	2,4	0,2
L-Arginina	174,0	6,84	13,2	4
L-Asparagina•H ₂ O	150,0	4,76	21,4	7,5
L-Ácido aspártico	133,0	2,40	6	1,65
L-Cisteína•HCl•H ₂ O	176,0	0,40	0	0,4
L-Cystine•2HCl	313	0,95	1,875	1
L-Ácido glutámico	147,0	1,08	2,4	1,08
L-Glutamina	146,0	13,00	37,5	4
Glicina	75,0	1,28	2,4	1,54
L-Histidina•HCl•H ₂ O	210,0	1,76	4,2	1,76
L-isoleucina	131,0	4,76	10,8	2,83
L-leucina	131,0	6,52	15,6	4,7
Lisina•HCl	182,0	5,20	12	5,2
L-Metionina	149,0	1,96	4,8	2,6
L-Fenilalanina	165,0	2,60	6	2,2
L-prolina	115,0	3,24	7,2	4,1
L-serina	105,0	8,60	18	8,6
L-treonina	119,0	4,32	9,6	3,2
L-triptófano	204,0	0,78	1,92	1,04
L-tirosina 2Na•2H ₂ O	281,0	2,18	4,8	1,75
L-valina	117,0	4,32	9,6	4
Vitaminas		uM	uM	uM
Biotina	244,0	8,31	20,4	11
D-pantotenato de calcio	476,0	46,06	112,8	46,06
Cloruro de colina	139,0	632,2	1548	840
ácido fólico	441,0	58,8	144	58,8
1-inositol	180,0	686	1680	911

ES 2 341 390 T3

	Pm	Medio 7	Medio 8	Medio discontinuo
nicotinamida	122,0	161,7	396	215
piridoxina•HCl	206,0	88,15	240	88
piridoxal•HCl	203,0	10	0	10
riboflavina	376,0	5,37	13,2	1,1
tiamina•HCl	337,0	63,7	274,7	117
vitamina B12	1355,0	4,9	12	7,8
Sales inorgánicas				
NaCl	58,5	18,8 mM		
KCl	74,6	4,2 mM		4,19 mM
CaCl ₂	111	1,05 mM		1,05 mM
Selenito de sodio	173	27 ug/l	60 ug/l	60 ug/l
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	142	4,68 mM	11 mM	4,68 mM
Na ₂ HPO ₄	138	0,5 mM		0,3986 mM
MgSO ₄	120	1,15 mM	1,05 mM	1,15 mM
MgCl ₂	95	0,3 mM		0,3 mM
FeSO ₄ •7H ₂ O	278	9 uM	24,675 uM	9 uM
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	404	0,125 uM		0,124 uM
ZnSO ₄ •7H ₂ O	287	9,2 uM	17 uM	9,2 urn
CuSO ₄	160	0,05 uM	0,074 uM	0,064 uM
NaHCO ₃	84	23,8 mM		23,8 mM
Otros				
Glucosa	180	16 g/l	38,3 g/l	15 g/l
Alcohol polivinílico		2,56 g/l	2,4g/l	2,56 g/l
Hidrocortisona	363	0,23 mg/l	0,43 mg/l	0,28 mg/l
Putrescina•2HCl	161	6,4 mg/l	12 mg/l	7,7 mg/l
Piruvato de sodio	110	500 uM		500 uM
ácido linoleico	280	0,81 uM	1,8 uM	0,81 uM
ácido tiotico	206	2,7 uM	6 uM	2,7 uM
Nucellin TM		54 mg/l	120 mg/l	50 mg/l
1000x Oligo B		1,5 ml/l	6,75 ml/l	1,5 ml/l

Resultados y conclusiones

El crecimiento celular durante los primeros 4 días fue similar para los procesos de control y discontinuo, mientras que el proceso discontinuo alimentado desprovisto de glutamina tuvo una densidad celular ligeramente menor y siguió siendo un poco más baja durante el resto del proceso discontinuo. Ambos procesos discontinuos mantuvieron mayores densidades celulares durante todo el proceso discontinuo, probablemente debido a la falta de cualquier dilución significativa (véase la Figura 25). Las viabilidades de todos los cultivos fueron las mismas hasta el 8º día. Sin embargo, es interesante señalar que en el 11º día la viabilidad del proceso discontinuo que no se suplementó fue menor que en los otros tres biorreactores, y terminó siendo significativamente menor al final del día. Esto sugiere que el medio discontinuo todavía se podría optimizar, puesto que el proceso discontinuo suplementado tuvo una viabilidad que fue la misma que la de los biorreactores discontinuos alimentados (véase la Figura 26).

Los cultivos celulares en el proceso discontinuo desprovisto de glutamina o en el proceso discontinuo alimentado desprovisto de glutamina superan en productividad a las mismas células cultivadas en el proceso discontinuo alimentado de control. El proceso discontinuo alimentado de control tuvo un título por día de cosecha de 685 µg/ml, como se esperaba, mientras que el proceso discontinuo alimentado desprovisto de glutamina tuvo un título de cosecha de 1080 µg/ml, alrededor de 58% mayor que el control. Esto es similar a los resultados observados previamente. El proceso discontinuo no suplementado desprovisto de glutamina tuvo un título por día de cosecha de 960 µg/ml, un 40% mayor

que el control, similar al proceso discontinuo alimentado desprovisto de glutamina, mientras que el proceso discontinuo desprovisto de glutamina suplementado tuvo el título más elevado, a 1296 $\mu\text{g/ml}$. Esto es un incremento de 89% con respecto al control (véase la Figura 27).

Cuando se analizaron los niveles de inhibidor para las cuatro condiciones, los resultados mostraron que los niveles de lactato y amonio para los tres procesos desprovistos de glutamina fueron significativamente menores que los del control. De hecho, después del 4° día, esas tres condiciones detuvieron la producción o comenzaron a consumir lactato, mientras que el control continuó produciendo lactato durante el proceso discontinuo (véase la Figura 28). Como se esperaba, los niveles de amonio fueron mucho menores en los procesos desprovistos de glutamina, y disminuyeron después del 4° día, mientras que el control continuó produciendo amonio (véase la Figura 29).

En este Ejemplo, la combinación de un proceso discontinuo con una estrategia de privación de glutamina dio como resultado una mejora del 40% en la productividad con respecto al proceso discontinuo alimentado de control para células anti-GDF-8. Los datos también sugieren que, con alguna optimización del medio discontinuo, se puede lograr una mejora de casi 2 veces en la productividad. Esta mejora en la productividad se puede atribuir a dos factores. En primer lugar, la privación de glutamina aumenta la productividad directamente o manteniendo muy bajos los niveles de amonio y lactato. En segundo lugar, debido a la ausencia de alimentaciones, el título no se diluye durante el proceso discontinuo. El aumento de la productividad, junto con la facilidad de operación inherente a un proceso discontinuo, hace a esto una opción atractiva para producir polipéptidos recombinantes.

Ejemplo 8

Efectos de concentraciones de glutamina y asparagina en medio discontinuo en un proceso de cultivo de células anti-GDF-8

En los Ejemplos 2, 5 y 6, se demostró que la privación de glutamina confería beneficios a los cultivos discontinuos alimentados en dos estirpes celulares, incluyendo el aumento del crecimiento celular, la viabilidad celular y el título, así como una disminución de la producción de lactato y amonio. La asparagina parece que también desempeña un papel en los medios discontinuos.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 durante doce días en biorreactores de 1 l en Medio 9 modificado, con diferentes concentraciones de glutamina y asparagina. En la Tabla 14 se enumera la composición base del Medio 9. En la Tabla 15 se enumeran las variaciones experimentales en esta composición base. Los cultivos se incubaron a 37°C durante los 5 primeros días, con la excepción del Reactor 4, cuya temperatura fue 30°C durante el primer día debido a problemas de control de la temperatura. Los cultivos se cambiaron a 31°C en el 6° día. En el 7° día, los cultivos se alimentaron una vez con 5% en volumen de Medio 5 que carece de glutamina. Los cultivos se midieron diariamente para determinar la densidad celular, el título de anti-GDF-8, los niveles de lactato y de amonio.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 341 390 T3

TABLA 14

Composición del Medio 9

Aminoácidos	mg/l	mM	Oligoelementos	µg/l	nM
Alanina	17,80	0,20	Selenito de sodio	69,16	400,00
Arginina	696,00	4,00	Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	50,00	123,76
asparagina•H ₂ O	3000,00	20,00	CuSO ₄	10,24	64,00
ácido aspártico	219,45	1,65	CuSO ₄ •5H ₂ O	99,88	400,00
cisteína•HCl•H ₂ O	70,40	0,40	FeSO ₄ •7H ₂ O	4170	15000
cisteína•2HCl	468,75	1,50	ZnSO ₄ •7H ₂ O	2640	9200
Glutamato monosódico	33,80	0,20	MnSO ₄ •H ₂ O	33,80	200,00
Glutamina	584,00	4,00	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	284,07	1000
Glicina	115,50	1,54	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	247,20	200,00
histidina•HCl•H ₂ O	474,60	2,26	NH ₄ VO ₃	2,34	20,00
Isoleucina	570,73	4,36	NiSO ₄ •6H ₂ O	5,26	20,00
Leucina	1030,70	7,87	SnCl ₂ •2H ₂ O	0,90	4,00
lisina•HCl	1401,40	7,70	AlCl ₃ •6H ₂ O	0,97	4,00
Metionina	387,40	2,60	KBr	0,48	4,00
Fenilalanina	507,00	3,07	CrCl ₃	15,83	100,00
Prolina	539,50	4,69	NaF	0,17	4,00
Serina	1052,00	10,02	GeO ₂	0,42	4,00
Treonina	56,80	4,75	KI	33,20	200,00
Triptófano	274,16	1,34	RbCl	0,48	4,00
tirosina•2Na•2H ₂ O	745,75	2,86	H ₃ BO ₃	12,37	200,00
Valina	749,00	6,40	LiCl	0,17	4,00
Vitaminas	mg/l	mM	Otros componentes	µg/l	nM
Biotina	2,68	0,01	Hidrocortisona	540,00	1,49
pantotenato de calcio	21,92	0,05	Putrescina•2HCl	15000	93,11
cloruro de colina	158,46	1,14	ácido linoleico	290,00	1,04
ácido fólico	25,93	0,06	ácido tióctico	716,00	3,48
Inositol	163,98	0,91			
Nicotinamida	26,23	0,22	Otros componentes	mg/l	mM
piridoxal•HCl	2,03	0,01	D-glucosa (Dextrosa)	15000,00	83,33
piridoxina•HCl	36,13	0,18	PVA	2560,00	
Riboflavina	2,41	0,01	Nucellin™	50,00	

Aminoácidos	mg/l	mM	Oligoelementos	µg/l	nM
tiamina•HCl	39,43	0,12	Piruvato de sodio	55,00	0,50
vitamina B12	21,17	0,02			
Sales inorgánicas	mg/l	mM			
CaCl ₂	116,55	1,05			
KCl	312,90	4,19			
Na ₂ HPO ₄	56,60	0,40			
NaCl	1100,00	18,80			
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	645,84	4,68			
MgSO ₄	138,00	1,15			
MgCl ₂	28,50	0,30			
NaHCO ₃	2000,00	23,81			

TABLA 15

Condiciones de glutamina y asparagina ensayadas

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Estirpe celular	anti-GDF-8					
Medio	Medio discontinuo (Medio 9)					
Niveles de glutamina	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Niveles de asparagina	8 mM	12 mM	20 mM	8 mM	12 mM	20 mM
Densidad de siembra (x10 ⁶ /ml)	0,3 a 0,35					
Medio de alimentación	Medio 5-Glutamina, 5% en el 7º día					
Días de cultivo	12					
Cambio de temperatura (37-31 °C)	Día 6	Día 6	Día 6	Día 5	Día 5	Día 4

Resultados y conclusiones

Las Figuras 30, 31, 32 y 33 muestran el crecimiento celular de células anti-GDF-8, el título de anti-GDF-8, los niveles de lactato y niveles de amonio, respectivamente, durante todos los experimentos en las diversas condiciones experimentales.

En todas las condiciones experimentales, 4 mM de glutamina es mejor que 1 mM de glutamina a todos los niveles de asparagina ensayados. A niveles comparables de glutamina, las condiciones de asparagina 12 mM y 20 mM son mejores que las condiciones de asparagina 8 mM. Se observó una disminución de los niveles de lactato y NH₄ al final del cultivo para todas las condiciones ensayadas.

Ejemplo 9

Efectos de las concentraciones de glutamina y asparagina en medio discontinuo en un proceso de cultivo de células anti-GDF-8

En el Ejemplo 8, se demostró que el Medio 9 que contiene una concentración inicial de glutamina 4 mM se comporta mejor que el medio que contiene 1 mM de glutamina, independientemente de los niveles de asparagina. Este ejemplo demuestra el efecto del medio que contiene niveles de glutamina de 13 mM y diversos niveles de asparagina.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 durante doce días en biorreactores de 1 l en Medio 9 modificado, con concentraciones diferentes de glutamina y asparagina como se enumeran en la Tabla 16. Los cultivos se incubaron a 37°C durante los primeros 3 días. Los cultivos se cambiaron entonces a 31°C en el 4º día. En el 7º día, los cultivos se alimentaron de una vez con 5% en volumen de Medio 5 que carece de glutamina. Los cultivos se midieron periódicamente para determinar la densidad celular, la viabilidad celular, los niveles de lactato y amonio y los niveles de glutamina, el título de anti-GDF-8, y la osmolaridad.

TABLA 16

Condiciones de glutamina y asparagina ensayadas

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Estirpe celular	anti-GDF-8					
Medio	Medio discontinuo (Medio 9)					
Niveles de glutamina	4 mM	4 mM	13 mM	13 mM	13 mM	13 mM
Niveles de asparagina	20 mM	20 mM	20 mM	12 mM	12 mM	8 mM
Densidad de siembra (x10 ⁶ /ml)	0,3 a 0,35					
Medio de alimentación	Medio 5 que carece de glutamina, 5% en el 7º día					
Días de cultivo	12					
Cambio de temperatura (37-31 °C)	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4

Resultados y conclusiones

Las Figuras 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 muestran el crecimiento celular de células anti-GDF-8, el porcentaje de viabilidad de células anti-GDF-8, los niveles de lactato, los niveles de amonio, los niveles de glutamina, el título de anti-GDF-8, y la osmolaridad, respectivamente, durante todos los experimentos en las diversas condiciones experimentales.

Entre todas las condiciones ensayadas, sólo el Medio 9, que contiene 13 mM de glutamina y 20 mM de asparagina, mostró efectos adversos significativos sobre el crecimiento celular y el título. La glutamina se agotó en todos los cultivos a aproximadamente el mismo tiempo, independientemente de si el cultivo empieza con 4 mM o 13 mM de glutamina. El título más elevado de anti-GDF-8 se obtiene en cultivos que contienen 13 mM de glutamina y 12 mM de asparagina. Todas las condiciones de cultivo muestran niveles reducidos de lactato y amonio cerca del final del cultivo. Los niveles de amonio fueron los más elevados en el cultivo que contiene 13 mM de glutamina y 20 mM de asparagina.

Ejemplo 10

El efecto de los niveles de asparagina y cisteína sobre la disminución observada en los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

En los Ejemplos 2, 5 y 6, se encontró que los cultivos que se hicieron crecer en condiciones de privación de glutamina mostraron una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Sin embargo, los cultivos que se hicieron crecer en Medio 9 en condiciones sin privación de glutamina todavía muestran niveles reducidos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Este efecto no se observó en otros medios tales como el Medio 1, en el que la privación de glutamina parece necesaria para la disminución de los niveles de lactato y amonio. El Medio 9 y el Medio 1 difieren en los niveles de asparagina (20 mM en Medio 9 frente a 11 mM total en Medio 1 más alimentación) y cisteína ácida (1,5 mM en Medio 9 frente a 0,95 mM en Medio 1). Este ejemplo ensaya si estos dos componentes fueron responsables de la disminución observada en los niveles de lactato y amonio al final del cultivo.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 l durante 12 días. Las células se cultivaron inicialmente a 37°C, y se cambiaron a 31°C en el 4º día o en el 5º día a 8-10 x 10⁶/ml. La Tabla 17 enumera las diversas condiciones experimentales ensayadas. Se tomaron diariamente muestras y se guardaron para el análisis de los títulos mediante HPLC de Proteína A.

TABLA 17

Condiciones de asparagina y cisteína ensayadas

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Gln Total (mM)	Asn Total (mM)	Alimentación	
Medio 1	13	5	29	11	Medio 5. 30% total	5 mM Gln, 4º Día
Medio 1	4	5	4	11	Medio 5-Gln, 30% total	
Medio discontinuo (Medio 9)	4	20	4	21	Medio 5-Gln, 5% 7º día	
Medio 1+5 mM Asn + 0,5 mM Cisteína	13	10	29	16	Medio 5. 30% total	5 mM Gln, 4º día
Medio discontinuo (Medio 9)	13	20	29	21	Medio 5, 30% total	5 mM Gln, 4º día

Nota: Medio 5-Gln = Medio 5 que carece de glutamina.

Resultados y conclusiones

Se hicieron crecer células anti-GDF-8 en Medio 9 que muestra niveles reducidos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo, independientemente de si los cultivos se empezaron con 4 mM o 13 mM de glutamina (véanse las Figuras 42 y 43). Por el contrario, el Medio 1 sólo mostró niveles reducidos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo cuando los cultivos empezaron con 4 mM de glutamina (véanse las Figuras 42 y 43). La adición de asparagina y cisteína extra al Medio 1 que contiene 13 mM de glutamina no dio como resultado una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (véanse las Figuras 42 y 43).

También se observó que los cultivos que muestran niveles reducidos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (Medio 1 con 4 mM de glutamina, Medio 9 con 4 mM de glutamina, y Medio 9 con 13 mM de glutamina) tienen una menor osmoralidad total al final del proceso de cultivo (véase la Figura 47).

El Medio 9, con 4 mM de glutamina, mostró el título más elevado de anti-GDF-8, seguido del Medio 9 con 13 mM de glutamina alimentada el 4º día (véase la Figura 46). Teniendo en cuenta el efecto de la dilución de la alimentación, el Medio 9 que contiene 4 mM de glutamina tuvo un título de anti-GDF-8 equivalente al Medio 9 que contiene 13 mM de glutamina.

Ejemplo 11

El efecto de los niveles de aminoácidos y vitaminas sobre la disminución observada en los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

El Ejemplo 10 ensayó si la diferencia en los niveles de asparagina y cisteína entre el Medio 1 y el Medio 9 fue la responsable de la disminución observada en los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo en el Medio 9 que no estaba privado de glutamina. Se determinó que estos factores no fueron responsables de la disminución observada. El Medio 1 y el Medio 9 también difieren en sus concentraciones de aminoácidos y vitaminas. Este ejemplo ensaya si las diferencias en las concentraciones de aminoácidos y vitaminas entre estos dos medios son responsables de la disminución observada.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 l durante 12 días. Las células se cultivaron inicialmente a 37°C, y se cambiaron a 31°C en el 4º día a $8-10 \times 10^6$ /ml. La Tabla 18 enumera las diversas condiciones experimentales ensayadas. Se añadieron aminoácidos, vitaminas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E (composición enumerada en la Tabla 19) y hierro a las diversas condiciones experimentales del Medio 1, de forma que los niveles de estos componentes fueron iguales a los niveles en el Medio 9. Se tomaron diariamente muestras y se guardaron para el análisis de los títulos mediante HPLC de Proteína A.

ES 2 341 390 T3

TABLA 18

Condiciones de aminoácidos y vitaminas ensayadas

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Alimentación	Día 5	Día 7	Día 10	Día 11
Medio 1	13	5	Medio 5 30% total 5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5	Medio 5
Medio 1 +AA	13	15	Medio 5 30% total 5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5	Medio 5
Medio 1+Vit,H/P, E,Fe	13	5	Medio 5 30% total 5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5	4g/l glucosa
Medio 1 + todo	13	15	Medio 5 30% total 5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5	4g/l glucosa
Medio 9 con 13 mM Gln	13	20	Medio 5 30% total 5 mM Gln, día 4	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio 5	

Nota: AA = Aminoácidos, H/P: = 0,036 mg/ml Hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina•2HCl, E: Oligoelementos E.

