



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 833 471**

⑮ Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014 E 18161278 (9)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3351620**

⑭ Título: **Cultivo celular metabólicamente optimizado**

⑩ Prioridad:

11.10.2013 US 201361889815 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.06.2021

⑬ Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6706, US**

⑭ Inventor/es:

**LAWRENCE, SHAWN;
KIM, ANN y
JOHNSON, AMY**

⑭ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 833 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cultivo celular metabólicamente optimizado

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a células que cambian metabólicamente al consumo de lactato en cultivo celular. Un cambio a un perfil metabólico de consumo de lactato en el cultivo en tren de semillas tiene efectos 10 beneficiosos sobre el cultivo de producción. Tras la inoculación del reactor de producción, las células exhiben un metabolismo de lactato más eficiente con una tasa de producción de lactato baja, niveles máximos de lactato bajos, un cambio temprano al consumo de lactato y, subsecuentemente, una mayor productividad de células de mamíferos 15 en cultivos en lotes alimentados. Así, se proporciona un método mejorado para la producción a gran escala de proteínas y/o polipéptidos en cultivo celular.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los agentes biológicos, en particular proteínas y polipéptidos, están en proceso de desarrollo con mayor 20 frecuencia como nuevos productos farmacéuticos. Las células manipuladas por ingeniería genética que producen niveles inusualmente altos de la proteína particular de interés se han vuelto de importancia crítica para la producción comercial exitosa de estas intervenciones farmacéuticas. El control y la optimización de las condiciones del cultivo 25 celular varían y tienen un gran efecto sobre el nivel y la calidad de la proteína terapéutica que se produce en cultivo.

Es habitual fabricar proteínas mediante cultivo celular en un proceso en lotes o en lotes alimentados. Las 30 primeras etapas del crecimiento del inóculo después de la descongelación del frasco incluyen el cultivo de células en un cultivo de semillas. Típicamente, las células se cultivan a una tasa de crecimiento exponencial, como en biorreactores en tren de semillas, con el fin de aumentar progresivamente el tamaño y/o el volumen de la población celular. Despues de aumentar la masa celular a través de varias etapas de biorreactor, las células se transfieren a un 35 biorreactor de producción mientras las células todavía están en crecimiento exponencial (fase logarítmica) (Gambhir, A. y otros, 2003, J Bioscience Bioeng 95(4):317-327). Generalmente se considera indeseable permitir que las células en cultivo en lote, por ejemplo cultivo de semillas, pasen de la fase logarítmica a la fase estacionaria. Se ha recomendado que los cultivos se pasen mientras están en fase logarítmica, antes de que las células, por ejemplo, las 40 células adherentes, alcancen la confluencia debido a la inhibición por entrar en contacto o a la acumulación de productos de desecho, que inhibía el crecimiento celular, entre otras razones (Cell Culture Basics, Gibco/Invitrogen Manual en línea, www.invitrogen.com; ATCC® Animal Cell Culture Guide, www.atcc.org).

Después de la transferencia a un cultivo en lote alimentado, las células se cultivan durante un período de 45 tiempo mientras que la composición del medio se monitorea y se controla para permitir la producción de la proteína o polipéptido de interés. Despues de que se alcanza un rendimiento o viabilidad celular particular, la acumulación de desecho o el agotamiento de nutrientes determina que el cultivo debe terminarse, se aísla la proteína o polipéptido que se producen. Se han hecho muchos avances importantes durante la última década con la intención de mejorar el 50 rendimiento de las proteínas recombinantes, que actualmente alcanza títulos de múltiples gramos por litro. Los avances en los procesos de fabricación de proteínas, así como también en la ingeniería de líneas celulares y el desarrollo de medios de cultivo celular y piensos, han contribuido al aumento del rendimiento de las proteínas.

La producción en lotes alimentados implica la adición de pequeños volúmenes de alimento para suplementar 55 los nutrientes presentes en el biorreactor a medida que progresa el crecimiento celular y la producción del producto. Se entiende que, en general, las células de mamíferos tienden a metabolizar continuamente los carbohidratos, lo que da como resultado la acumulación de lactato, que requiere la adición de bases para neutralizar el ácido láctico. La adición de base eleva la osmolalidad en el medio celular, lo que a su vez restringe en gran medida la viabilidad y/o 60 productividad celular global alcanzable en el biorreactor. La acumulación de lactato en el medio es perjudicial para el crecimiento celular y es uno de los factores comunes que limitan la productividad máxima que puede lograrse en el cultivo en lotes. En un cultivo celular en lote típico, el crecimiento y la productividad se inhiben después de que la 65 concentración de lactato en el cultivo alcanza aproximadamente 30-50 mM y/o la concentración de amoníaco alcanza 3-5 mM (Ozturk, SS, Riley, MR y Palsson, BO 1992. Biotechnol and Bioeng. 39:418-431). Hasta la fecha, los esquemas ampliamente adoptados incluyen la suplementación de nutrientes y el diseño de medios libres de suero químicamente 70 definidos para apoyar el crecimiento celular continuo y la secreción óptima del producto.

Los esfuerzos particularmente relacionados con la reducción de la producción de productos de desecho 75 metabólicos, como la acumulación de lactato en el cultivo celular, han mejorado la cantidad total de títulos de proteínas finales. Estos esfuerzos se centran en procesos de alimentación en lotes controlados con glucosa o limitados por nutrientes (ver, por ejemplo, WO2004104186; US8192951B2), condiciones mejoradas del medio de cultivo celular (por ejemplo, US7390660; Zagari, y otros, 2013, New Biotechnol., 30(2):238-45), o ingeniería celular, que incluye enzimas dirigidas a la vía de la glucólisis (por ejemplo, Kim, SH y Lee, GM, 2007, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 152-159; Kim, SH y Lee, GM, 2007, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 659-665; Wlaschin, KF y Hu, W-S., 2007, J. Biotechnol. 131, 168- 80 176).