TABLA 19

Composición de oligoelementos E

Oligoelementos	µg/l	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	123,60	100,00
AlCl ₃ •6H ₂ O	0,48	2,00
H ₃ BO ₃	6,18	100,00
CrCl ₃	7,92	50,00
CuSO ₄ •5H ₂ O	49,94	200,00
GeO ₂	0,21	2,00
KBr	0,24	2,00
KI	16,60	100,00
LiCl	0,08	2,00
MnSO ₄ •H ₂ O	16,90	100,00
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	142,03	500,00
NaF	0,08	2,00
NH ₄ VO ₃	1,17	10,00
NiSO ₄ •6H ₂ O	2,63	10,00
RbCl	0,24	2,00
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,45	2,00
Selenito de sodio	34,58	200,00

Resultados y conclusiones

Todas las condiciones ensayadas mostraron niveles reducidos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo, excepto para el Medio 1 que contiene aminoácidos añadidos, indicando que el aumento de los niveles de aminoácidos en el Medio 9 en comparación con el Medio 1 no es probablemente responsable de la disminución de los niveles de lactato y amonio (véanse las Figuras 49 y 50). Sin embargo, el Medio 1 que contiene vitaminas añadidas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E y hierro mostró menores niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo en comparación con el Medio 1 que contiene aminoácidos añadidos (véanse las Figuras 49 y 50). Esto indica que estos componentes pueden ser responsables de las disminuciones observadas en el Medio 9.

Los cultivos que se hicieron crecer en Medio 1 que contiene vitaminas añadidas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E y hierro mostraron los niveles más bajos de amonio a lo largo del experimento debido a las menores cantidades totales de asparagina y glutamina en el medio de partida (véase la Figura 50).

Ejemplo 12

El efecto de los niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro sobre la disminución observada en los niveles de amonio y lactato en células anti-GDF-8 cultivadas en medio 9

En el Ejemplo 11, se determinó que el aumento de los niveles de vitaminas, hidrocortisona y putrescina, oligoelementos E y hierro en el Medio 9, con relación al Medio 1, puede ser el responsable de la disminución de los niveles de lactato y de amonio observada al final del proceso de cultivo. Aquí estos componentes se ensayaron individualmente y en combinación, para determinar cuáles son responsables, si lo son, de la disminución observada.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 l durante 12 días. Las células se cultivaron inicialmente a 37°C, y se cambiaron a 31°C en el 4º día a 8-10 x 10⁶ células/ml, con la excepción del Medio 1 que contiene oligoelementos E, que se cambiaron en el 4º día a alrededor de 6 x 10⁶ células/ml. La Tabla 20 enumera las diversas condiciones experimentales ensayadas. Se añadió hidrocortisona y putrescina a todas las condiciones del Medio 1, de forma que los niveles de estos componentes fueron iguales a los niveles en el Medio 9. Se añadieron vitaminas, oligoelementos E (composición enumerada en la Tabla 19) y hierro a las diversas condiciones experimentales del Medio 1, de forma que los niveles de estos componentes fueron iguales a los niveles en el Medio 9. Se tomaron diariamente muestras y se guardaron para el análisis de los títulos mediante HPLC de Proteína A.

ES 2 341 390 T3

TABLA 20

Condiciones de aminoácidos y vitaminas ensayadas

Media	Gln (mM)	Asn (mM)	Alimentación	Cambio de temp.	Día 4	Día 6	Día 7	Día 10
Medio 1+Fe	13	15	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio
Medio 1+E	13	15	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio
Medio 1+Vit	13	15	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio
Medio 1+Fe+E	13	15	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio
Medio 1+Fe+Vit	13	15	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio
Medio 1+E+Vit	13	15	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio
Medio 9 con 13 mM Gln	13	20	Medio 5 30% total	4º día	5 mM Gln, 4º día	8% Medio 5	12% Medio 5	8% Medio

Nota: E: Oligoelementos E.

Resultados y conclusiones

De las condiciones ensayadas, sólo el Medio 9 que contiene 13 mM de glutamina y el Medio 1 que contiene oligoelementos E mostraron niveles reducidos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (véanse las Figuras 54 y 55). Se debería observar que la disminución de los niveles observada para el Medio 1 que contiene oligoelementos E podría ser debida al hecho de que a este cultivo se le cambió la temperatura cuando las células fueron alrededor de 6×10^6 células/ml.

El Medio 9 que contiene 13 mM de glutamina mostró un título de anti-GDF-8 mayor que cualquiera de las formulaciones del Medio 1.

Ejemplo 13

Comparación de los Medios 1, 3 y 9 sobre el crecimiento celular y el título de anti-GDF-8

Este experimento se llevó a cabo para medir las diferencias en el crecimiento celular y en el título de anti-GDF-8 usando los Medios 1, 3 y 9.

Materiales y métodos

Se cultivaron células anti-GDF-8 en diversos medios y en condiciones de alimentación como se enumeran en la Tabla 21. En la Tabla 22 se enumera la información pertinente de los medios. Las células se hicieron crecer en biorreactores de 1 l durante 12 días, y se cambiaron de 37°C a 31°C en el 4º día.

ES 2 341 390 T3

TABLA 21

Condiciones de los medios y de alimentación ensayadas

Medio	Asn	Gln	Alimentación		Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11
			Día 3	Día 4					
Medio 3	14 mM	4 mM	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	10% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln
Medio 3	14 mM	4 mM	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	10% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln	3,3% Medio 5-Gln
Medio 1	14 mM	4 mM			8% Medio 6-Gln		12% Medio 5-G In	8% Medio 5-Gln	
Medio 9	20 mM	4 mM				5% Medio 6-Gln			

Nota: Medio 5-Gln - Medio 5 que carece de glutamina.

TABLA 22

Sumario de los medios

Medio	Asn	Gln	Alimentación	AA (Partida)/(Total)	Ion/Total AA
Medio 3	14mM	4 mM	34% Medio 5-Gln	34 mM / 84mM	1,75
Medio 9	20 mM	4 mM	5% Medio 5-Gln	91,4 mM / 94,3 mM	0,72
Medio 1	14 mM	4 mM	31,6% Medio 5-Gln	78 mM / 96,4 mM	0,74

Nota: Medio 5-Gln - Medio 5 que carece de glutamina.

Resultados y conclusiones

Las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9 mostraron la densidad celular y el título de anti-GDF-8 más elevados, mientras que las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 3 mostraron la densidad celular y el título de anti-GDF-8 más bajos (véanse las Figuras 57 y 58). El hecho de que el Medio 9 produzca resultados superiores al Medio 1 indica que es mejor proporcionar los componentes del medio en el medio de partida en lugar de suministrarlos a través de múltiples alimentaciones. Adicionalmente, el hecho de que tanto el Medio 1 como el Medio 9 se comporten mejor que el Medio 3 indica que proporcionar aminoácidos a concentraciones mayores que alrededor de 70 mM proporciona resultados superiores a proporcionar aminoácidos a concentraciones menores que alrededor de 70 mM. Finalmente, proporcionar aminoácidos a concentraciones mayores que alrededor de 70 mM en el medio de partida da como resultado las densidades celulares y los títulos más elevados (compárense el Medio 9 frente al Medio 1).

Ejemplo 14

Análisis estadístico de niveles totales óptimos de glutamina y asparagina en Medio 9 para cultivo de células anti-GDF-8 en biorreactores

Materiales y métodos

Se hicieron crecer células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 l, y se cambiaron de 37°C a 31°C en los días indicados en la Tabla 23. Los títulos finales se sometieron a una prueba de la T a fin de determinar el nivel óptimo de glutamina sola y el nivel óptimo de glutamina y asparagina combinadas totales. La Tabla 23 resume algunas condiciones experimentales relevantes y los resultados finales para las células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en Medio 9.

ES 2 341 390 T3

TABLA 23

Condiciones experimentales relevantes y resultados finales para células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en Medio 9

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Día Cambiado	Alimentación	Título (ug/ml)	Título/1200	Gln Total	Asn Total	Total
Medio 9	1	8	6	5% Medio 5-Gln	615,2	0,51	1	9	
Medio 9	1	8	6	5% Medio 5-Gln	857,1	0,71	4	9	
Medio 9	1	12	6	5% Medio 5-Gln	947	0,79	1	13	
Medio 9	4	12	4	5% Medio 5-Gln	1184	0,99	4	13	
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	769,6	0,64	1	21	
Medio 9	4	8	5	5% Medio 5-Gln	1262,6	1,05	13	9	
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	1198	1,00	4	21	
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	1321,1	1,10	4	21	
Medio 9	4	20	4	5% Medio 5-Gln	1162,4	0,97	4	21	

ES 2 341 390 T3

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Día Cambiado	Alimentación	Título (ug/ml)	Título/1200	Gln Total	Asn Total	Total
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1436,6	1,20	4	21	
Medio 9	4	12	4	5% Medio 5-Gln	1638,8	1,37	13	13	
Medio 9	13	12	4	5% Medio 5-Gln	1606,7	1,34	13	13	
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1075,91	0,90	13	21	
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1058,4	0,88	13	21	
Medio 9	13	20	4	5% Medio 5-Gln	1075,91	0,90	15	21	
Medio 9	13	5	4	Asn, Gln, 5% Medio 5-Gln	974,62	0,81	28,5	11	
Medio 9	13	20	4	Asn, Gln, 5% Medio 5-Gln	831,81	0,69	28,5	26	
Medio 9	13	20	4	Medio 5, 30% total, 5 mM Gln 4º día	975,4	0,81	28,5	26	
Medio 9	13	20	4	Medio 5, 30% total, 5 mM Gln 4º día	973,5	0,81	28,5	26	

Nota: Medio 5-Gln - Medio 5 que carece de glutamina.

ES 2 341 390 T3

Resultados y conclusiones

La Figura 59 muestra los títulos de anti-GDF-8 extrapolados para diversos niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina combinadas totales. La Tabla 24 muestra los resultados de una prueba T que compara el título normalizado de niveles de glutamina entre 2 y 15 mM y los niveles de glutamina fuera de este intervalo. La Tabla 25 muestra los resultados de una prueba de la T que compara el título normalizado de los niveles de glutamina y asparagina combinadas entre 16 y 36 mM y los niveles de glutamina y asparagina combinadas fuera de este intervalo.

Ambos resultados de la prueba de la T indicaron diferencias significativas en los títulos de anti-GDF-8 entre los dos grupos que se compararon. Los cultivos que se hicieron crecer en Medio 9 que contiene entre 2 y 15 mM de glutamina y entre 16 y 36 mM de glutamina y asparagina combinadas mostraron títulos de anti-GDF-8 mayores que los cultivos que se hicieron crecer en medios con niveles de glutamina y de glutamina y asparagina combinadas que caen fuera de estos intervalos. En todos los experimentos, los niveles de asparagina fueron mayores que 9 mM.

TABLA 24

Resultados de la prueba de la T que compara el título normalizado de las condiciones 2 mM<Gln<15 mM frente a Gln >15 mM, gln>2 mM

Título normalizado	Gln>15, Gln <2	2<Gln<15
Media	0,724649917	1,033147493
Varianza	0,013326655	0,036834109
Observaciones	7	12
Varianza reunida	0,028537361	
Diferencia media teorizada	0	
df	17	
t Stat	-3,839791986	
P(T<=t) una cola	0,000656219	
t Crítica una cola	1,739606432	
P(T<=t) dos colas	0,001312438	
t Crítica dos colas	2,109818524	

TABLA 25

Resultados de la prueba de la T que compara el título normalizado de condiciones de 16 mM<Gln+Asn<36 mM frente a Gln+Asn>36 mM, Gln+Asn<16 mM

Título normalizado	Asn+Gln>36, Asn+Gln<16	16<Asn+Gln<38
Media	0,735066584	1,027071104
Varianza	0,012061148	0,041504987
Observaciones	7	12
Varianza reunida	0,031113044	
Diferencia media teorizada	0	
df	17	
t Stat	-3,480816823	
P(T<=t) una cola	0,001430281	
t Crítica una cola	1,739606432	
P(T<=t) dos colas	0,002860561	
t Crítica dos colas	2,109818524	

Ejemplo 15

Efectos del medio sobre el cultivo celular

- 5 Este ejemplo investigó el comportamiento de tres variaciones del medio de cultivo celular a escala intermedia utilizando cultivos de siembra de alta densidad. Se espera que todos los medios ensayados muestren mejoras con respecto al medio de la Fase 1 (Medio 10 alimentado con medio de alimentación Medio 11), basándose en los datos de biorreactores a pequeña escala.

10

Materiales y métodos

- Células CHO que expresan un anticuerpo monoclonal anti-IgG1 del péptido ABeta humanizado ("células anti-ABeta") se ensayaron en diversos medios, como se muestra en la Tabla 26 (véase Basi *et al.*, Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide, documento WO02/46237). El punto de ajuste final bajo de pH fue 7,0 controlado con 0,95 M de Na_2CO_3 + 0,05 M de K_2CO_3 , excepto para la Fase 1, que se controló con una disolución que contiene bicarbonato de sodio a 0,58 M y carbonato de sodio a 0,71 M. El oxígeno disuelto se controló a 30% rociando aire según fuese necesario, la agitación se ajustó a 60 rpm, y el medio de alimentación fue Medio 5 (con o sin glutamina, según se señala). Todos los cultivos se hicieron crecer a una escala de 130 l, excepto para 03P49B501, que se hizo crecer a una escala de 500 l. De forma breve, el Medio 1 está enriquecido en todos los nutrientes, sin tener en cuenta las velocidades de captación relativas, mientras que el Medio 12 se equilibró eliminando nutrientes aparentemente innecesarios de la versión indiscriminadamente enriquecida. En la Tabla 27 se enumeran las composiciones de los Medios 10, 11 y 12.

25

TABLA 26

Medio inicial, cantidades de alimentación y fuentes de siembra para experimentos piloto

Proceso discontinuo n°	Descripción	Medio inicial	Cantidad alimentada	¿Gln alimentada?	Fuente de siembra	Densidad de siembra (Viabiles/ml)
1	Fase 1	Medio 10	38%*	Sí	Bolsa	$0,2 \times 10^6$
2	Medio rico, Alto contenido en Gln (1)	Medio 1	16%	Sí	Bolsa	$0,2 \times 10^6$
3	Med rico, Alto contenido de Gln (2)	Medio 1	16%	Sí	Bolsa	$0,2 \times 10^6$
4	Med rico, Menor Gln	Medio 1	15%	No	Bolsa	$0,2 \times 10^6$
5	Med equilibrado, Bajo contido de Gln (1)	Medio 12	10%	No	Bolsa	$0,2 \times 10^6$
6	Med equil, Bajo contenido de Gln (2)	Medio 12	9%	No	Bolsa	$0,2 \times 10^6$
7	Med equil, Bajo contenido de Gln, Siembra densa	Medio 12	5%	No	Biorreactor de alta densidad	$2,0 \times 10^6$

*El proceso de la Fase 1 se alimentó con Medio 12, que no es tan rico como el Medio 5.

ES 2 341 390 T3

TABLA 27

Composiciones de los Medios 10, 11 y 12

	Medio 10		Medio 11		Medio 12	
Aminoácidos	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
alanina	24,87	0,28	142,48	1,60	17,80	0,20
arginina	423,43	2,43	1528,84	8,79	696,00	4,00
asparagina•H ₂ O	173,90	1,16	1080,60	7,20	1500,00	10,00
ácido aspártico	52,72	0,40	532,40	4,00	219,45	1,65
cisteína•HCl•H ₂ O	70,01	0,40			70,40	0,40
cisteína•2HCl	62,09	0,20	470,00	1,50	312,50	1,00
ácido glutámico	41,08	0,28	235,38	1,60		
glutamato monosódico					33,80	0,20
glutamina	1162,40	7,96	6000,00	41,10	584,00	4,00
glicina	35,92	0,48	120,07	1,60	115,50	1,54
histidina•HCl•H ₂ O	75,27	0,36	588,32	2,80	369,60	1,76
isoleucina	151,90	1,16	944,52	7,21	370,73	2,83
leucina	172,69	1,32	1360,75	10,39	615,70	4,70
Lisina•HCl	218,38	1,20	1456,80	8,00	946,40	5,20
metionina	53,55	0,36	477,06	3,20	387,40	2,60
fenilalanina	98,81	0,60	660,36	4,00	363,00	2,20
prolina	96,40	0,84	552,31	4,80	471,50	4,10
serina	273,07	2,60	1264,70	12,04	903,00	8,60
treonina	132,81	1,12	762,02	6,40	380,80	3,20
triptófano	28,99	0,14	260,94	1,28	212,16	1,04
tirosina•2Na•2H ₂ O	145,10	0,56	832,62	3,19	456,75	1,75
Valina	131,17	1,12	749,21	6,40	468,00	4,00
Vitaminas	mg/l	μM	mg/l	μM	mg/l	μM
biotina	0,36	1,49	3,28	13,45	2,68	11,00
pantotenato de calcio	4,03	8,47	36,02	75,67	21,93	46,06
cloruro de colina	16,11	115,92	143,28	1030	116,76	840,00
ácido fólico	4,76	10,80	42,43	96,22	25,93	58,80
inositol	22,64	125,79	201,71	1120	163,98	911,00
nicotinamida	3,61	29,62	32,02	262,44	26,23	215,00
piridoxal•HCl	1,99	9,83			2,03	10,00
piridoxina•HCl	1,67	8,10	32,82	159,31	18,13	88,00
riboflavina	0,40	1,06	3,60	9,58	0,41	1,10
tiamina•HCl	3,92	11,64	35,22	104,51	39,43	117,00
Vitamina B12	1,34	0,99	11,21	8,27	10,57	7,80
Sales inorgánicas	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
CaCl ₂	115,78	1,04	113,27	1,02	116,55	1,05
KCl	310,94	4,17			312,90	4,19
KH ₂ PO ₄			1640,00	12,06		
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50			56,60	0,40

ES 2 341 390 T3

TABLA 27 (continuación)

5	NaCl	3704,96	63,44				
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	114,53	0,83			645,84	4,68
	MgSO ₄	48,70	0,41			138,00	1,15
	MgSO ₄ •7H ₂ O	8,60	0,03	170,00	0,69		
10	MgCl ₂	28,53	0,30			28,50	0,30
	NaHCO ₃	1220,00	14,52			2000,00	23,81
	Oligoelementos	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
15	Selenito de sodio	7,00	40,49	40,00	231,35	53,65	310,27
	Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	49,86	123,42			50,00	123,76
	CuSO ₄	0,97	6,06	3,44	21,51	10,00	62,50
	CuSO ₄ •5H ₂ O	7,49	30,00	7,49	30,00	49,94	200,00
20	FeSO ₄ •7H ₂ O	1542	5549	2534	9115	3366	12000
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	1383	4821	2704	9421	2640	9198
	MnSO ₄ •H ₂ O	0,17	1,01	0,17	1,01	16,90	100,00
	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140	492,84	140,00	492,84	142,03	500,00
25	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,24	1,00	1,24	1,00	123,60	100,00
	NH ₄ VO ₃	0,65	5,56	0,65	5,56	1,17	10,00
	NiSO ₄ •6H ₂ O	0,13	0,49	0,13	0,49	2,63	10,00
30	SnCl ₂ •2H ₂ O	0,12	0,53	0,12	0,53	0,45	2,00
	AlCl ₃ •6H ₂ O			1,20	4,97	0,48	2,00
	AgNO ₃			0,17	1,00		
	Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂			2,55	9,98		
35	KBr			0,12	1,01	0,24	2,00
	CdCl ₂ •2,5H ₂ O			2,28	9,99		
	CoCl ₂ •6H ₂ O			2,38	10,00		
	CrCl ₃			0,32	2,02	7,92	50,00
40	NaF			4,20	100,02	0,08	2,00
	GeO ₂			0,53	5,07	0,21	2,00
	KI			0,17	1,02	16,60	100
	RbCl			1,21	10,01	0,24	2,00
45	ZrOCl ₂ •8H ₂ O			3,22	9,99		
	H ₃ BO ₃					6,18	100,00
	LiCl					0,08	2,00
50	Otros componentes	µg/l	µM	µg/l	µM	µg/l	µM
	Hidrocortisona	86,40	0,24	288,00	0,79	360,00	0,99
	Putrescina•2HCl	2480	15,39	8000	49,66	10000	62,07
55	ácido linoleico	56,69	0,20	336,25	1,20	290,00	1,04
	ácido tióctico	141,71	0,69	840,63	4,08	716,00	3,48
	Otros componentes	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
60	D-glucosa (Dextrosa)	11042,24	61,35	43005,99	238,92	15000,00	83,33
	PVA	2520,00		2400,00		2560,00	
	Nucellin™	14,00		80,00		50,00	
65	Piruvato de sodio	54,85	0,50			55,00	0,50

Resultados y conclusiones

Los cambios de medios condujeron a una mejora constante durante todos estos experimentos. En términos de crecimiento celular, viabilidad, niveles reducidos de lactato, niveles reducidos de amonio, y título, los niveles reducidos de glutamina fueron mejores que los elevados (véanse las Figuras 60-64), y el medio equilibrado (discontinuo) fue mejor que el medio rico (Medio 1, véanse las Figuras 60-64). Los cultivos que partieron de un inóculo de densidad elevada mostraron un título final mayor que el mostrado por los cultivos que partieron de inóculos de menor densidad (véase la Figura 64).