La alimentación controlada de las células se usa en un esfuerzo por alcanzar un fenotipo metabólico más eficiente (Europa, AF, y otros, 2000, Biotechnol. Bioeng. 67:25-34; Cruz y otros, 1999, Biotechnol Bioeng, 66(2):104-113; Zhou y otros, 1997, Cytotechnology 24, 99-108; Xie y Wang, 1994, Biotechnol Bioeng, 43: 1174-89). Sin embargo, esto se complica por el hecho de que la privación de nutrientes, así como también los cambios rápidos en, por ejemplo, la concentración de amoníaco observados en cultivos en lote alimentados de alta densidad celular, pueden inducir la apoptosis ("muerte celular programada") (Newland y otros, 1994, Biotechnol. Bioeng. 43(5):434-8). Por lo tanto, un enfoque común de optimización es cultivar células a una densidad moderadamente alta en lote alimentado y luego inducir deliberadamente una fase estacionaria productiva prolongada mediante, por ejemplo, un cambio de temperatura o pH (Quek y otros, 2010, Metab Eng 12(2):161-71. doi: 10.1016/j.ymben.2009.09.002. Epub 2009 Oct 13).

Técnicas de optimización, tales como las discutidas *supra*, se han centrado en el cultivo de células por lotes alimentados y este proceso dependiente de nutrientes debe adaptarse para cada célula huésped diseñada por ingeniería genética para la producción de un polipéptido de interés. Los métodos para adaptar las células a consumidoras de lactato en cultivo son muy codiciados en el proceso de fabricación de terapias biológicas. La optimización de una línea celular con un fenotipo metabólico para el consumo de lactato resultaría beneficiosa para la producción comercial de polipéptidos. Mulukutla BC y otros, describen el cambio metabólico al consumo de lactato en cultivos de células de mamíferos por lotes alimentados. (2011, Metab Eng., 14(2):138-49). Zagari F. y otros, describen el cambio al metabolismo del lactato en el cultivo de células CHO y el papel de la actividad oxidativa mitocondrial (2013, N Biotechnol., 30(2):238-45). Young DJ describe el recableado del flujo metabólico en cultivos de células de mamíferos (2013, Curr Opin Biotechnol., 24(6):1108-1115). Zhou W. y otros, describen un cultivo por lote alimentado de células de mieloma NS0 recombinantes con alta producción de anticuerpos monoclonales (1997, Biotechnol Bioeng., 55(5):783-92). Li F. y otros, describen procesos de cultivo celular para la producción de anticuerpos monoclonales (2010, MAbs., 2(5):466-79). Le H. y otros, describen un análisis multivariado de datos de bioprocessos de cultivos celulares y consumo de lactato como indicador de proceso (2012, J Biotechnol. 162(2-3):210-23). El documento núm. US8470552 B2 describe una estrategia para reducir la producción de ácido láctico y controlar el pH en cultivos de células animales. Sheikholeslami Z. y otros, describen el impacto del momento de la inducción sobre el metabolismo y la productividad de las células CHO en cultivo (2013, Biochem Eng J., 79:162-171). Ma N. y otros, describen un alimento con un solo nutriente que admite procesos por lotes alimentados químicamente definidos con NS0 y CHO: Improved productivity and lactate metabolism (2009, Biotechnol Prog. 25(5):1353-63).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona un método para producir una proteína de interés que comprende:

- 35 (a) cultivar células que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés en un primer cultivo celular;
- 40 (b) determinar que ha ocurrido un cambio metabólico al consumo de lactato en dicho primer cultivo celular;
- 45 (c) transferir células de dicho primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después de que haya ocurrido dicho cambio metabólico al consumo de lactato;
- (d) mantener dicho segundo cultivo celular durante un período de tiempo para que dicha proteína de interés se acumule en dicho segundo cultivo celular;
- (e) cosechar dicha proteína de interés a partir de dicho segundo cultivo celular; y
- 50 (f) purificar dicha proteína de interés.

La descripción proporciona células y métodos de cultivo de células que cambian metabólicamente al consumo de lactato. Las células adaptadas metabólicamente son ideales para la producción de proteínas a gran escala.