A diferencia de lo que se observó en biorreactores de pequeña escala, el primer medio (Medio 1 con contenido elevado de Gln) dio como resultado títulos menores que los del proceso original (véase la Figura 64). Tampoco hubo ningún cambio de la captación de lactato tras el cambio de temperatura (véase la Figura 62). Esto sugiere que puede haber cierta sensibilidad a la escala con este medio. Esta conclusión está apoyada por experimentos paralelos a pequeña escala (2 l) que se llevaron a cabo junto con estos experimentos a escala intermedia (datos no mostrados). Las últimas formulaciones del medio que contienen menos glutamina no fueron sensibles a la escala, por lo menos en estos experimentos (véanse las Figuras 60-65). Los procesos duplicados (Discontinuos 2 y 3 y Discontinuos 5 y 6) muestran una reproducibilidad muy buena de experimento a experimento (véanse las Figuras 60-65), incrementando la confianza en todos los datos reunidos en esta campaña.

Ejemplo 16

*Producción de TNFR-Ig usando Medio 9**Materiales y métodos*

Células CHO que expresan una proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión a ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton (p75) humano, enlazada a la porción Fc de IgG1 ("células TNFR-Ig"), se sembraron a densidad elevada a partir de un biorreactor de perfusión, y se diluyeron hasta 3×10^6 células viables/ml en Medio 9 para la etapa del biorreactor de producción.

Resultados y conclusiones

Las Figuras 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72 muestran el crecimiento celular, la viabilidad celular, la glucosa residual, los niveles de glutamina, la concentración de lactato, la concentración de amonio, y el título relativo del producto, respectivamente. Bajo el intervalo de modificaciones minoritarias al proceso, todas las condiciones produjeron un buen crecimiento celular, una elevada viabilidad celular, y un título final global elevado.

Para todas las condiciones de este experimento, el subproducto inhibidor metabólico lactato se consumió, o la concentración alcanzó un nivel estable, sugiriendo que la producción de lactato se detuvo. De forma similar, para el metabolito inhibidor amonio, los niveles se elevaron inicialmente, pero en algún momento después del cambio de temperatura las células empezaron a consumir el amonio. En este Ejemplo, los cultivos de células TNFR-Ig se sometieron a los inductores químicos butirato de sodio y HMBA.

Ejemplo 17

*Comparación de condiciones de cultivo a pequeña y a gran escala**Materiales y métodos*

Para determinar si el tamaño del cultivo afectó a las características relevantes del cultivo, se hicieron crecer células anti-GDF-8 en biorreactores de 1 litro de pequeña escala o en biorreactores de 6000 litros de gran escala. Las células se hicieron crecer a 37°C, y se cambiaron a 31°C en el 4º día.

Resultados y conclusiones

Como se puede observar en las Figuras 73, 74, 75 y 76 (que muestran la densidad celular, el título, los niveles de lactato y niveles de amonio, respectivamente), no hubo diferencias relevantes entre los cultivos a gran escala de 6000 litros y a pequeña escala de 1 litro para esas características. Tanto los niveles de lactato como de amonio comenzaron a disminuir tras el cambio de temperatura en el 4º día. Este ejemplo demuestra que el tamaño del cultivo no afecta a la densidad celular, a la viabilidad celular, a los niveles de lactato y niveles de amonio cuando los cultivos se someten a las mismas condiciones de crecimiento.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una proteína de fusión de receptor de factor de necrosis tumoral con región Fc de inmunoglobulina (TNFR-Fc) en un cultivo celular de producción a gran escala, que comprende las etapas siguientes:

proporcionar un cultivo celular que comprende:

unas células de mamíferos que contienen un gen que codifica TNFR-Fc, gen el cual es expresado en la condición de cultivo celular; y

un medio que contiene glutamina y que tiene una característica del medio seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) una cantidad acumulativa de aminoácidos por volumen unitario mayor que alrededor de 70 mM, (ii) una relación molar de glutamina acumulativa a asparagina acumulativa menor que alrededor de 2, (iii) una relación molar de glutamina acumulativa a aminoácidos totales acumulativos menor que alrededor de 0,2, (iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulativos a aminoácidos totales acumulativos entre alrededor de 0,4 y 1, (v) una cantidad acumulativa combinada de glutamina y asparagina por volumen unitario mayor que alrededor de 16 mM, y sus combinaciones;

mantener dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial en un primer conjunto de condiciones de cultivo durante un primer período de tiempo suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable en un intervalo de alrededor de 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviese en el primer conjunto de condiciones de cultivo;

cambiar por lo menos una de las condiciones de cultivo, de forma que se aplique un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

mantener dicho cultivo durante un segundo período de tiempo en el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período de tiempo de forma que TNFR-Fc se acumule en el cultivo celular.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio contiene una relación molar de glutamina acumulativa a asparagina acumulativa menor que aproximadamente 2; y

dicho medio tiene dos características del medio seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (i) un medio que contiene una cantidad acumulativa de aminoácidos por volumen unitario mayor que alrededor de 70 mM, (iii) una relación molar de glutamina acumulativa a aminoácidos totales acumulativos menor que aproximadamente 0,2, (iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulativos a aminoácidos totales acumulativos entre aproximadamente 0,4 y 1, (v) una cantidad acumulativa combinada de glutamina y asparagina por volumen unitario mayor que aproximadamente 16 mM, y sus combinaciones.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha condición de cultivo celular en dicha etapa de cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo se selecciona de entre el grupo que consiste en: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalidad, (iv) nivel de inductor químico, y sus combinaciones.

4. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración inicial de glutamina de dicho medio es menor o igual a 10 mM.

5. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración inicial de glutamina de dicho medio es menor o igual a 4 mM.

6. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad acumulativa total por volumen unitario de glutamina de dicho medio es menor o igual a 10 mM.

7. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad acumulativa total por volumen unitario de glutamina de dicho medio es menor o igual a 4 mM.

8. Método según la reivindicación 1, en el que la glutamina sólo se proporciona en el medio inicial al comienzo del cultivo celular.

9. Método según la reivindicación 1, en el que la densidad inicial de dichas células de mamíferos es por lo menos 2×10^5 células/ml.

10. Método según la reivindicación 1, en el que la densidad inicial de dichas células de mamíferos es por lo menos 2×10^6 células/ml.

ES 2 341 390 T3

11. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de alimentación comprende alimentar por lo menos aproximadamente 1.000 l de un cultivo.
12. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de alimentación comprende alimentar por lo menos 5 aproximadamente 10.000 l de un cultivo.
13. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer intervalo de temperatura que es aproximadamente 30 a 42 grados Celsius.
- 10 14. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer conjunto de condiciones comprende un primer intervalo de temperatura que es aproximadamente 37 grados Celsius.
- 15 15. Método según la reivindicación 1, en el que dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo intervalo de temperatura que es aproximadamente 25 a 41 grados Celsius.
- 16 16. Método según la reivindicación 1, en el que dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo intervalo de temperatura que es aproximadamente 29 a 35 grados Celsius.
- 20 17. Método según la reivindicación 1, en el que dicho segundo conjunto de condiciones comprende un segundo intervalo de temperatura que es aproximadamente 31 grados Celsius.
- 25 18. Método según la reivindicación 1, que comprende además una segunda etapa de cambio subsiguiente a dicho primer cambio de por lo menos una de las condiciones de cultivo, que comprende cambiar por lo menos una de las condiciones de cultivo de forma que se aplique al cultivo un tercer conjunto de condiciones.
- 30 19. Método según la reivindicación 18, en el que la segunda etapa de cambio comprende cambiar por lo menos una condición de cultivo seleccionada de entre el grupo que consiste en: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalidad, (iv) nivel de inductor químico, y sus combinaciones.
- 30 20. Método según la reivindicación 18, en el que dicho tercer conjunto de condiciones comprende un tercer intervalo de temperatura que es aproximadamente 27 a 37 grados Celsius.
- 35 21. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer período de tiempo está entre 1 y 7 días.
- 35 22. Método según la reivindicación 1, en el que dicho primer período de tiempo es aproximadamente 4 días.
23. Método según la reivindicación 1, en el que el total de dicho primer período de tiempo y dicho segundo período de tiempo es por lo menos 5 días.
- 40 24. Método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa de mantener dicho cultivo durante un segundo período de tiempo, el nivel de lactato disminuye después hasta que el nivel de lactato en el cultivo alcanza un nivel máximo.
- 45 25. Método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa de mantener dicho cultivo durante un segundo período de tiempo, el nivel de amonio disminuye después hasta que el nivel de amonio en el cultivo alcanza un nivel máximo.
- 50 26. Método según la reivindicación 1, en el que dicha cantidad total de dicha TNFR-Fc producida es por lo menos 1,5 veces mayor que la cantidad de TNFR-Fc producida en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de dicha característica del medio.
- 50 27. Método según la reivindicación 1, en el que dicha cantidad total de dicha TNFR-Fc producida es por lo menos 2 veces mayor que la cantidad de TNFR-Fc producida en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de dicha característica del medio.
- 55 28. Método según la reivindicación 1, en el que dicho cultivo celular se proporciona además con componentes suplementarios.
- 60 29. Método según la reivindicación 28, en el que dichos componentes suplementarios se proporcionan a múltiples intervalos.
- 60 30. Método según la reivindicación 28, en el que dichos componentes suplementarios se seleccionan de entre el grupo que consiste en hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía.
- 65 31. Método según la reivindicación 1, en el que dicho cultivo no se suplementa con componentes adicionales durante la producción de dicha TNFR-Fc.

ES 2 341 390 T3

32. Método según la reivindicación 1, en el que la glutamina se sustituye por glicilglutamina en dicho cultivo.

33. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina, y prolina, por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 25 mM.

34. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina, y prolina, por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 35 mM.

35. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio tiene una característica del medio seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- (i) una cantidad total acumulativa de histidina por volumen unitario mayor que aproximadamente 1,7 mM;
- (ii) una cantidad total acumulativa de isoleucina por volumen unitario mayor que aproximadamente 3,5 mM;
- (iii) una cantidad total acumulativa de leucina por volumen unitario mayor que aproximadamente 5,5 mM;
- (iv) una cantidad total acumulativa de metionina por volumen unitario mayor que aproximadamente 2,0 mM;
- (v) una cantidad total acumulativa de fenilalanina por volumen unitario mayor que aproximadamente 2,5 mM;
- (vi) una cantidad total acumulativa de prolina por volumen unitario mayor que aproximadamente 2,5 mM;
- (vii) una cantidad total acumulativa de triptófano por volumen unitario mayor que aproximadamente 1,0 mM; y
- (viii) una cantidad total acumulativa de tirosina por volumen unitario mayor que aproximadamente 2,0 mM.

36. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de serina por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 10 mM.

37. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de asparagina por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 8 mM.

38. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de asparagina por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 12 mM.

39. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de fósforo por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 5 mM.

40. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de glutamato por volumen unitario en dicho medio es menor que aproximadamente 1 mM.

41. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de pantotenato de calcio por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 20 mg/l.

42. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de nicotinamida por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 25 mg/l.

43. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de piridoxina y piridoxal por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 35 mg/l.

44. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de riboflavina por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 2,0 mg/l.

45. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulativa de hidrocloreuro de tiamina por volumen unitario en dicho medio es mayor que aproximadamente 35 mg/l.

ES 2 341 390 T3

46. Método según la reivindicación 1, en el que dicho medio comprende un medio que contiene glutamina y que tiene una característica del medio seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- (i) una concentración de aminoácidos de partida mayor que alrededor de 70 mM, (ii) una relación molar de glutamina de partida a asparagina de partida menor que alrededor de 2, (iii) una relación molar de glutamina de partida a aminoácidos totales de partida menor que alrededor de 0,2, (iv) una relación molar de iones inorgánicos de partida a aminoácidos totales de partida entre alrededor de 0,4 y 1, (v) una concentración combinada de glutamina de partida y asparagina de partida mayor que alrededor de 16 mM, y sus combinaciones.

47. Método para producir TNFR-Fc en un cultivo celular de producción a gran escala, que comprende las etapas siguientes:

proporcionar un cultivo celular que comprende:

unas células de mamíferos que contienen un gen que codifica TNFR-Fc, gen el cual es expresado en la condición de cultivo celular; y

un medio definido que contiene glutamina y que tiene por lo menos dos características del medio seleccionadas de entre el grupo que consiste en: i) una concentración de aminoácidos de partida mayor que aproximadamente 70 mM, ii) una relación molar de glutamina a asparagina menor que aproximadamente 2, iii) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales menor que aproximadamente 0,2, iv) una relación molar de iones inorgánicos a aminoácidos totales entre aproximadamente 0,4 y 1, y v) una concentración combinada de glutamina y asparagina mayor que aproximadamente 16 mM;

mantener dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial bajo un primer conjunto de condiciones de cultivo durante un primer período de tiempo suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan en un intervalo de aproximadamente 20%-80% de la densidad celular viable posible máxima si dicho cultivo se mantuviese bajo el primer conjunto de condiciones de cultivo;

cambiar por lo menos una de las condiciones de cultivo, de forma que se aplique un segundo conjunto de condiciones de cultivo;

mantener dicho cultivo durante un segundo período de tiempo bajo el segundo conjunto de condiciones y durante un segundo período de tiempo de forma que se acumule TNFR-Fc en el cultivo celular.

48. Método según la reivindicación 47, en el que dicho medio tiene características del medio de:

- i) una concentración de aminoácidos de partida mayor que aproximadamente 70 mM, ii) una relación molar de glutamina a asparagina menor que aproximadamente 2, iii) una relación molar de glutamina a aminoácidos totales menor que aproximadamente 0,2, iv) una relación molar de iones inorgánicos a aminoácidos totales entre aproximadamente 0,4 y 1, y v) una concentración combinada de glutamina y asparagina mayor que aproximadamente 16 mM.

49. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 ó 46-48, en el que:

los niveles de lactato son menores que aquellos niveles observados en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de dicha característica del medio;

los niveles de amonio son menores que aquellos niveles observados en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de dicha característica del medio; y

la cantidad total de TNFR-Fc producida es por lo menos tan alta como la observada en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carezca de dicha característica del medio.

50. Método según la reivindicación 1 ó 47, en el que la TNFR-Fc producida se aísla y/o se purifica para uso como o en la preparación de fármacos.

Figura 1. Comparación de Medio 1 y Medio 2 en matraz de agitación usando células anti-GDF-8

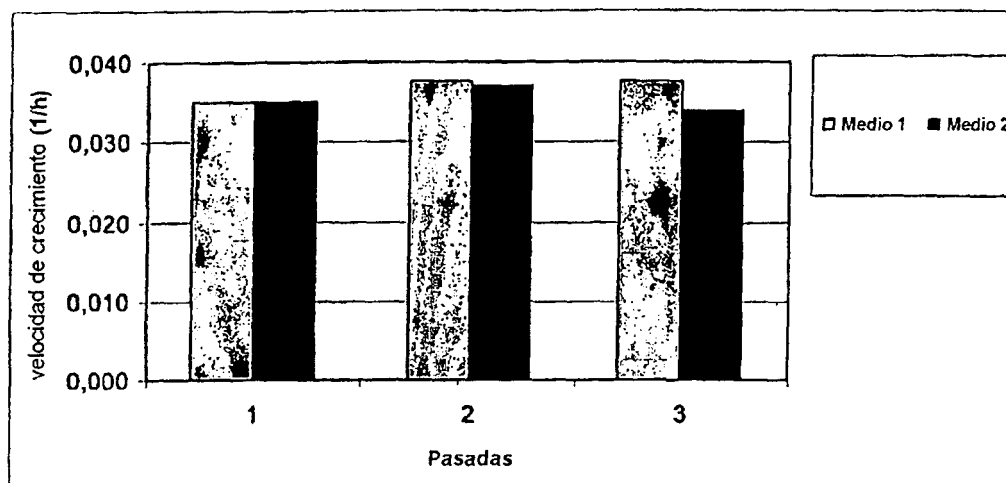


Figura 2. Crecimiento y viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 1.

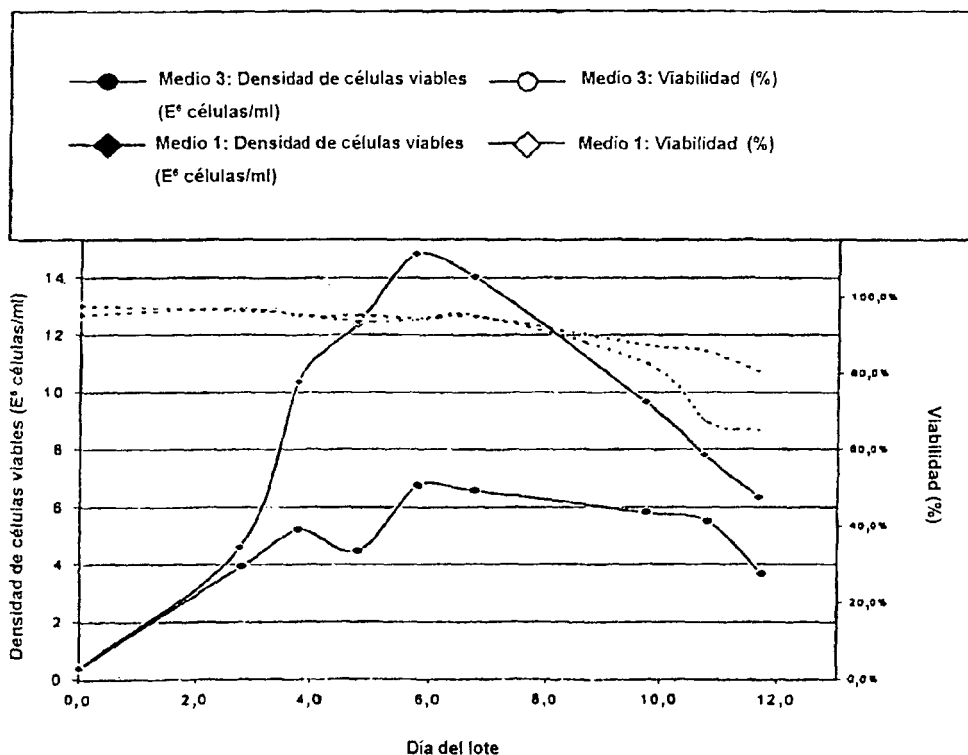


Figura 3. Crecimiento celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina

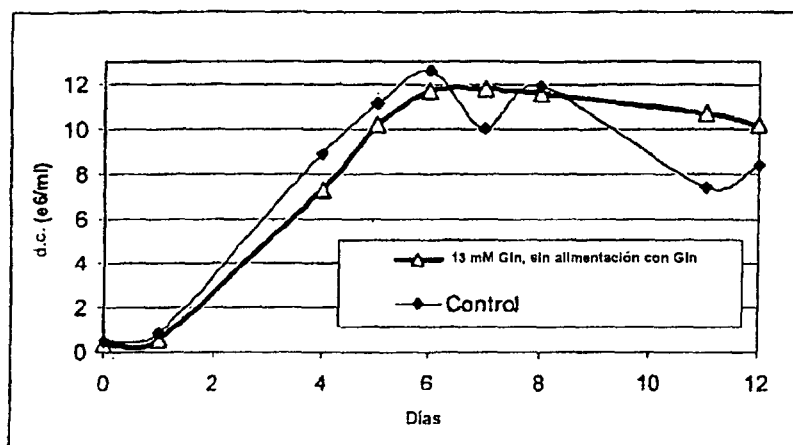


Figura 4. Viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

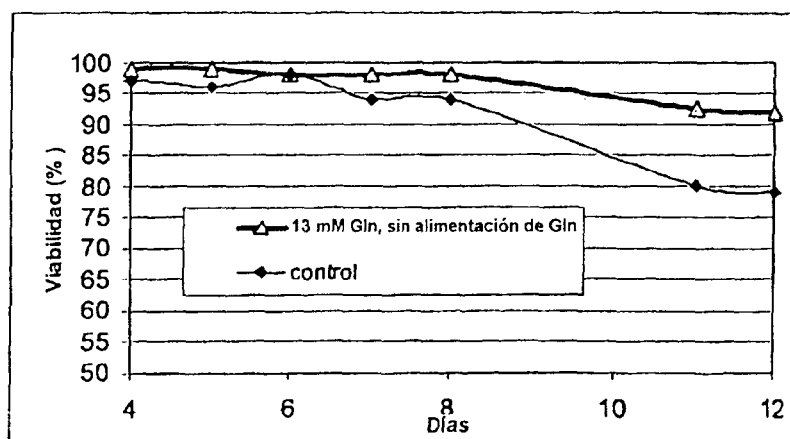


Figura 5. Niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

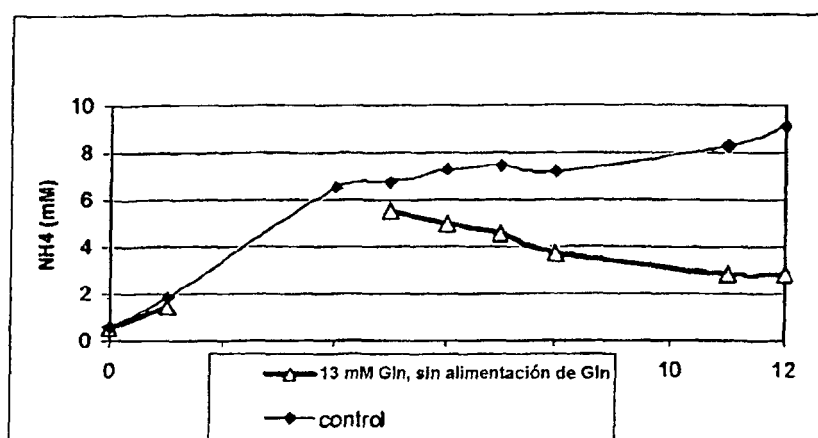


Figura 6. Niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

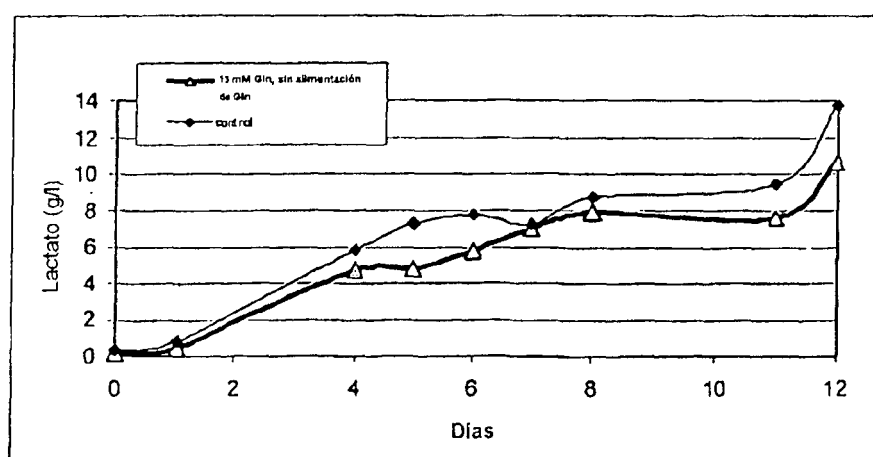


Figura 7. Título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.

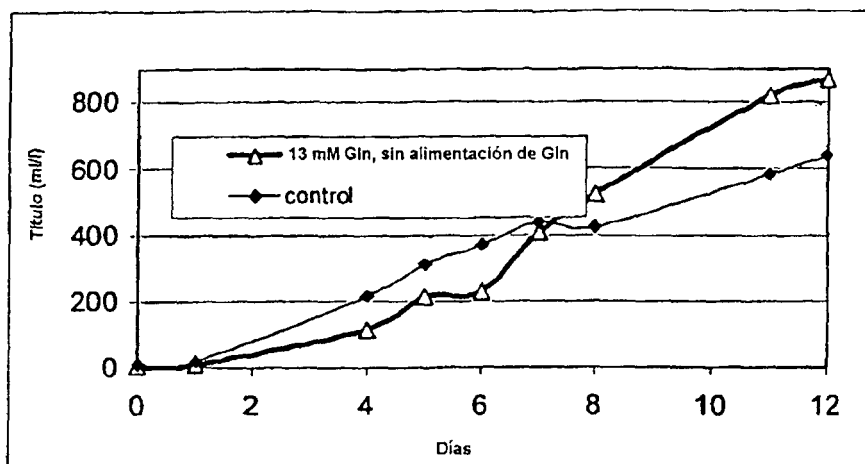


Figura 8. Densidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y de alimentación desprovista de glutamina.

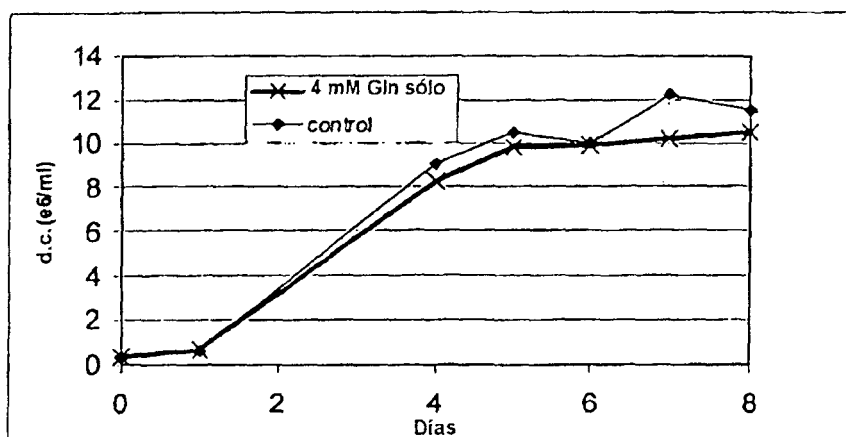


Figura 9. Viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y de alimentación desprovista de glutamina.

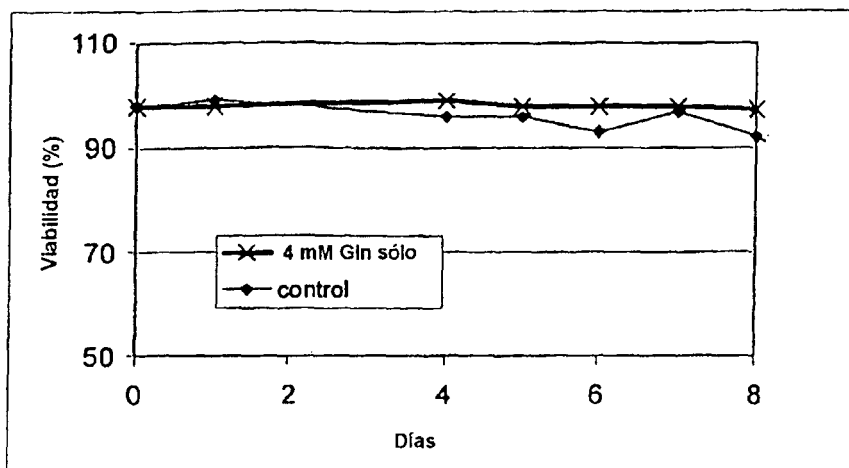


Figura 10. Niveles de amonio de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y desprovisto de glutamina.

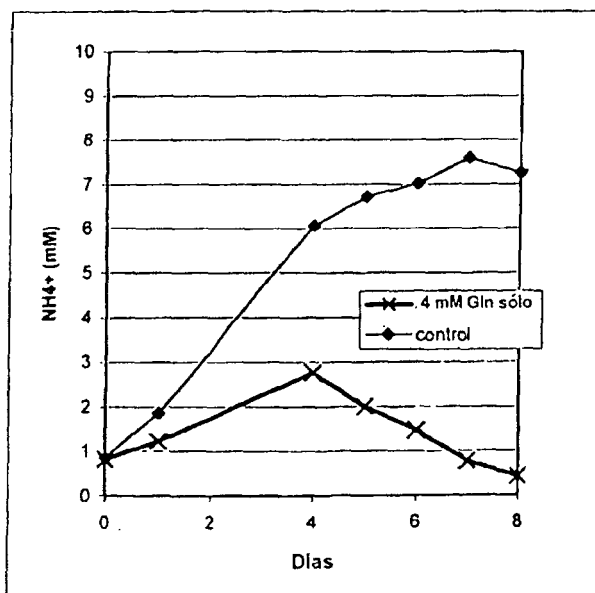


Figura 11. Niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y desprovisto de glutamina.

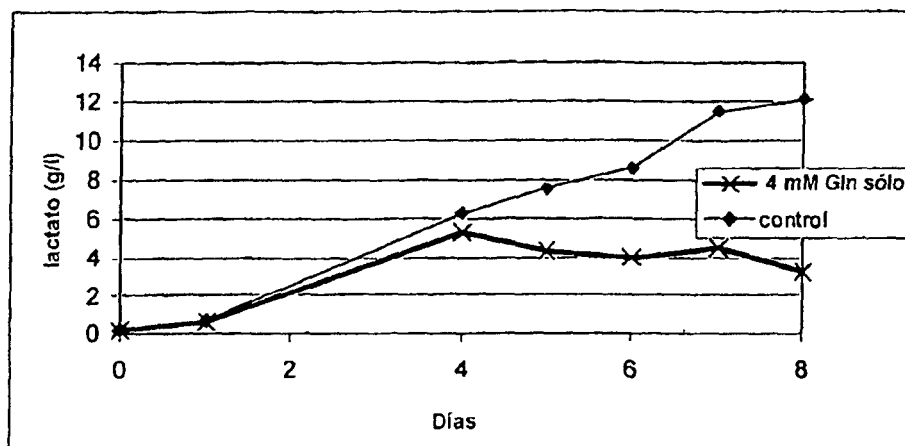


Figura 12. Título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y desprovisto de glutamina.

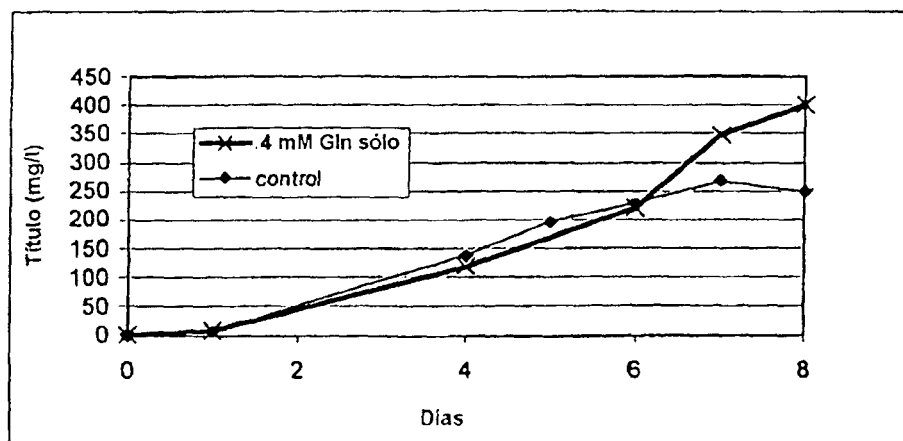


Figura 13. Respuesta a la dosis de hierro de células anti-GDF-8 en Medio 1 y en Medio 2.

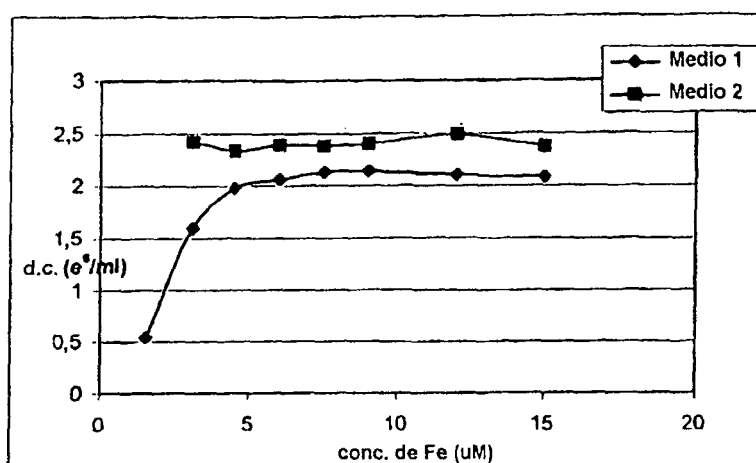


Figura 14. Densidad celular de cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

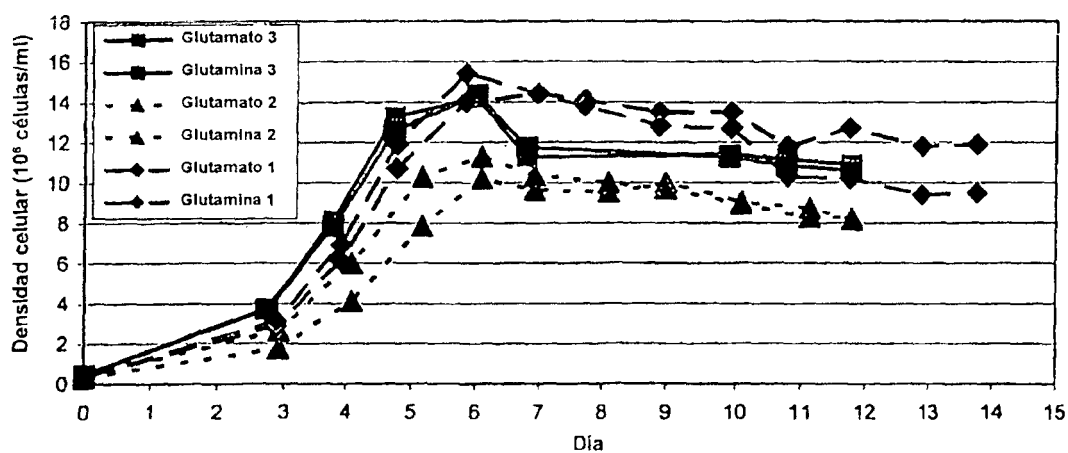


Figura 15. Viabilidad celular de cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

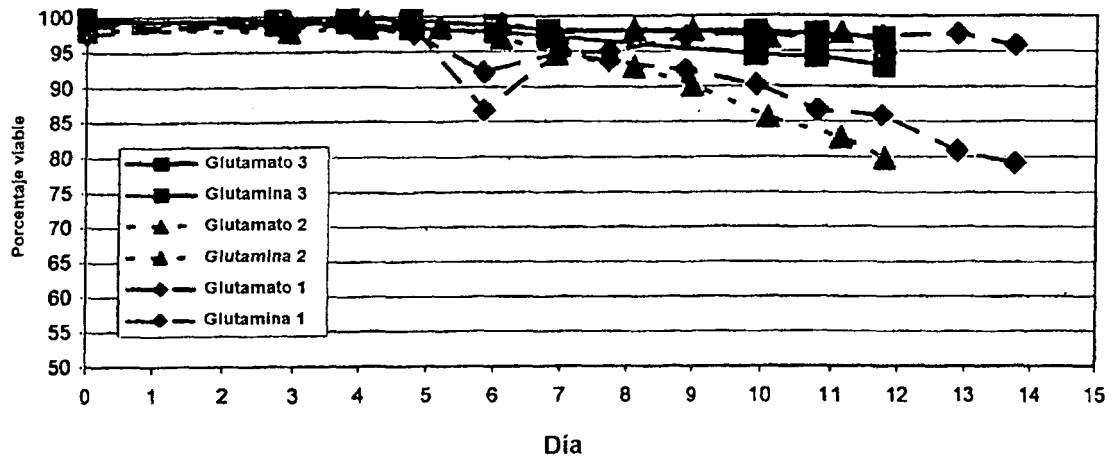


Figura 16. Título de anti-Lewis Y en cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

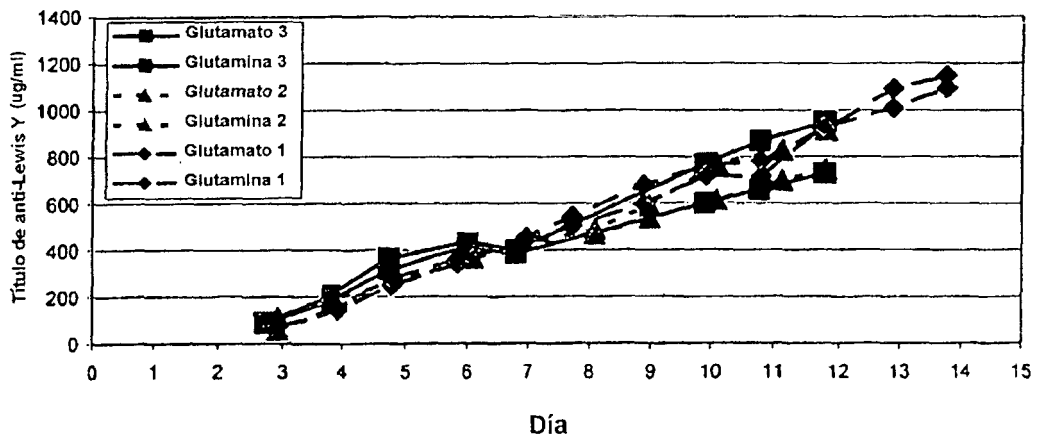


Figura 17. Niveles de lactato en cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

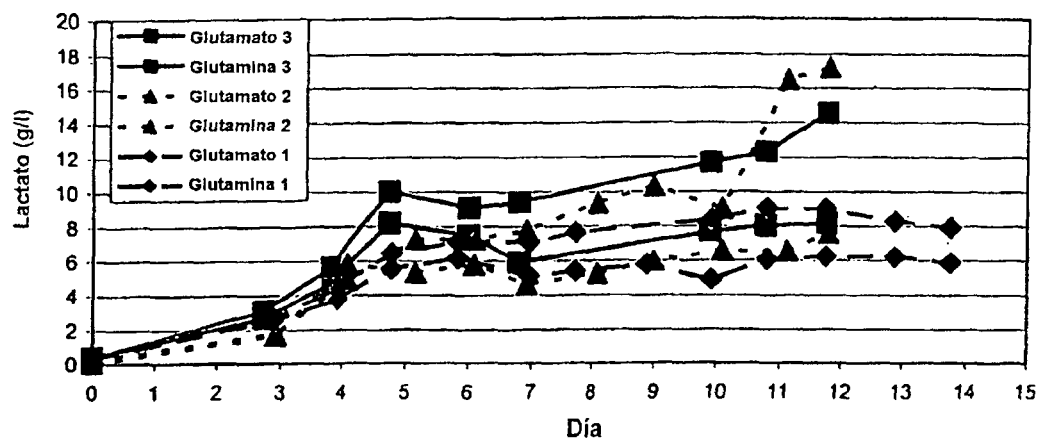


Figura 18. Niveles de amonio en cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

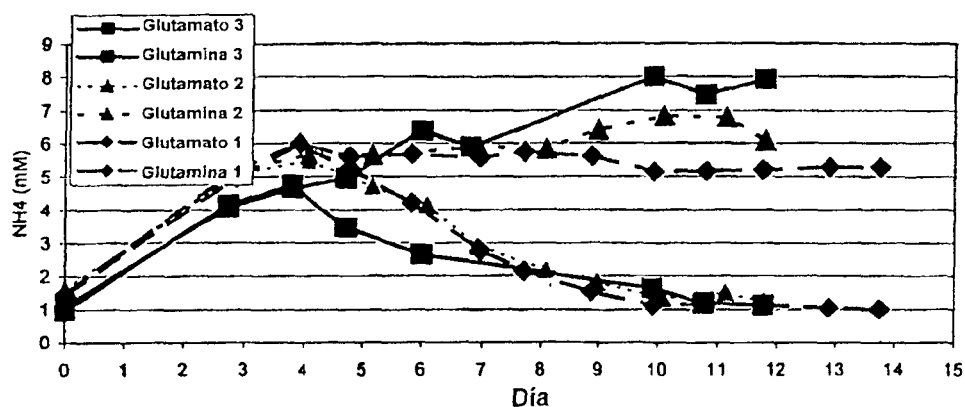


Figura 19. Osmolaridad de cultivos alimentados con glutamato y glutamina.