Un aspecto de la invención es un método de cultivo de células que comprende transferir células desde un primer cultivo celular hacia un segundo cultivo celular después de que ocurre un cambio metabólico al consumo de lactato en las células en el primer cultivo.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para cultivar células que comprende cultivar células en un primer cultivo celular, determinar que ocurrió un cambio metabólico al consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular y transferir las células a un segundo cultivo celular después de que ocurrió un cambio metabólico al consumo de lactato en las células, en donde la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato durante el segundo cultivo. En una modalidad, el método proporciona, además, una disminución en la acumulación de lactato en el segundo cultivo celular en comparación con la determinada en un cultivo celular por lo demás idéntico en condiciones por lo demás idénticas, excepto que la transferencia de células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico en el primer cultivo celular.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para producir una proteína que comprende transferir células desde un primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después de que haya ocurrido un cambio metabólico al consumo de lactato en las células, y mantener el segundo cultivo celular durante un período de tiempo para que la proteína se acumule en el cultivo celular. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para producir una proteína que comprende cultivar células en un primer cultivo celular, determinar que ha ocurrido un cambio metabólico al consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular, transferir las células a un segundo cultivo celular después de que ocurra el cambio metabólico al consumo de lactato en las células y mantener el segundo cultivo celular durante un período de tiempo para que la proteína se acumule en el cultivo celular. En una modalidad, el método proporciona, además, un aumento de la productividad en el segundo cultivo celular en comparación con el determinado en un cultivo celular por lo demás idéntico en condiciones por lo demás idénticas, excepto que la transferencia de células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico en el primer cultivo celular.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un método mejorado de cultivo de células, en donde las células comprenden un gen que codifica un polipéptido de interés, que comprende las etapas de: cultivar células en un primer cultivo celular, mantener el primer cultivo celular en condiciones que permitan la expansión de la masa celular, transferir las células a un segundo cultivo celular después de que ocurra el cambio metabólico al consumo de lactato en las células, mantener el segundo cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés y cosechar el polipéptido de interés del segundo cultivo celular. En una modalidad, el método comprende, además, determinar que ha ocurrido un cambio metabólico al consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método mejorado para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende las etapas de: transfectar células con ADN que codifica un polipéptido de interés, cultivar las células en un primer cultivo celular, transferir las células a un segundo cultivo celular después de que ocurra el cambio metabólico al consumo de lactato en las células, en donde el polipéptido de interés se expresa en condiciones de un segundo cultivo celular, y mantener el segundo cultivo celular durante un período de tiempo para que el polipéptido se acumule en el cultivo celular. En una modalidad, el método comprende, además, determinar que ha ocurrido un cambio metabólico al consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular.

Un quinto aspecto de la invención proporciona un método para producir una línea celular modificada metabólicamente, que comprende las etapas de: mantener una población celular en un primer cultivo celular en condiciones que permitan la expansión de la masa celular, determinar cuándo ocurre un cambio metabólico al consumo de lactato en las células, transferir una fracción de la población celular desde el primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después de que ocurra el cambio metabólico al consumo de lactato en las células, mantener la población celular en el segundo cultivo celular durante un período de tiempo y, opcionalmente, cosechar las células, y así se produce la línea celular metabólicamente modificada.

Otro aspecto de la descripción proporciona una línea celular metabólicamente modificada, producida por cualquiera de los métodos de la invención que se describen en la presente descripción.

En algunas modalidades, la célula metabólicamente modificada que se produce por el método de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico integrada en el genoma celular en donde la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido o proteína de interés. En otras modalidades, la célula metabólicamente modificada que se produce por el método de la invención comprende un vector de expresión que codifica un polipéptido o proteína de interés.

En una modalidad, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta mediante mediciones de pH, de lactato o de base en el primer cultivo celular. En otras modalidades, las células se transfieren a un segundo cultivo celular cuando se detecta el consumo de lactato. En otras modalidades más, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta después de que el pH aumenta en el primer medio de cultivo celular sin adición de base. En otras modalidades, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta cuando los niveles de lactato se estabilizan en el primer cultivo celular. En otras modalidades más, el método comprende, además, determinar el cambio metabólico, que comprende: medir el pH en el primer cultivo celular, agregar base para mantener el pH por encima de un límite inferior predeterminado, determinar que el pH está por encima del límite inferior predeterminado para intervalos consecutivos, y cesar la adición de base, para así determinar que el cambio metabólico al consumo de lactato ha ocurrido en el primer cultivo celular.

En otras modalidades, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta mediante indicadores o productos del metabolismo celular, que incluyen pero no se limitan al consumo de oxígeno, y metabolitos tales como glicina, triptófano, fenilalanina, adenina, ácido palmitíco, ácido glutámico, metionina y asparagina. En otra modalidad, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta mediante análisis metabolómico o análisis proteómico.

En una modalidad, el cambio metabólico ocurre cuando las células emergen de la fase logarítmica (*es decir* crecimiento exponencial) en el primer cultivo celular. En otra modalidad, las células se transfieren después de que las células emergen de la fase logarítmica en el primer cultivo celular.

En otra modalidad, el cambio metabólico ocurre cuando las células alcanzan la fase de crecimiento estacionario en el primer cultivo celular. En otra modalidad, las células se transfieren después de que las células alcanzan la fase de crecimiento estacionario en el primer cultivo celular.

5 En una modalidad, el cambio metabólico ocurre en el primer cultivo celular en o después de 3 días de crecimiento celular en el primer cultivo celular. En otra modalidad, el cambio metabólico ocurre en el primer cultivo celular en o después de 3,5 días de crecimiento celular en el primer cultivo celular.

10 En algunas modalidades, el primer cultivo celular es un cultivo de semilla. En algunas modalidades, el segundo cultivo celular es un cultivo en lotes alimentados. En otras modalidades, el segundo cultivo celular es un cultivo de producción. En otras modalidades, el segundo cultivo celular se realiza en un biorreactor de producción.

15 En otras modalidades más, las células se transfieren al segundo cultivo celular a una densidad celular inicial mayor o igual a aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/mL. En algunas modalidades, las células se transfieren al segundo cultivo celular a una densidad celular inicial entre aproximadamente $0,5-3,0 \times 10^6$ células/mL.

20 En algunas modalidades, la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato, por ejemplo, el consumo neto de lactato se logra en o después de 2 días, 3 días, 4 días o 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En más modalidades, la disminución de la acumulación de lactato es una reducción de la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la reducción de la concentración máxima de lactato ocurre en el segundo cultivo celular en o después de 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular es menos de aproximadamente 6 g/L, 5 g/L, 4 g/L, 3 g/L, 2 g/L, o menos de aproximadamente 1 g/L.