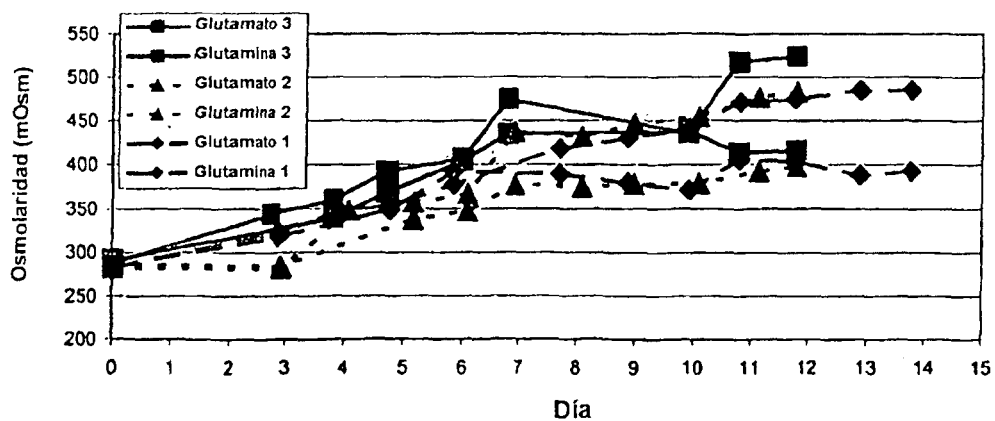


Figura 20. Densidad celular. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hicieron crecer usando las mismas condiciones.

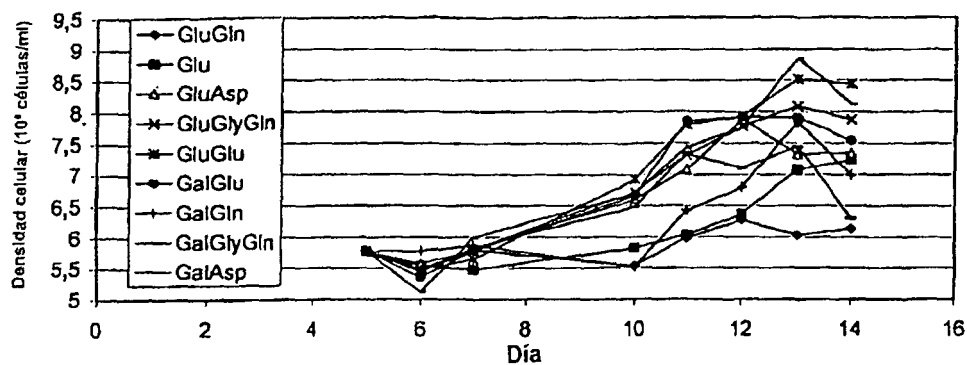


Figura 21. Viabilidad celular. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hicieron crecer usando las mismas condiciones.

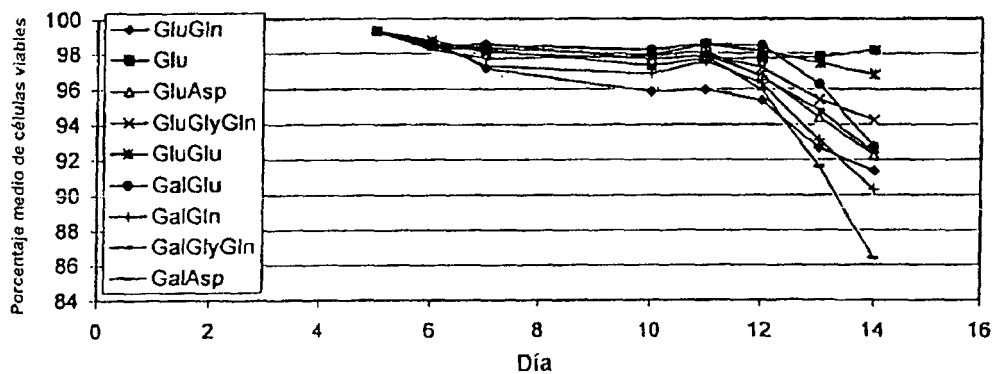


Figura 22. Título medio. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hicieron crecer usando las mismas condiciones.

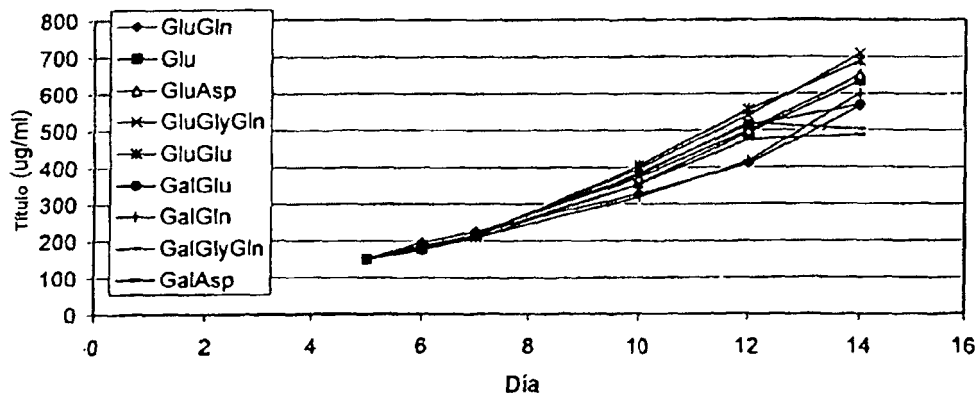


Figura 23. Niveles de amonio. Cada gráfica es la media de dos matraces de agitación que se hicieron crecer usando las mismas condiciones.

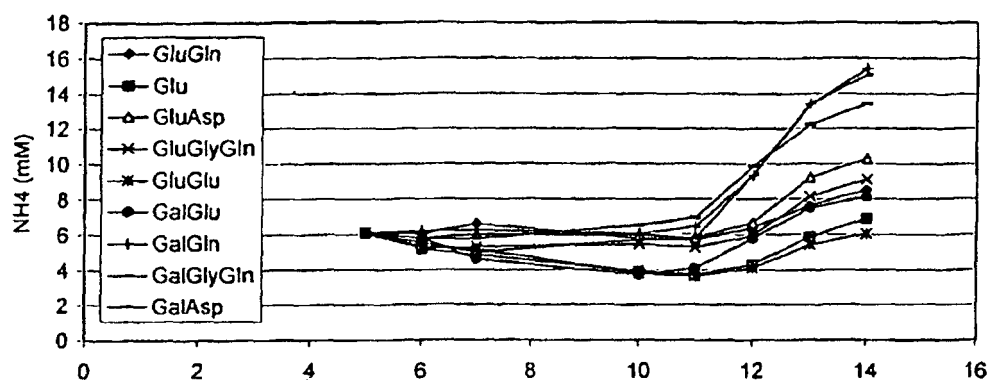


Figura 24. Bomba agitadora

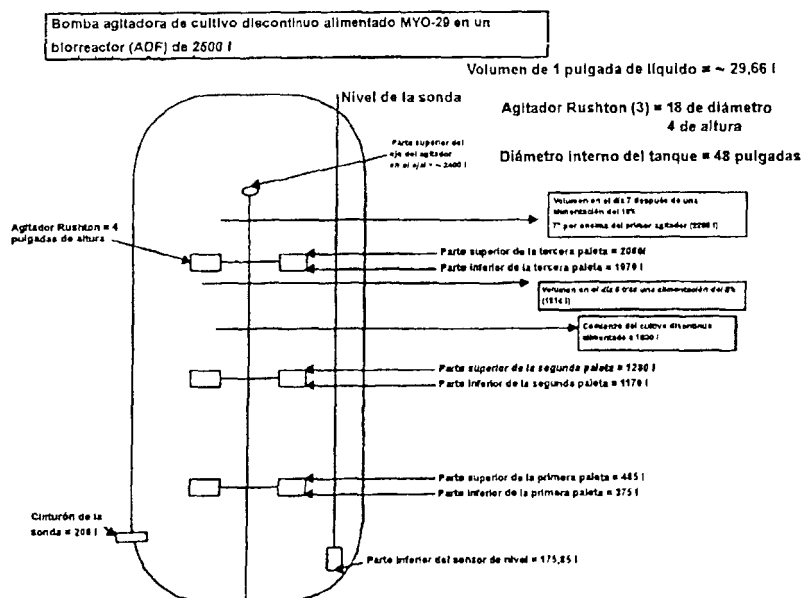


Figura 25. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

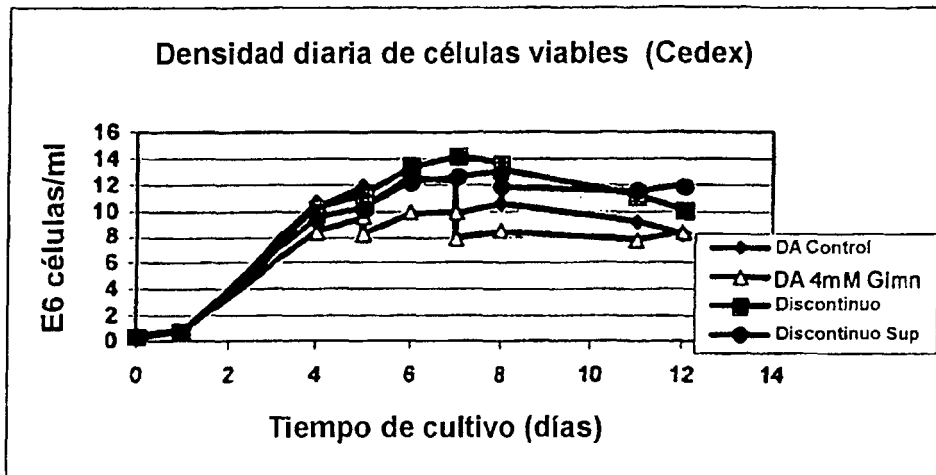


Figura 26. Viabilidad de células anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

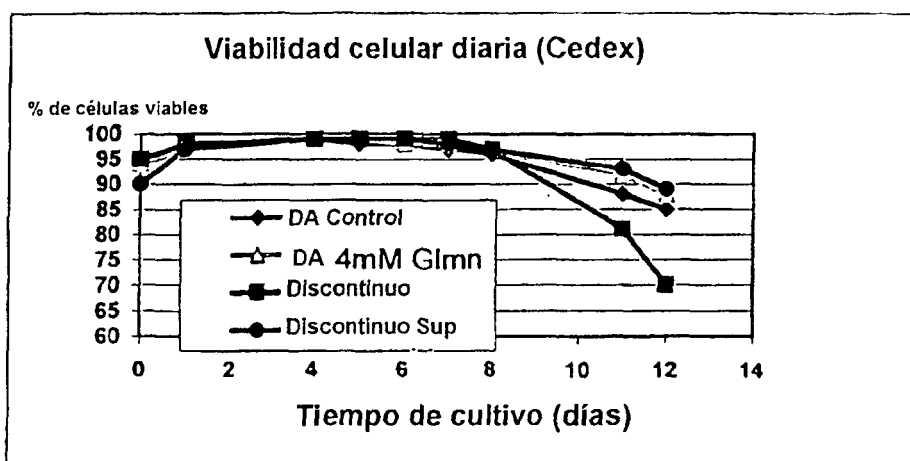


Figura 27. Título de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

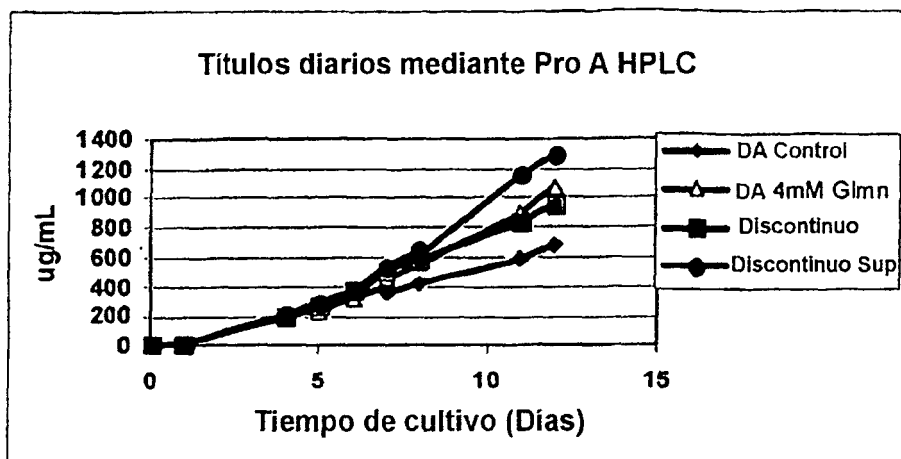


Figura 28. Niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

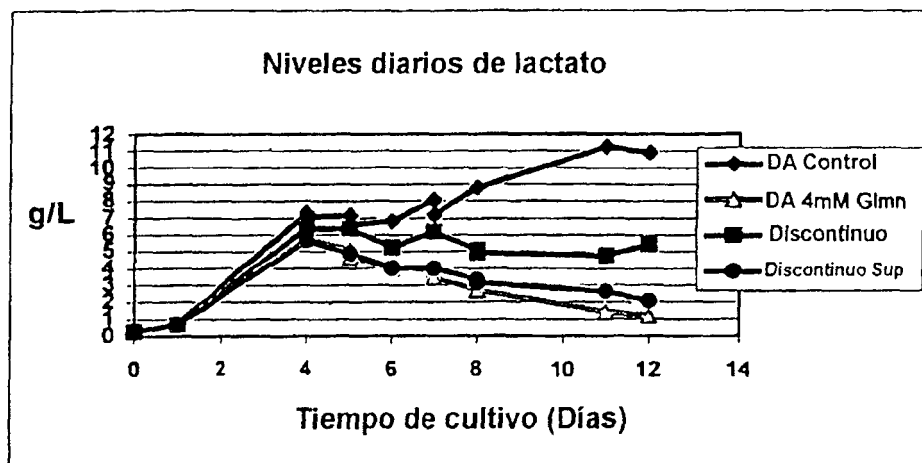


Figura 29. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

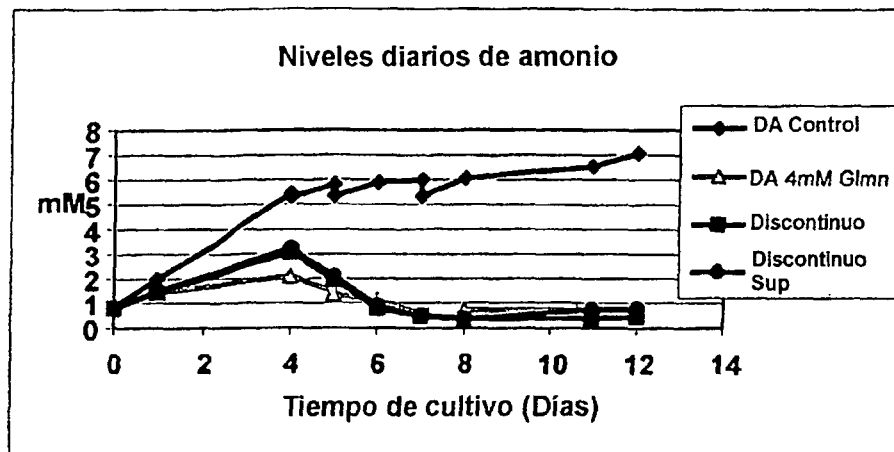


Figura 30. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

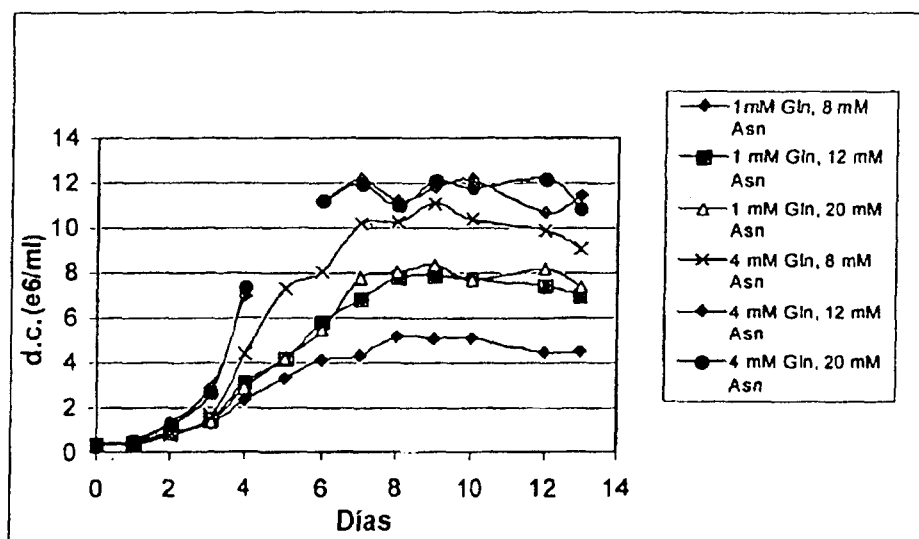


Figura 31. Título de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

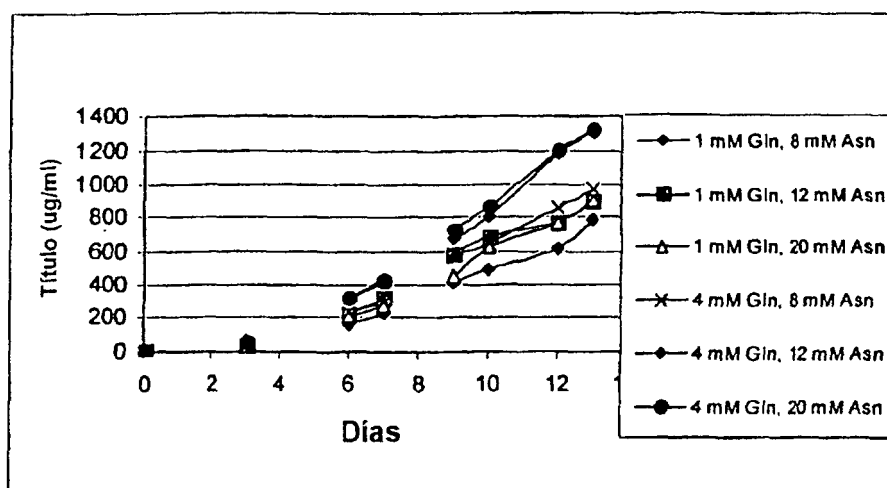


Figura 32. Niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

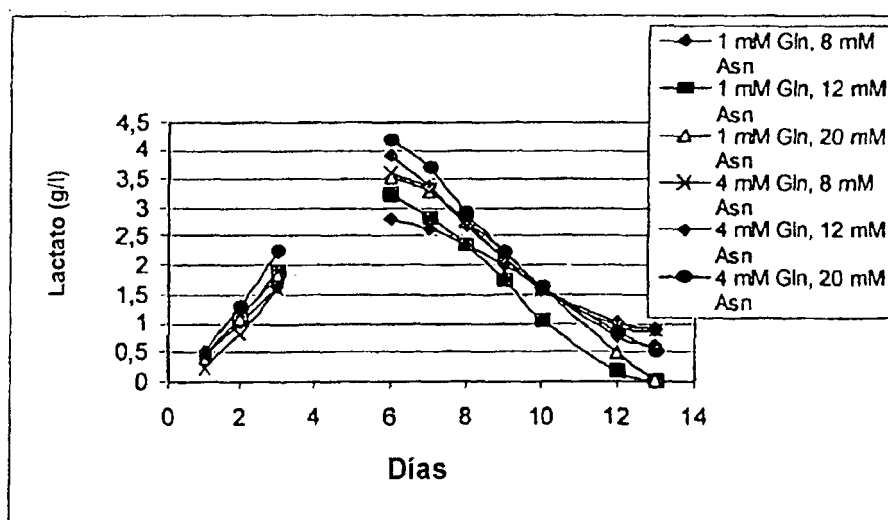


Figura 33. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en diversas condiciones experimentales.