25 En algunas modalidades de la invención, la célula o células se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, COS, de retina, Vero, CV1, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431, CV-1, U937, 3T3, células L, células C127, SP2/0, NS-0, MMT, PER.C6, linfoides murinas y de hibridoma murino.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 Figura 1: Se usó un recipiente de semilla de línea celular CHO productora de proteína de fusión para inocular biorreactores de producción replicados en (**Figura 1A**) tres estados metabólicos diferentes (pH en línea y lactato fuera de línea) y recuentos de células viables (VCC). Además, se muestra el uso de base normalizado a 1 para el recipiente de semillas. Los parámetros (tiempo, pH, lactato, VCC y base) para cada cultivo celular (Condición #1, #2, y #3) para los cuales las células se transfirieron a biorreactores de producción se indican mediante rectángulos abiertos (línea de puntos). Todos los biorreactores de producción se hicieron funcionar con las mismas condiciones de funcionamiento. Se muestra el impacto de cada tren de semillas y su estado metabólico sobre el título de proteínas (**Figura 1B**) y lactato (**Figura 1C**) en un biorreactor de producción. Las líneas de tendencia de los biorreactores de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan \pm una desviación estándar.

40 Figura 2: Se usó un recipiente de semilla de línea celular CHO productora de anticuerpos para inocular biorreactores de producción replicados en un proceso químicamente definido en (**Figura 2A**) cuatro estados metabólicos diferentes (pH y lactato fuera de línea) y recuentos de células viables. Los parámetros (tiempo, pH, lactato y VCC) para cada cultivo celular (Condición #1, #2, #3 y #4) para los que las células se transfirieron a biorreactores de producción se indican mediante rectángulos abiertos (líneas de puntos). Todos los biorreactores de producción se hicieron funcionar con las mismas condiciones de funcionamiento. La condición #1 se perdió después de una semana. Además, se muestra el impacto de cada tren de semillas y su estado metabólico sobre un título de proteína del biorreactor de producción (**Figura 2B**) y la acumulación de lactato (**Figura 2C**). Las líneas de tendencia de los biorreactores de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan \pm una desviación estándar.

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

55 Debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares que se describen, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología que se usa en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

60 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Así, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos y/o etapas del tipo que se describe en la presente descripción y/o que resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer esta descripción.

5 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en la presente descripción pueden usarse en la práctica de la presente invención, a continuación se describirán métodos y materiales particulares.

Cultivo de células

10 "Cultivo en lotes" o "modo en lotes" como se usa en la presente descripción es una frase que se refiere a una unidad (por ejemplo, recipiente de cultivo) que está lleno de células y con un volumen completo de trabajo inicial de medio que nunca se intercambia. En tal cultivo en lotes, todos los componentes para el cultivo celular se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del proceso de cultivo. El cultivo generalmente se hace funcionar hasta que se agotan los nutrientes o los productos de desecho alcanzan niveles tóxicos y las células dejan de crecer.

15 La frase "cultivo de semillas" o "tren de semillas" (también denominado tren de inóculo) como se usa en la presente descripción incluye la fuente de inoculación de una población de células que se deja expandir en cultivo en lote, o series de cultivos en lote, hasta que esté lista para la escala de producción. El proceso de expansión del tren de semillas constituye la fase inicial de crecimiento de las células, o fase de crecimiento del inóculo, después de descongelar las células congeladas. El intervalo entre la descongelación celular y la acumulación de suficiente masa 20 celular para inocular un biorreactor de producción constituye la fase de expansión del tren de semillas. La masa celular puede escalarse a través de varias etapas de biorreactor en cultivo de semillas, y las células se hacen crecer en medio de cultivo celular en condiciones favorables para la supervivencia, el crecimiento y la viabilidad del cultivo celular. Se entiende que el tren de semillas está destinado a maximizar la fase de crecimiento exponencial o alcanzar la tasa de crecimiento máxima para el tipo de célula particular que se cultiva. Por lo tanto, pasar las células desde un biorreactor 25 o recipiente a otro puede ser una forma de lograr la máxima tasa de crecimiento. Las condiciones precisas variarán en dependencia del tipo de célula, del organismo del que se derivó la célula y la naturaleza y carácter del polipéptido o proteína que se expresa. Puede ocurrir o detectarse un cambio al metabolismo del consumo de lactato en cualquiera de los recipientes en una expansión del tren de semillas.

30 La frase "cultivo de células en lotes alimentados" o "cultivo en lotes alimentados" cuando se usa en la presente descripción se refiere a un cultivo en lotes en donde las células animales y el medio de cultivo se suministran al recipiente de cultivo inicialmente y los nutrientes adicionales del cultivo se alimentan lentamente al cultivo, de forma continua o en incrementos discretos, durante el cultivo, con o sin cosecha periódica de células y/o producto antes de la terminación del cultivo. El cultivo en lote alimentado incluye "cultivo semicontinuo en lote alimentado" en donde 35 periódicamente el cultivo completo (que puede incluir células y medio) se retira y se reemplaza por medio fresco. El cultivo en lote alimentado se distingue del simple "cultivo en lote" porque en el cultivo en lote todos los componentes para el cultivo celular (incluidas las células animales y todos los nutrientes del cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del proceso de cultivo. El cultivo en lote alimentado puede distinguirse, además, del cultivo de perfusión en, que el sobrenadante no se extrae del recipiente de cultivo durante el proceso, mientras que en el cultivo 40 de perfusión, las células están restringidas en el cultivo, por ejemplo, mediante filtración, y el medio de cultivo se introduce y se retira del recipiente de cultivo de manera continua o intermitente. Sin embargo, se contempla la extracción de muestras con fines de prueba durante el cultivo celular en lotes alimentados. El proceso de alimentación en lotes continúa hasta que se determina que se alcanza el máximo volumen de trabajo y/o la producción de proteínas.

45 La frase "cultivo celular continuo" cuando se usa en la presente descripción se refiere a una técnica que se usa para cultivar células continuamente, generalmente en una fase de crecimiento particular. Por ejemplo, si se requiere un suministro constante de células, o se requiere la producción de un polipéptido o proteína particular de interés, el cultivo celular puede requerir mantenimiento en una fase particular de crecimiento. Así, las condiciones deben monitorearse continuamente y ajustarse en consecuencia con el fin de mantener las células en esa fase 50 particular.

55 La frase "fase logarítmica", como se usa en la presente descripción, significa un período de crecimiento celular típicamente caracterizado por duplicación celular. Las frases "fase de crecimiento exponencial" o "fase exponencial" se utilizan indistintamente con fase logarítmica. En la fase logarítmica, el número de células nuevas que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población de células actual, por lo que graficar el logaritmo natural del número de células frente al tiempo se produce una línea recta. Si el crecimiento no se limita, la duplicación continuará a una tasa constante, por lo que tanto el número de células como la tasa de aumento de la población se duplican con cada período de tiempo consecutivo.

60 La frase "fase estacionaria" como se usa en la presente descripción se refiere al punto en donde la tasa de crecimiento celular es igual a la tasa de muerte celular. Cuando se traza en un gráfico, la fase estacionaria se representa como una meseta o parte lineal horizontal "suave" de la curva.

65 El término "célula", cuando se usa en la presente descripción, incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las eucariotas, tales como células animales no humanas, células de mamíferos, células humanas o fusiones de células tales como, por ejemplo,

hibridomas o cuadromas. En ciertas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata o ratón. En otras modalidades, la célula se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, célula de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, 5 A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, célula MMT, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6®). En algunas modalidades, la célula es una célula CHO. En otras modalidades, la célula es una célula CHO K1.

10 Una "línea celular", como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula o células que se derivan de un linaje particular mediante pases en serie o subcultivo de células. El término "células" se usa indistintamente con "población celular".

15 Dadas las estrategias actuales modernas de alimentación, las células CHO han alcanzado números de células tales como 11×10^6 células/ml (en el día 8) y títulos de, por ejemplo, 2,3 g/L de IgG humana (cosechada el día 14), números que son valores industriales típicos para cultivos en lotes alimentados de células CHO (Kim, BJ, y otros Biotechnol Bioeng. Enero de 2012; 109(1):137-45. doi: 10.1002/bit.23289. Publicación electrónica del 3 de octubre de 2011). Se ha informado de una producción de anticuerpos incluso superior a 10 g/L a partir de células CHO que están bien establecidas como una importante línea celular industrial de mamíferos (Omasa y otros, Current Pharmaceutical 20 Biotechnology, 2010, 11: 233-240).

25 Los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" se refieren a una solución nutritiva que se usa para cultivar células de mamíferos que típicamente proporciona los nutrientes necesarios para mejorar el crecimiento de las células, tales como una fuente de energía de carbohidratos, aminoácidos esenciales, oligoelementos, vitaminas. etc. El medio de cultivo celular puede contener extractos, por ejemplo, suero o peptonas (hidrolizados), que suministran materias primas que apoyan el crecimiento celular. Los medios pueden contener extractos de soja o de levadura, en lugar de extractos de origen animal. Medio químicamente definido se refiere a un medio de cultivo celular en el cual se conocen todos los componentes químicos. El medio químicamente definido está completamente libre de componentes de origen animal, tales como suero o peptonas de origen animal.

30 Un aspecto de la invención se refiere a una fase de crecimiento en donde se modifican las condiciones del cultivo celular para potenciar el crecimiento de células eucariotas recombinantes. En la fase de crecimiento, se suministran un medio de cultivo basal y las células a un recipiente de cultivo en lotes.

35 El recipiente de cultivo se inocula con células. Una densidad de siembra adecuada para la fase de crecimiento celular inicial varía en dependencia de la línea celular inicial, por ejemplo, en el intervalo de 0,2 a 3×10^6 células/mL. Los recipientes de cultivo incluyen, pero no se limitan a, placas de pocillos, matraces T, matraces de agitación, 40 recipientes con agitación, matraces giratorios, fibra hueca, biorreactores de elevación de aire y similares. Un recipiente de cultivo celular adecuado es un biorreactor. Un biorreactor se refiere a cualquier recipiente de cultivo fabricado o diseñado para manipular o controlar las condiciones ambientales. Tales recipientes de cultivo se conocen bien en la técnica.

45 Los procesos y sistemas de biorreactores se han desarrollado para optimizar el intercambio de gases, suministrar suficiente oxígeno para mantener el crecimiento y la productividad celular, y eliminar el CO₂. Mantener la eficiencia del intercambio de gases es un criterio importante para asegurar una ampliación exitosa del cultivo celular y la producción de proteínas. La persona experta en la técnica conoce bien tales sistemas.