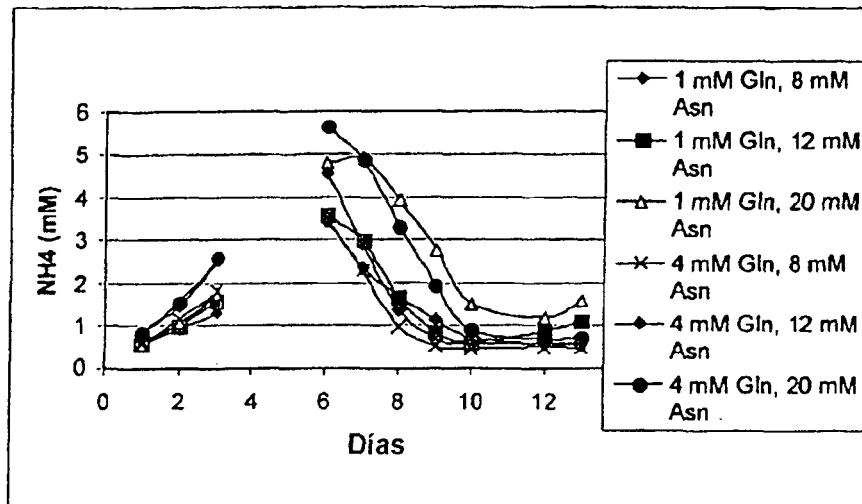


Figura 34. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

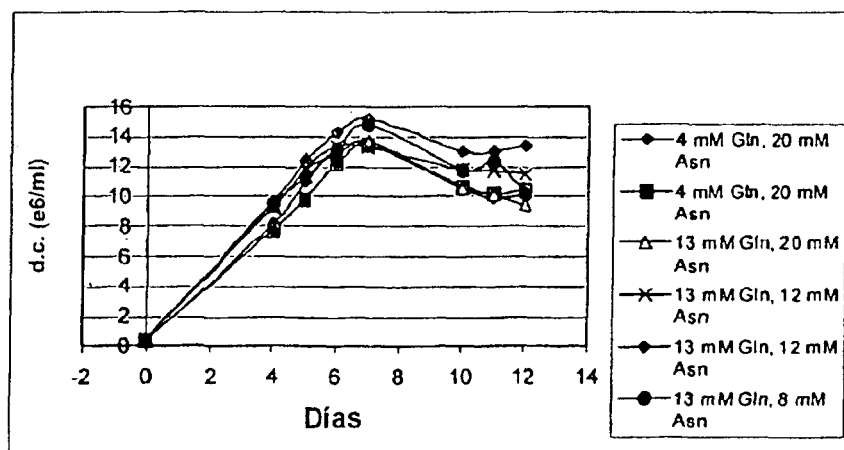


Figura 35. Viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

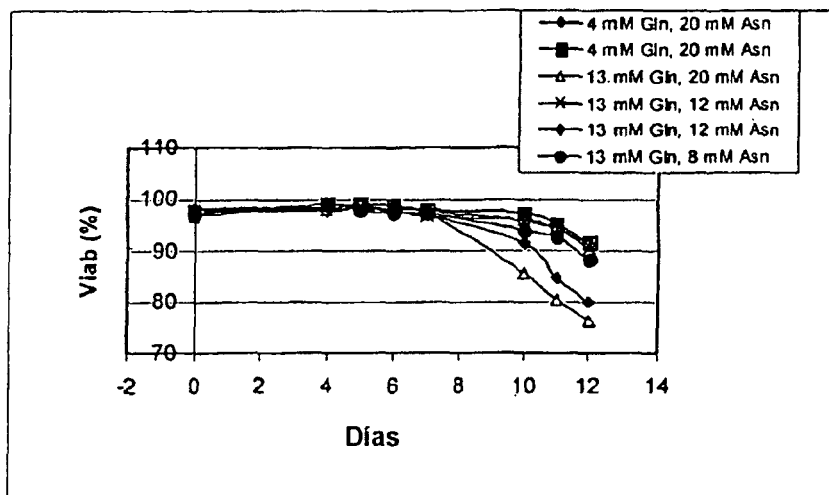


Figura 36. Niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

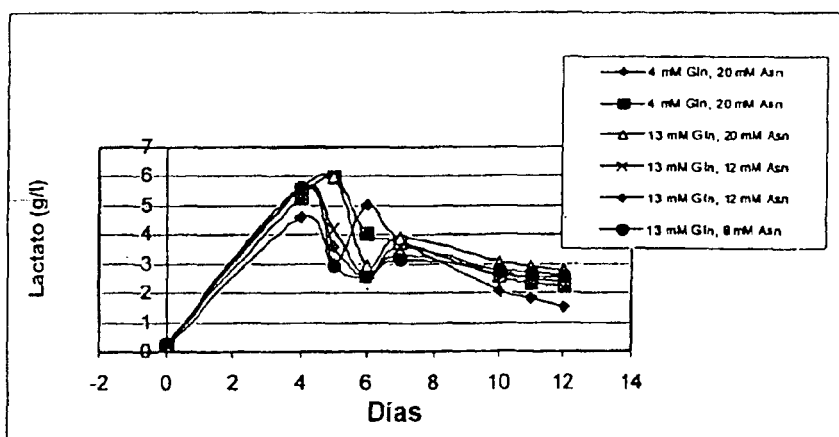


Figura 37. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

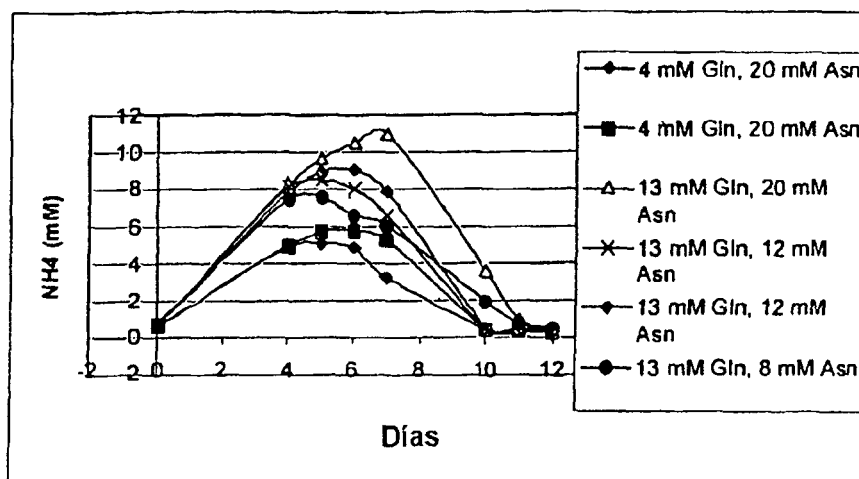


Figura 38. Niveles de glutamina de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

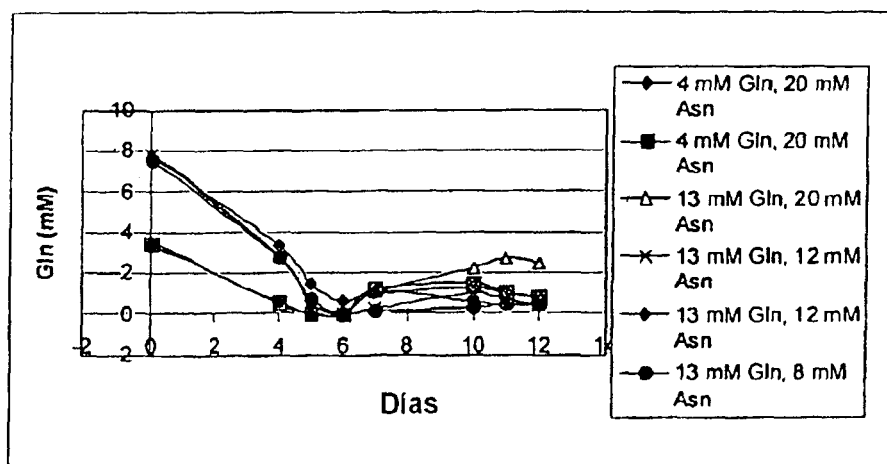


Figura 39. Título de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

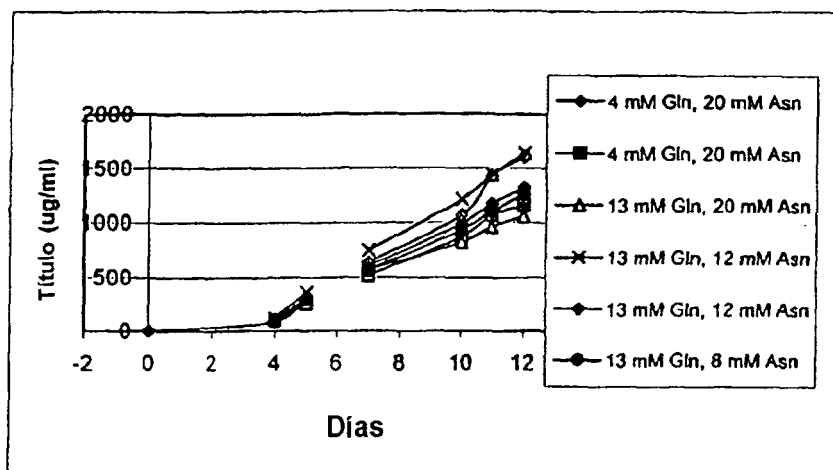


Figura 40. Osmolaridad de cultivo de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene diversos niveles de glutamina y asparagina.

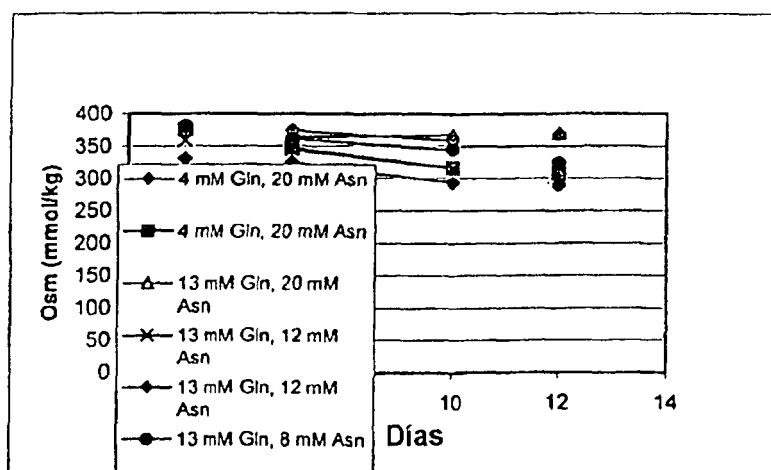


Figura 41. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

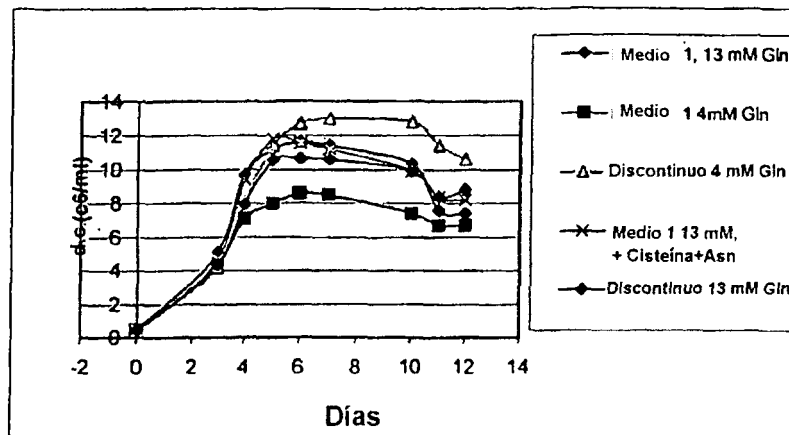


Figura 42. Niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

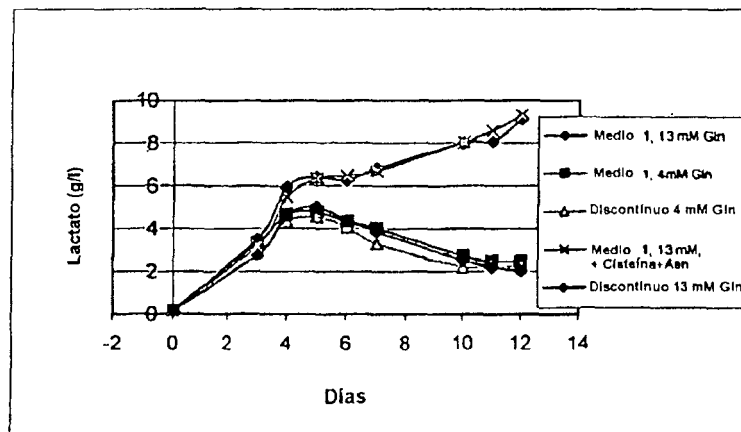


Figura 43. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

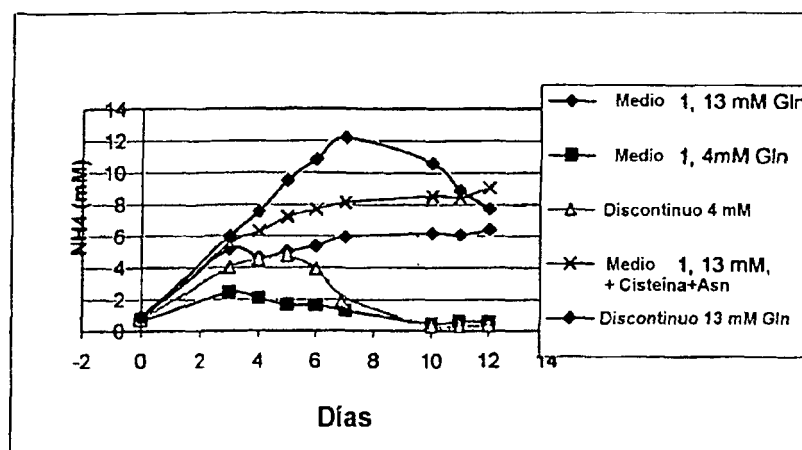


Figura 44. Niveles de glutamina de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

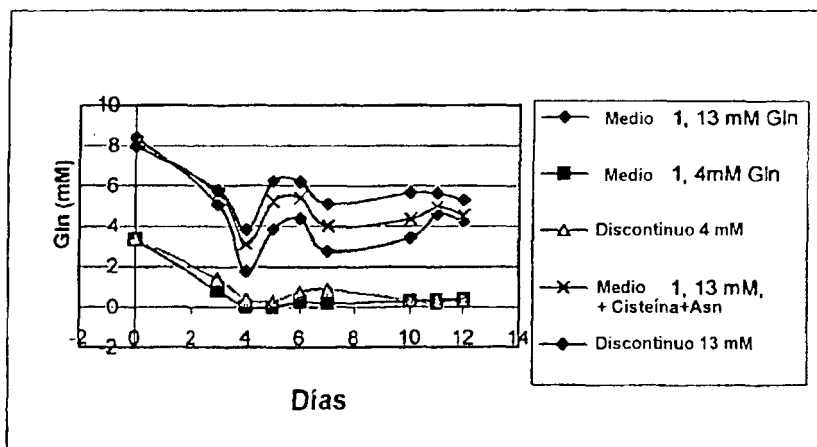


Figura 45. Niveles de glutamato de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

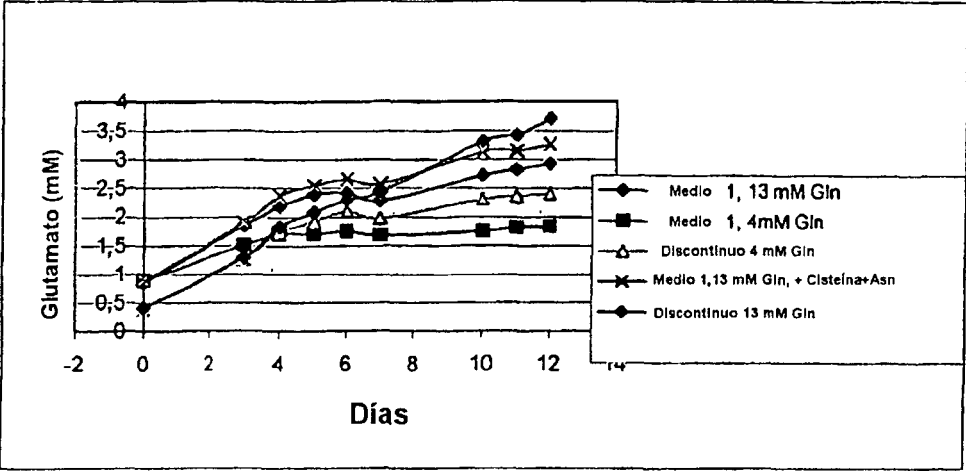


Figura 46. Título de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

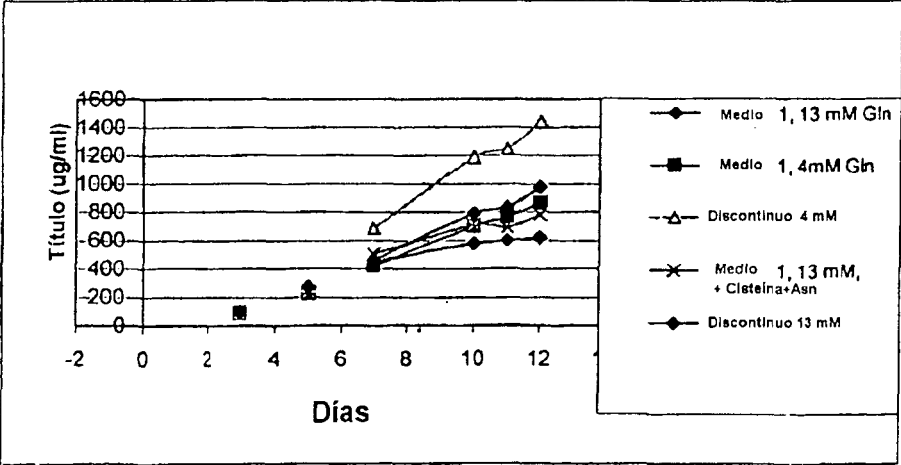


Figura 47. Osmolaridad de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de asparagina y cisteína.

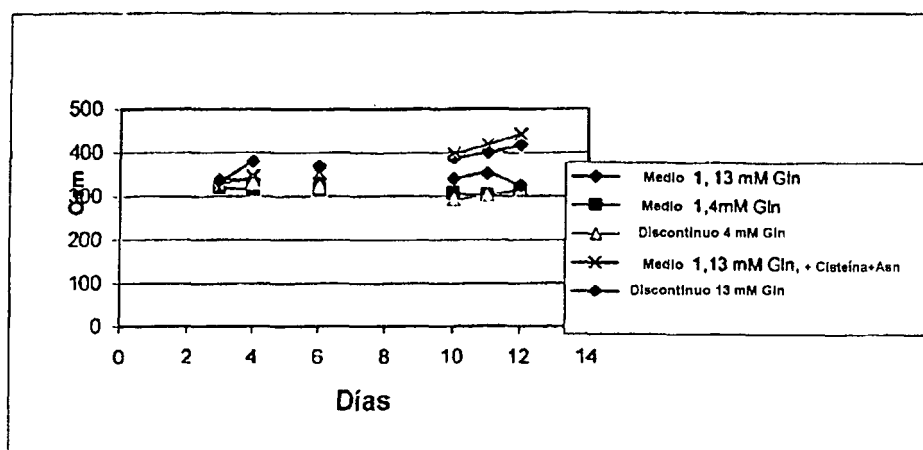


Figura 48. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

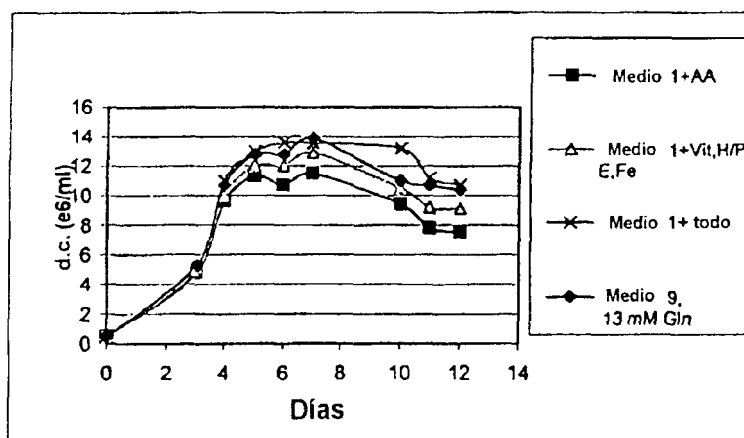


Figura 49. Niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

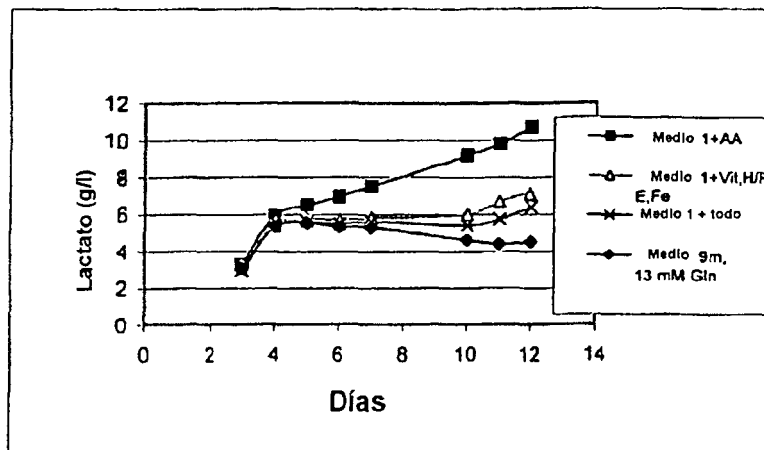


Figura 50. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

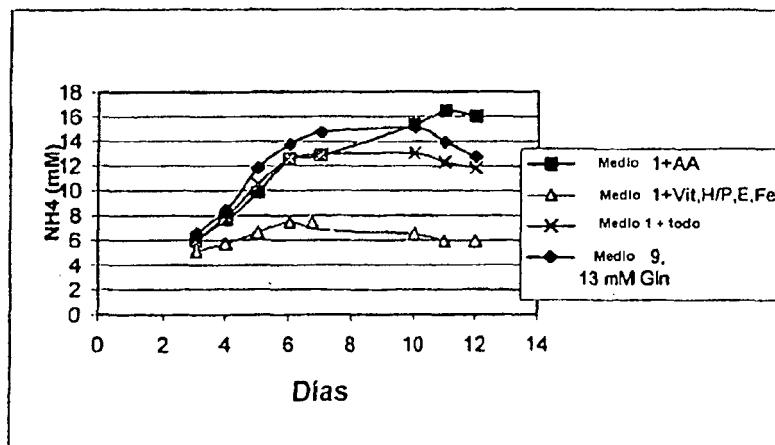


Figura 51. Niveles de glutamina de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas.

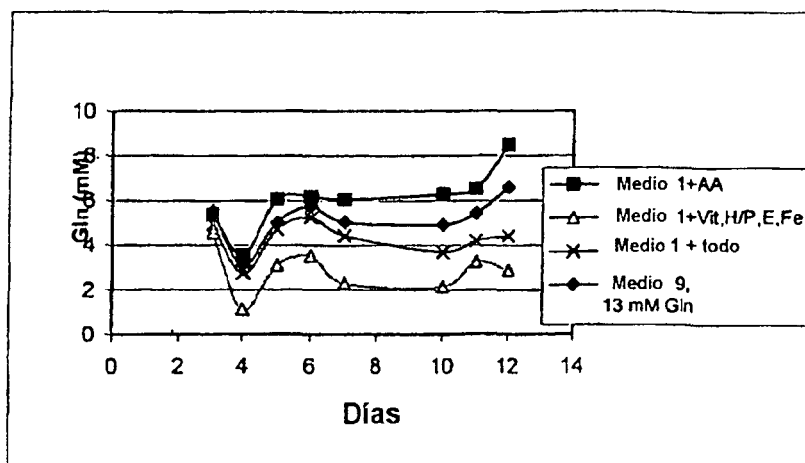


Figura 52. Título de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de aminoácidos y vitaminas

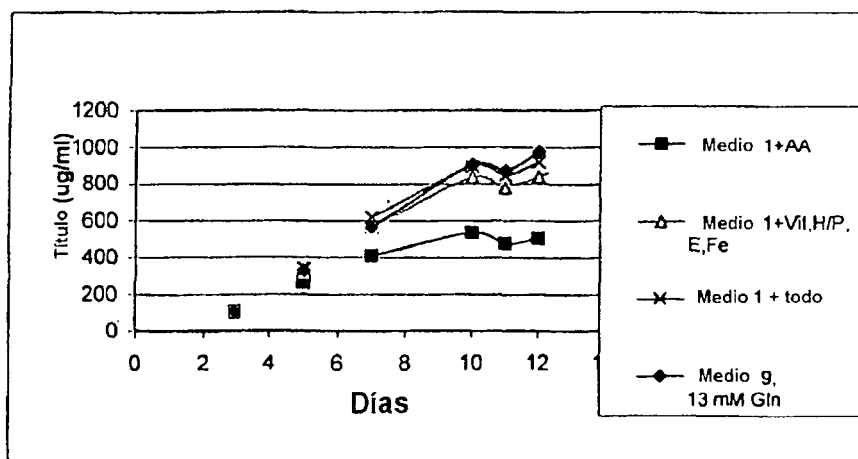


Figura 53. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

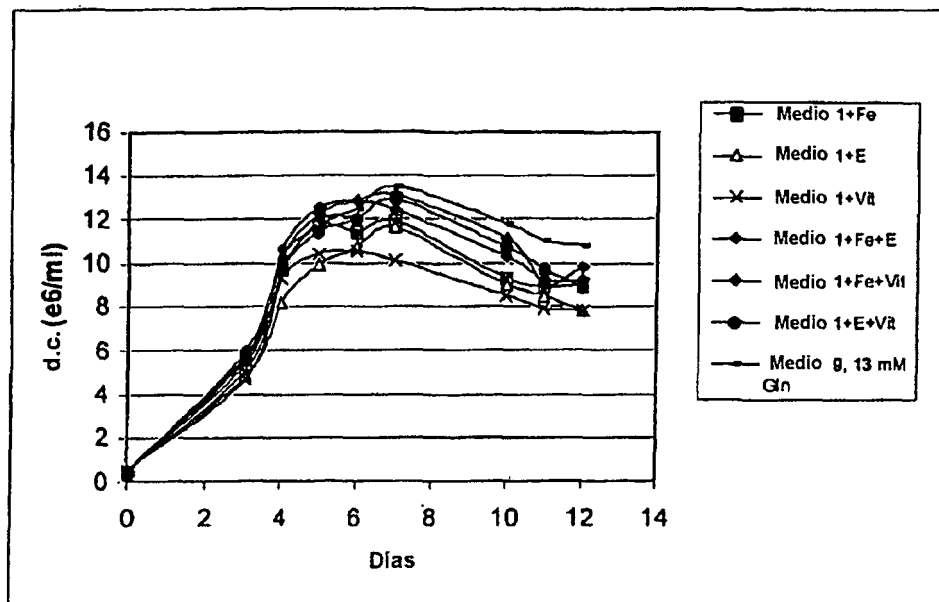


Figura 54. Niveles de lactato de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

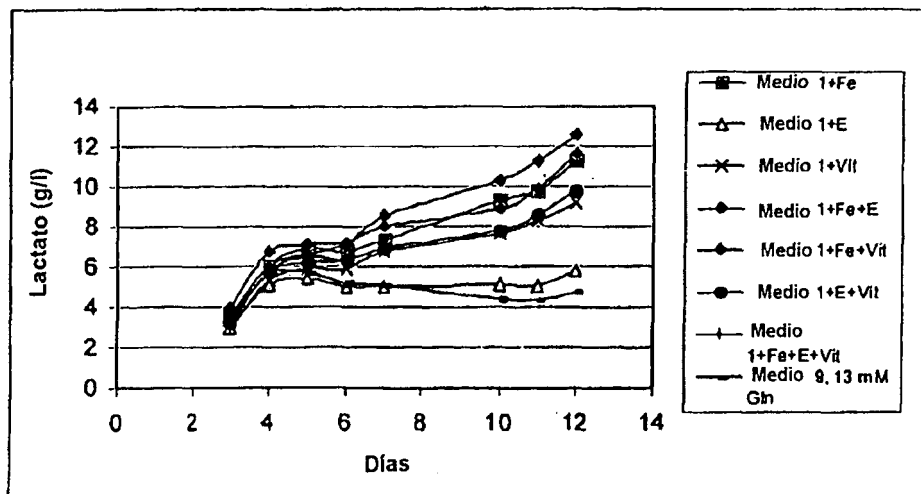


Figura 55. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

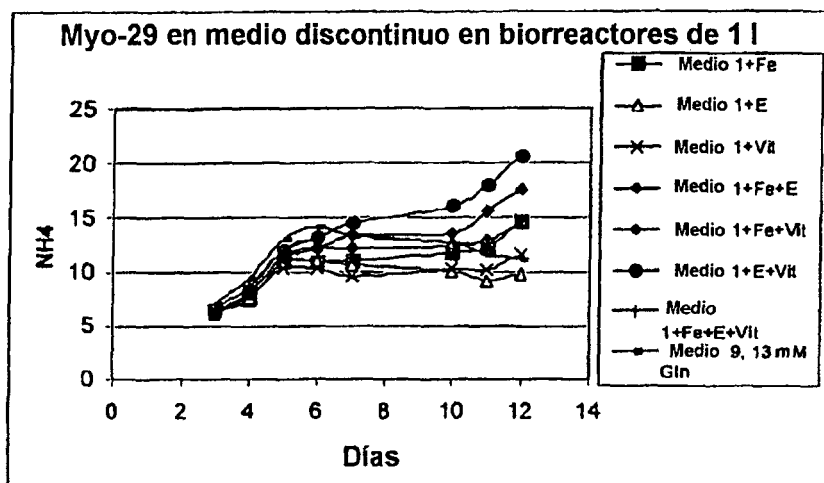


Figura 56. Título de anti-GDF-8 en medios que contienen diversos niveles de vitaminas, oligoelementos E y hierro.

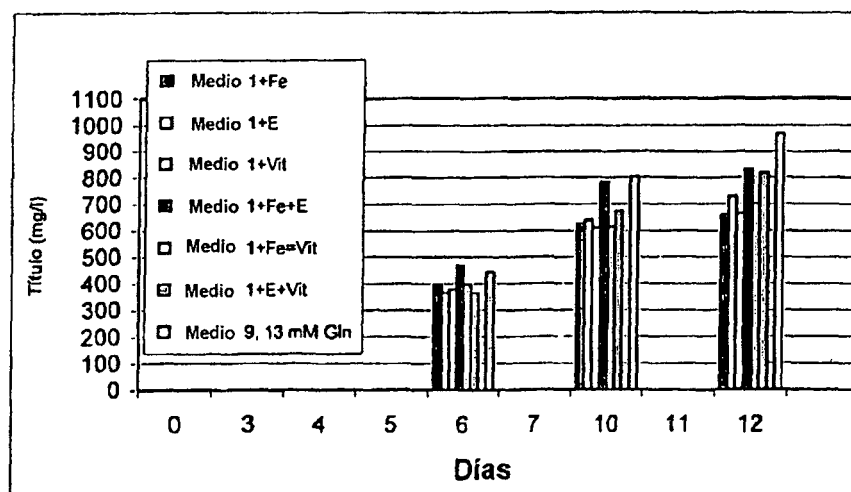


Figura 57. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medios 1, 3 y 9.

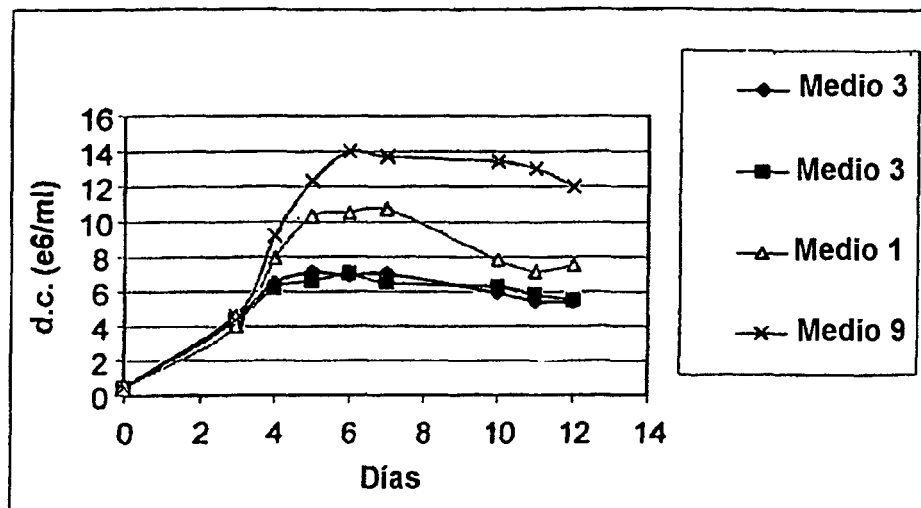


Figura 58. Título de anti-GDF-8 en Medios 1, 3 y 9.

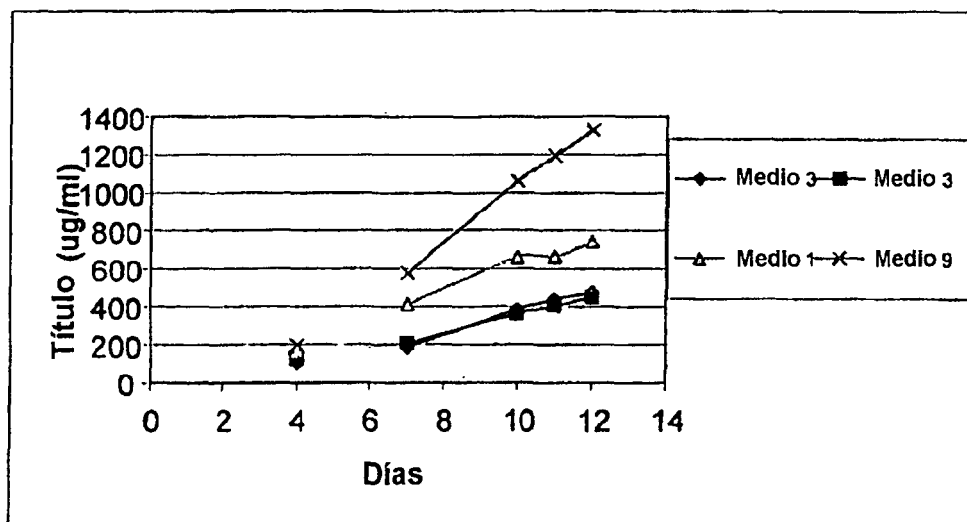


Figura 59. Título de anti-GDF-8 extrapolados para diversos niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina combinadas total.

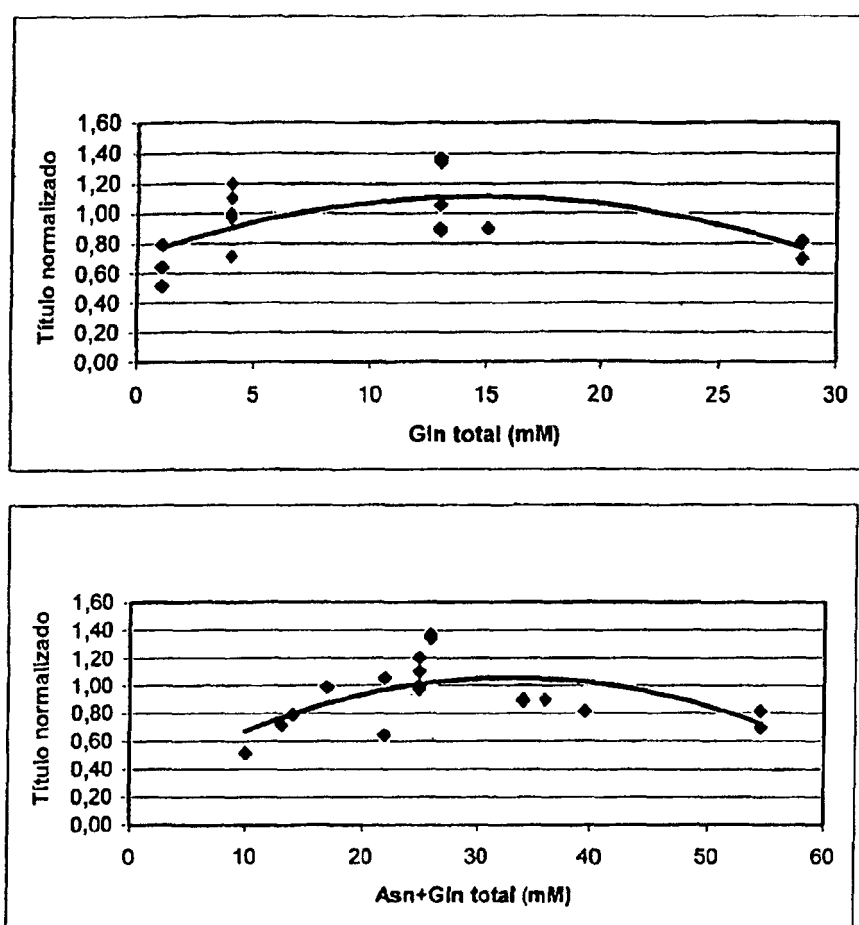


Figura 60. Crecimiento de células anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

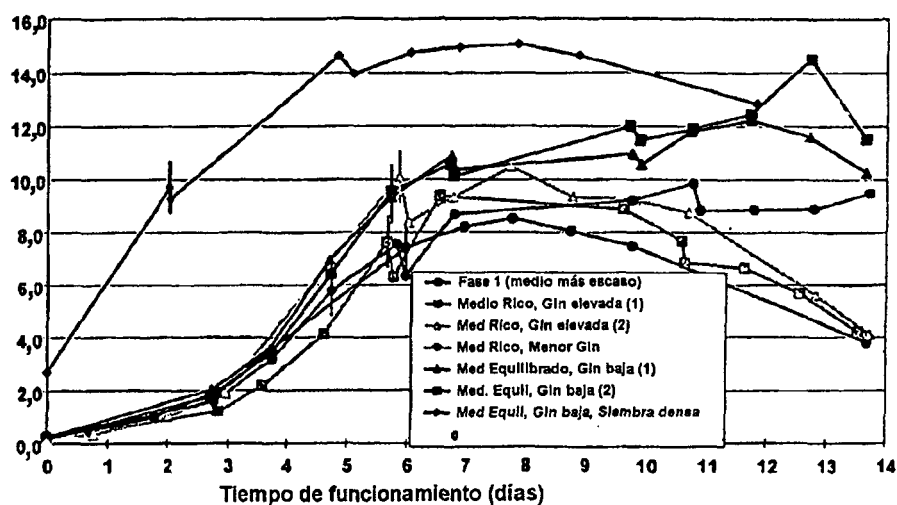


Figura 61. Viabilidad de células anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

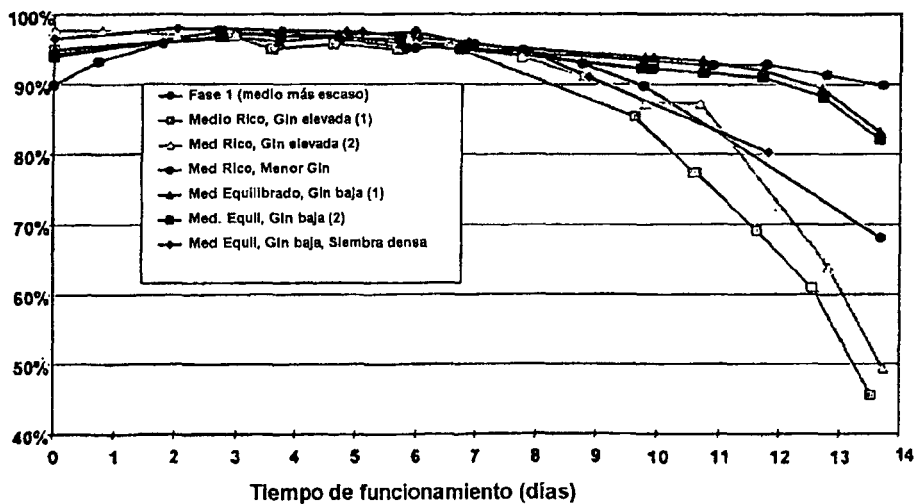


Figura 62. Niveles de lactato de cultivos de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

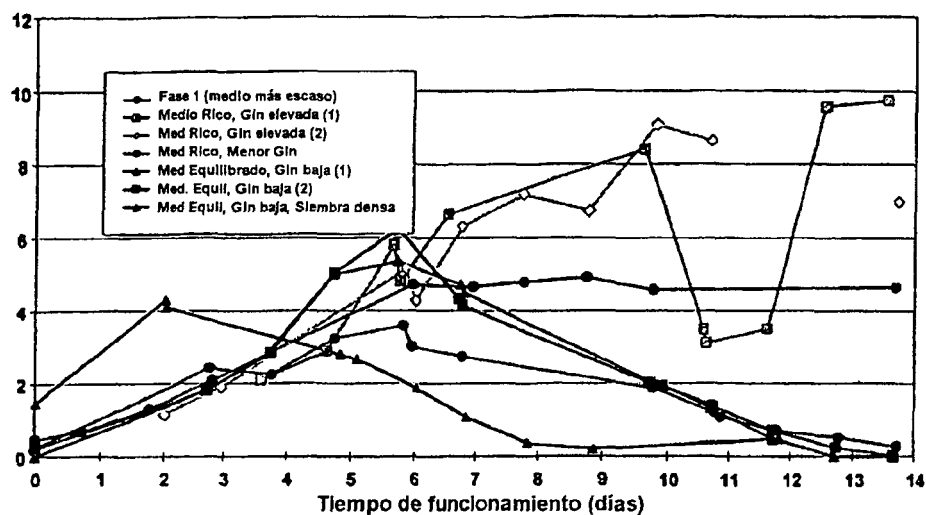


Figura 63. Niveles de amonio de cultivos de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