50 A la fase de crecimiento exponencial o cultivo de semillas (es decir primer cultivo celular) típicamente le sigue un segundo cultivo distinto, conocido como la fase de producción de polipéptidos. En una modalidad, las células que experimentan un cambio metabólico al consumo de lactato en un primer cultivo celular se transfieren a un segundo cultivo celular. En una modalidad, el segundo cultivo celular se lleva a cabo en un recipiente de cultivo diferente al de la fase de crecimiento celular o cultivo de semillas. En algunas modalidades, el segundo cultivo celular tiene lugar en un biorreactor de producción. En este contexto, transferir células se refiere a la extracción de una fracción de la población celular del primer recipiente de cultivo celular y colocar la fracción de población celular en un segundo recipiente de cultivo celular para iniciar el segundo cultivo celular.

55 En otros aspectos, la transferencia de células puede referirse a un volumen de células que contiene las células del primer cultivo celular que se coloca en un recipiente diferente y el volumen del inóculo es una fracción del volumen final del segundo cultivo celular, por ejemplo aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 % o 50 %, o 60 %, o 70 % u 80 % del volumen final. En otros aspectos, la transferencia de células puede referirse a un volumen de células que contiene las células del primer cultivo celular que permanecen en el recipiente de inicio y se agrega medio de manera que el volumen inicial (primer cultivo celular) sea una fracción del volumen final del segundo cultivo celular. En este contexto, el primer cultivo celular se diluye, al transferir las células a un segundo cultivo celular.

60 La frase "emerge de" o "emergen de" cómo se usa en la presente descripción se refiere a un cambio de una fase a otra fase, o que está a punto de cambiar de una fase a otra fase. Emerger de una fase particular, por ejemplo,

una fase de crecimiento, incluye el período de tiempo donde las mediciones indican que una primera fase está en desaceleración o está casi completa, y la fase siguiente está en comienzo. Emerger de la fase logarítmica, por ejemplo, indica que las células están en terminación de la fase logarítmica y/o están en comienzo o han alcanzado la fase estacionaria. Las fases de crecimiento se miden típicamente mediante la concentración de células viables.

5 La frase "densidad celular" se refiere al número de células por volumen de muestra, por ejemplo, como número de células totales (viables y muertas) por mL. El número de células puede contarse manualmente o mediante automatización, como con un citómetro de flujo. Los contadores de células automatizados se han adaptado para contar el número de células viables o muertas o ambas viables/muertas mediante el uso de, por ejemplo, una técnica estándar de captación de azul tripano. La frase "densidad de células viables" o "concentración de células viables" se refiere al número de células viables por volumen de muestra (también denominado "recuento de células viables"). Puede usarse cualquier número de técnicas manuales o automatizadas bien conocidas para determinar la densidad celular. Pueden hacerse mediciones en línea de la biomasa del cultivo, donde la capacitancia o densidad óptica se correlaciona con el número de células por volumen.

10 15 La densidad celular final en un primer cultivo celular, como la densidad del tren de semillas, varía en dependencia de la línea celular inicial, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1,0 hasta 10×10^6 células/mL. En algunas modalidades, la densidad final del tren de semillas alcanza de 1,0 hasta 10×10^6 células/mL antes de la transferencia de células a un segundo cultivo celular. En otras modalidades, la densidad final del tren de semillas alcanza de 5,0 hasta 10×10^6 células/mL antes de la transferencia de células a un segundo cultivo celular.

20 25 30 En algunas modalidades, una fracción de la población celular en el primer cultivo celular se transfiere al segundo cultivo celular. En otras modalidades, la población celular en el primer cultivo celular se transfiere al segundo cultivo celular de manera que el primer cultivo celular es una fracción del segundo cultivo celular. El experto en la técnica puede elegir la densidad celular inicial del segundo cultivo. En algunas modalidades, la densidad celular inicial en el segundo cultivo celular está entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/mL hasta aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/mL. En otras modalidades, la densidad celular inicial en el segundo cultivo celular es de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, o $3,0 \times 10^6$ células/mL.

35 En ciertas modalidades, el sobrenadante celular o el lisado celular se cosechan después de la fase de producción. En otras modalidades, el polipéptido o proteína de interés se recupera del medio de cultivo o del lisado celular, mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica.

40 45 50 Las propiedades de las células y la localización del producto producido dictan el método a usar para el crecimiento y la producción y, en consecuencia, la selección de un tipo adecuado de biorreactor o recipiente de cultivo. (Bleckwenn, NA y Shiloach, J. 2004 "Large-scale cell culture" Curr Protoc Immunol. 59: Apéndice 1U.1-Apéndice 1U.44.)

40 Cambio metabólico

55 60 65 La frase "cambio metabólico" cuando se usa en la presente descripción se refiere a un cambio en el metabolismo celular, o al uso de fuentes de nutrientes de carbono, desde la producción de lactato hasta el consumo neto de lactato. Si bien no está ligado a ninguna teoría, las fuentes de nutrientes de carbono más comunes en los medios sin suero son la glucosa y la glutamina, que apoyan el crecimiento celular rápido. La glucosa puede oxidarse completamente a CO_2 y H_2O , o, según la disponibilidad de oxígeno, convertirse en lactato como en la glucólisis aeróbica. Las células de crecimiento rápido consumen glucosa y glutamina rápidamente, lo que conduce a un metabolismo oxidativo incompleto y, por lo tanto, a una producción excesiva de lactato. El metabolismo de los carbohidratos puede cambiar al consumo de lactato y así reducir la acumulación de lactato.

50 La frase "consumo de lactato" cuando se usa en la presente descripción se refiere al uso de lactato como fuente de carbono en el metabolismo celular.

55 60 65 La frase "consumo neto de lactato" cuando se usa en la presente descripción se refiere al consumo de lactato mientras que las células consumen lactato y producen lactato simultáneamente como un subproducto del metabolismo celular, y la tasa general de consumo es mayor o igual que la tasa de producción de lactato. Cuando aumenta el consumo neto de lactato, disminuye la acumulación general de lactato en un medio de cultivo celular.

65 Tras el inicio de un cultivo en lote alimentado, la acumulación de lactato, y posiblemente amoníaco, hacen que la viabilidad de las células disminuya rápidamente. Se ha informado que en cultivos en lote alimentado que no se modificaron metabólicamente, ninguno pudo alcanzar una viabilidad superior al 90 % cuando la concentración celular había alcanzado su máximo. (Xie y Wang, 1994, Biotechnol. Bioeng. 43(11):1175-1189). Tal cambio metabólico, aunque conveniente para un desempeño óptimo del proceso, no es genérico ni se controla fácilmente (Zagari, y otros, 2013, New Biotechnol. 30(2):238-245). Los inventores han descubierto que el tiempo y las condiciones para la transferencia de células desde un primer cultivo en lote (por ejemplo, un cultivo de semillas) a un segundo cultivo en lote (por ejemplo, un cultivo en lote alimentado o un cultivo de producción) tienen un impacto significativo sobre el título

de la proteína final. Se determinó inesperadamente que las células cultivadas durante un período de tiempo más largo en un primer cultivo en lote cambiarán al consumo de lactato y conferirán una preferencia metabólica, o fenotipo metabólico, para el consumo de lactato. Es un objetivo de esta invención crear células en un estado de cambio metabólico constante, por lo tanto, células con una memoria metabólica para el consumo de lactato. El método de la invención es bien adecuado para preacondicionar las células a un estado de cambio metabólico de manera que las células puedan usarse en cualquier segundo cultivo celular o posterior donde se prefiera el consumo de lactato.

En una modalidad, la acumulación global de lactato disminuye en el segundo cultivo celular. En algunas modalidades, el consumo neto de lactato se logra durante el segundo cultivo celular, por ejemplo, el consumo neto de lactato se logra en o después de 2 días, 3 días, 4 días o 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En más modalidades, la disminución de la acumulación de lactato es una reducción de la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la reducción de la concentración máxima de lactato ocurre en el segundo cultivo celular en o después de 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular es menos de aproximadamente 6 g/L, 5 g/L, 4 g/L, 3 g/L, 2 g/L, o menos de aproximadamente 1 g/L.

En algunas modalidades, las células modificadas metabólicamente producen valores de concentración de lactato de al menos 2 veces, o 3 veces, o 4 veces, o 5 veces, o hasta 10 veces más bajos en un segundo cultivo celular. En algunas modalidades adicionales, los valores de concentración de lactato más bajos en un segundo cultivo celular o la disminución global de la acumulación de lactato en el segundo cultivo celular se comparan con los determinados en un cultivo celular por lo demás idéntico bajo condiciones por lo demás idénticas, excepto que la transferencia de células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico en el primer cultivo celular. En otras modalidades más, la acumulación global de lactato disminuye en el segundo cultivo celular en o después de 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular.

En otra modalidad, el título global de producto aumenta en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, las células metabólicamente modificadas producen al menos 2 veces, o 2,5 veces, 3 veces o 4 veces, o 5 veces, o hasta 10 veces títulos más altos de producto en un segundo cultivo celular. En otras modalidades más, los valores más altos de título de proteína en un segundo cultivo celular se comparan con los determinados en un cultivo celular por lo demás idéntico en condiciones por lo demás idénticas excepto que la transferencia de células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico en el primer cultivo celular.

La optimización del control metabólico de las células en cultivo antes de la etapa de cultivo en lote alimentado o de producción tiene muchas ventajas. El cambio metabólico al consumo de lactato en un primer cultivo puede deberse a múltiples parámetros. La determinación de un cambio metabólico comprende varios métodos conocidos por el experto en la técnica para determinar el estado metabólico de las células en crecimiento.

La medición de los valores de concentración de lactato en un primer cultivo celular puede hacerse mediante una variedad de sistemas y kits de bioensayo bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como analizadores que usan electroquímica (por ejemplo, Bioprofile® Flex, Nova Biomedical, Waltham, MA), o espectroscopía Raman, y puede usarse para el seguimiento en línea o fuera de línea de la acumulación de lactato en cultivo celular.

Se entiende que la acumulación de lactato tiene un efecto perjudicial sobre el cultivo celular y, subsecuentemente, tiene un efecto negativo sobre el rendimiento del producto proteico.

En una modalidad, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando la acumulación neta de lactato se enlentece o cesa.

En una modalidad, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta mediante mediciones de lactato en el primer cultivo celular. En algunas modalidades, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando se determina una meseta, o una línea esencialmente horizontal, en un gráfico que representa la medición de valores consecutivos de concentración de lactato en el cultivo. En otras modalidades, el valor de la concentración de lactato permanece por debajo del límite de tolerancia superior para mediciones consecutivas. En otras modalidades más, el límite de tolerancia superior para la concentración de lactato no es mayor de 4 g/L. Se entiende que los niveles de lactato se estabilizan cuando las células experimentan un consumo neto de lactato.

En otras modalidades, determinar el cambio metabólico comprende medir el lactato en el primer cultivo celular a intervalos, y determinar que el lactato está por debajo del límite superior predeterminado para intervalos consecutivos, lo que determina que ocurrió el cambio metabólico al consumo de lactato en las células.