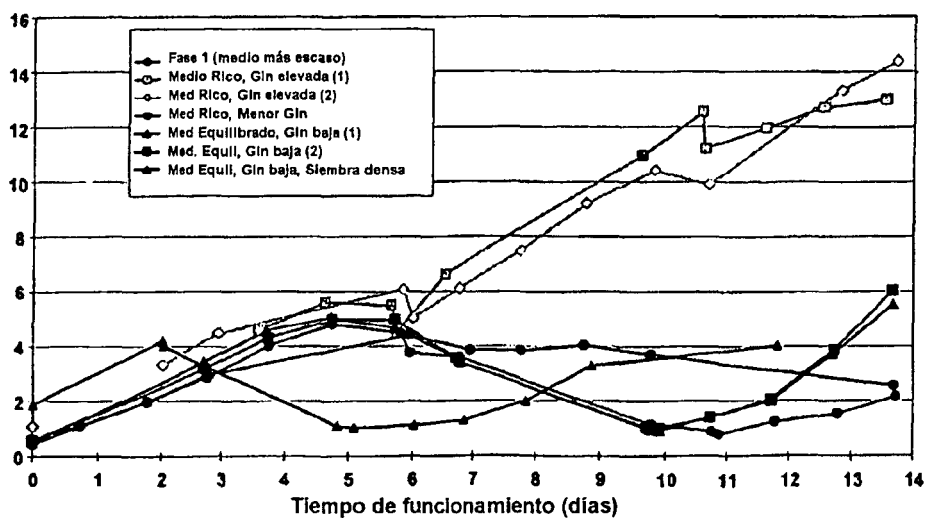


Figura 64. Título de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

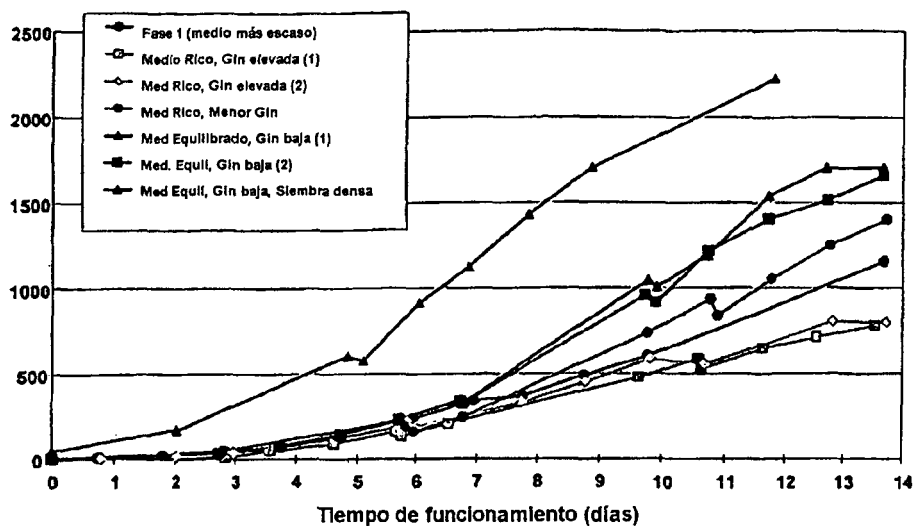


Figura 65. Osmolaridad de cultivos de anti-ABeta en diversas condiciones de medios ensayadas.

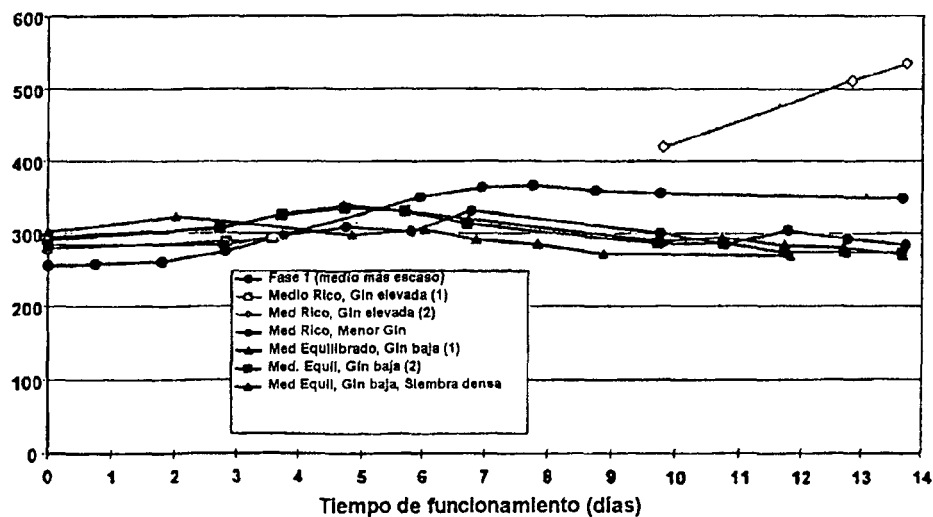


Figura 66. Crecimiento de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

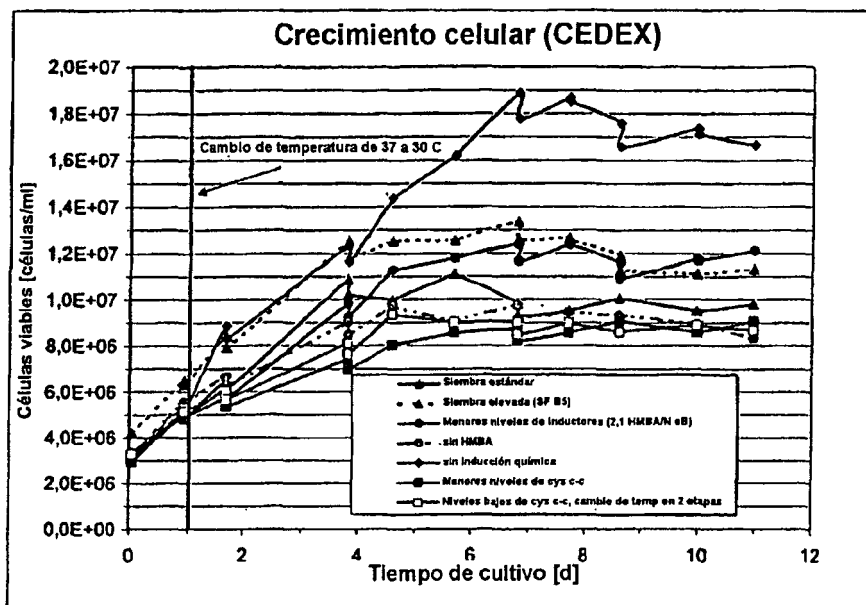


Figura 67. Viabilidad de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

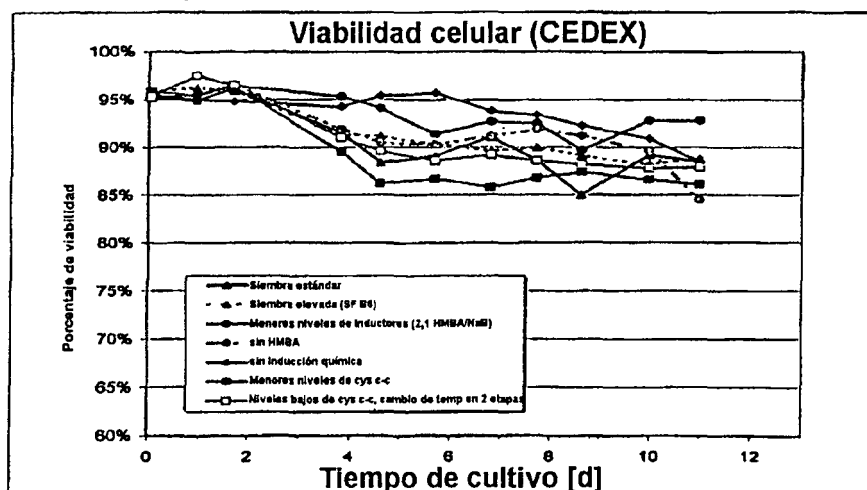


Figura 68. Glucosa residual en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

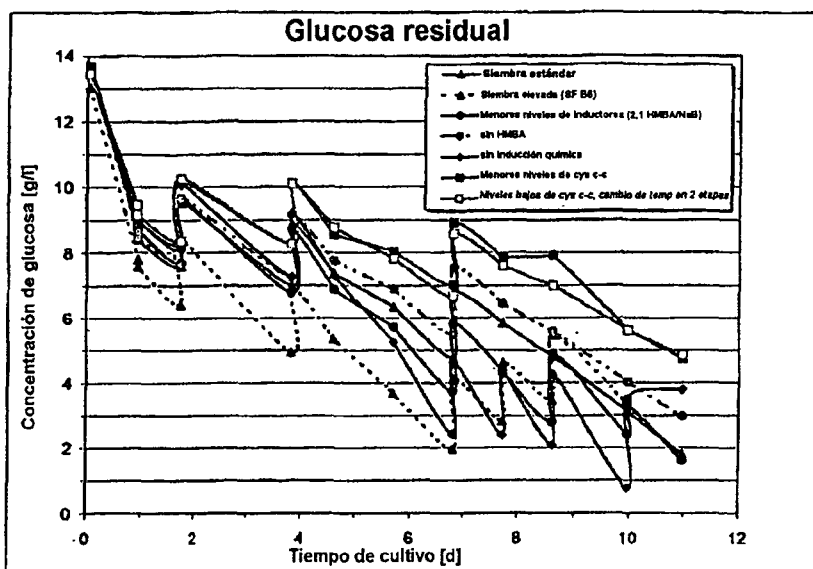


Figura 69. Niveles de glutamina en cultivo de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

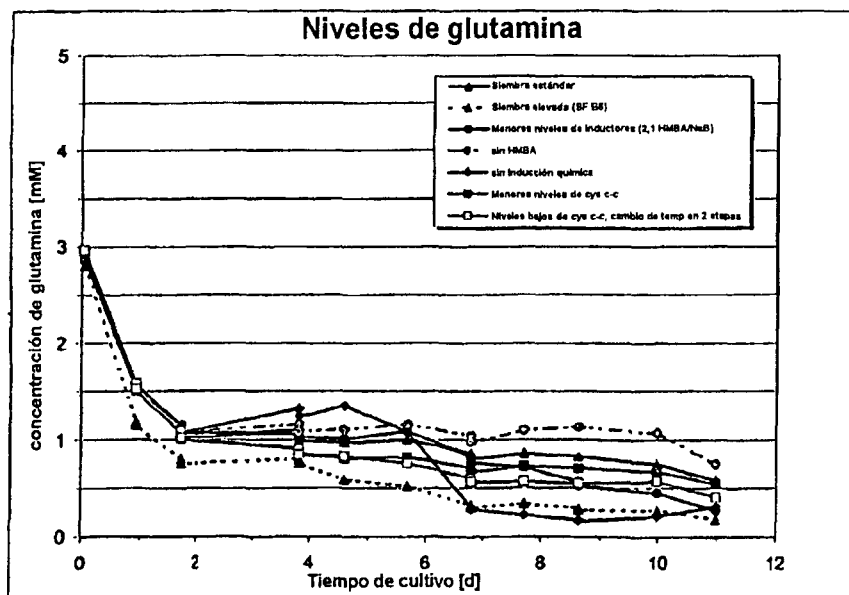


Figura 70. Concentración de lactato en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

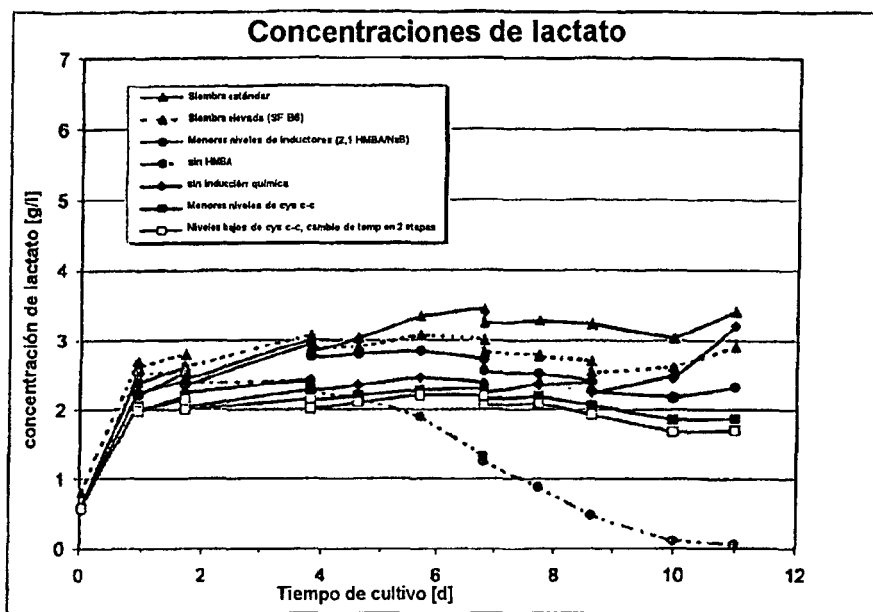


Figura 71. Niveles de amonio en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

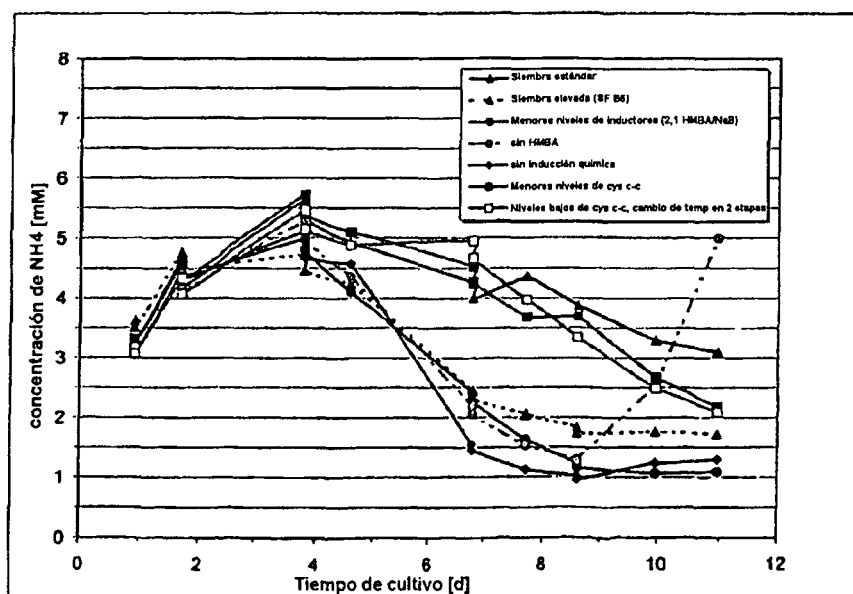


Figura 72. Título relativo de TNFR-Ig en diversas condiciones experimentales.

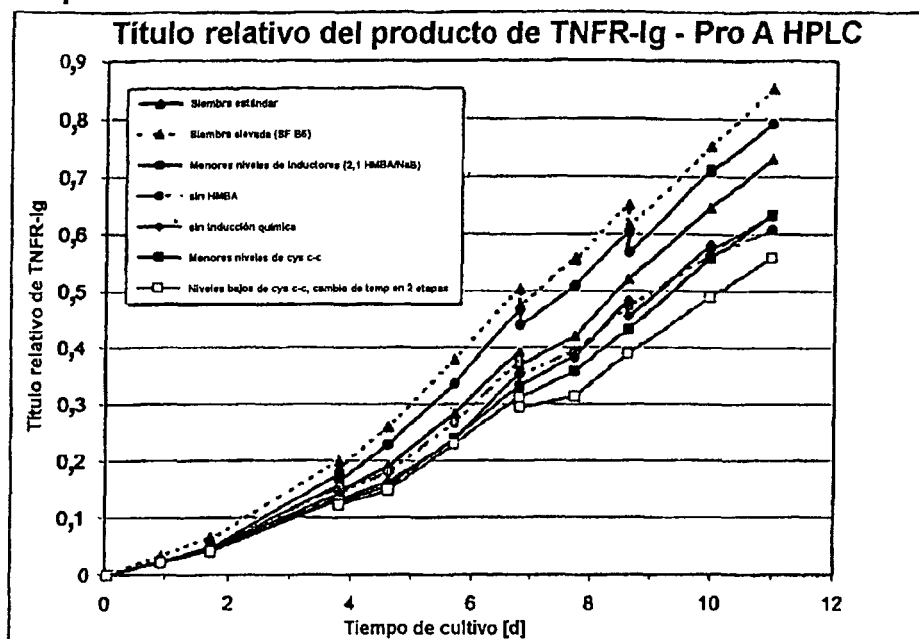


Figura 73. Densidades celulares de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

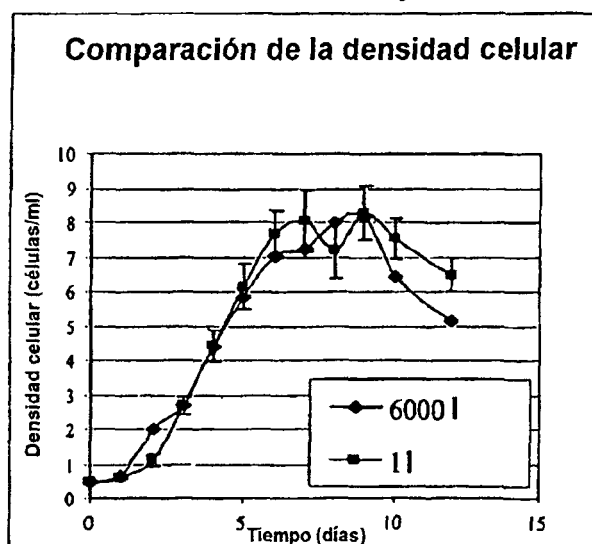


Figura 74. Títulos de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

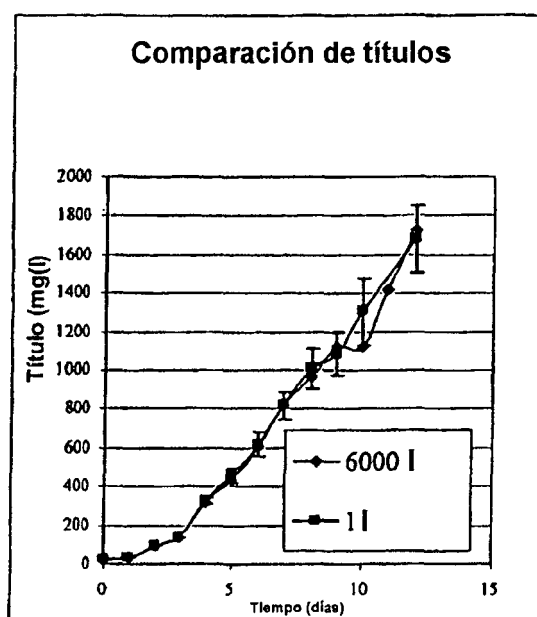


Figura 75. Niveles de lactato de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

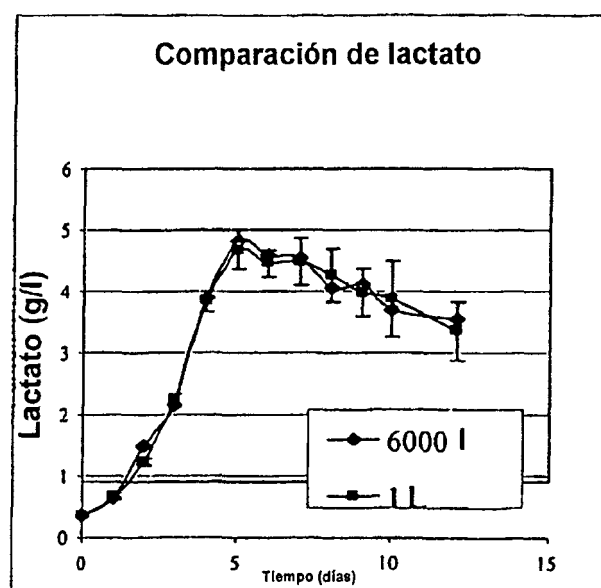


Figura 76. Niveles de amonio de células anti-GDF-8 que se hicieron crecer en biorreactores de 6000 l y 1 l.