La gestión y el control del pH son aspectos importantes para mantener las células en un cultivo de biorreactor. El crecimiento de la mayoría de las células es óptimo dentro de límites estrechos de pH. Generalmente, el cultivo celular se mantiene a un pH neutro de 7,0, dentro de un intervalo de valores de puntos de ajuste superior e inferior. Los valores de los puntos de ajuste los determina el experto en la técnica en dependencia de la línea celular particular en cultivo, la composición del medio y las condiciones óptimas para el crecimiento de esa célula. Como se usa en la presente descripción, la expresión "pH neutro" significa un pH de aproximadamente 6,85 hasta aproximadamente 7,4.

La expresión "pH neutro" incluye valores de pH de aproximadamente 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, y 7,4

La monitorización del pH en línea, o en "tiempo real", y la adición de base pueden realizarse mediante varios métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En un sistema en línea, las mediciones en tiempo real de parámetros biológicos y químicos en el cultivo celular mediante conexión directa a un analizador proporcionan retroalimentación con el fin de llevar a cabo acciones adicionales, por ejemplo, agregar base o agregar nutrientes al medio de cultivo. Además, pueden hacerse mediciones fuera de línea mientras que se realizan muestreos periódicos y la intervención manual del operador. La medición continua del pH permite monitorear el medio celular y se añade base, por ejemplo, si la acidez alcanza un valor del punto de ajuste más bajo, fuera de los límites de tolerancia. Si el pH alcanza los límites superiores de tolerancia establecidos (es decir, se vuelve demasiado básico), puede agregarse CO₂.

El monitoreo en línea puede hacerse mediante una variedad de métodos. Los electrodos, tales como los electrodos de flujo continuo, se usan comúnmente para medir el pH u otros parámetros como el O₂ disuelto (dO₂) y la temperatura, en el medio de cultivo celular. Tales electrodos de flujo continuo se conectan directamente a cualquier registrador de gráficos de tira estándar para un registro continuo o pueden conectarse a cualquier medidor de pH o medidor de milivoltios estándar de laboratorio. El pH puede medirse, además, mediante una medición óptica con el uso de un sensor de punto fluorescente montado en el biorreactor.

Cualquier sistema de monitoreo de este tipo integrará un límite de tolerancia (o banda muerta) alrededor de los valores superior e inferior del punto de ajuste. La banda muerta evita que el sistema de dosificación se encienda y apague demasiado rápido. Durante el control del pH, no se realizará ninguna dosificación ni titulación si la desviación del pH del punto de ajuste se encuentra dentro de los límites de tolerancia. Si los valores de medición de pH son mayores que el límite de tolerancia inferior (ácido), entonces se agregará una base líquida (por ejemplo, KOH, NaOH, NaHCO₃) o NH₃ gaseoso. Si los valores de medición de pH están por encima del límite de tolerancia superior (básico), se agregará un ácido o CO₂ gaseoso. El punto de ajuste del pH y la estrategia de control, por ejemplo, la banda muerta, están vinculados a múltiples parámetros tales como el CO₂ disuelto, el consumo de base para el control del pH, y por tanto, la osmolalidad. (Ver por ejemplo, Li, F., y otros, 2010, mAbs 2(5):466-479.)

En una modalidad, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando se detiene la adición (es decir, la titulación) de la base. La tendencia de la base incluye la tendencia en línea en donde puede usarse un método de monitoreo automático para determinar el pH y la adición periódica de la base. En el presente método, los puntos de ajuste del pH pueden variar, pero el aumento del pH fuera de la banda muerta inferior es indicativo de un cambio metabólico en el primer cultivo celular. En la técnica se conocen métodos en línea y manuales para medir la tendencia de la base, que incluyen métodos para monitorear el peso del recipiente, o la velocidad de flujo de la bomba para detectar la adición de base o la interrupción de la adición de base.

En otra modalidad, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando la adición de base ya no es necesaria para elevar el pH por encima del límite de tolerancia inferior.

En algunas modalidades, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo cuando el valor de pH aumenta sin la adición de base. En otras modalidades, el valor de pH aumenta por encima del límite inferior de tolerancia para mediciones consecutivas.

En otras modalidades, la determinación del cambio metabólico comprende: (a) ajustar un instrumento de detección de pH para detectar el nivel de ruido en el primer cultivo celular, (b) medir continuamente el pH en el primer cultivo celular a intervalos regulares, (c) agregar base como sea necesario para mantener el pH por encima de un límite inferior predeterminado, (d) determinar que el pH está por encima del límite inferior predeterminado durante varios intervalos consecutivos, y (e) cesar la adición de base, y determinar así que en las células ha ocurrido el cambio metabólico al consumo de lactato.

En una modalidad, el límite inferior de tolerancia es un pH de aproximadamente 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05 o aproximadamente 7,1.

En algunas modalidades, el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta mediante indicadores o productos del metabolismo celular en el primer cultivo celular. Uno de esos indicadores del metabolismo celular es el consumo de oxígeno (Zagari, y otros, 2013, New Biotechnol. 30(2):238-245). Puede usarse una medida precisa de la tasa de agotamiento de oxígeno en el medio de cultivo celular para determinar la presencia de células viables en el cultivo después de la inoculación, así como también la tasa de crecimiento de las células en cultivo (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos núm. 6,165,741 y la Patente de Estados Unidos núm. 7,575,890). La medición del consumo de oxígeno se conoce bien en la técnica.

Otros indicadores del metabolismo celular, tales como enzimas y metabolitos, pueden medirse mediante técnicas proteómicas o metabolómicas, tales como matrices inmunológicas, resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masa. Los metabolitos, como la glicina, triptófano, fenilalanina, adenina, ácido palmitíco, ácido

glutámico, metionina y asparagina se han correlacionado con un aumento de la biomasa celular (Ver, por ejemplo, Jain, M. y otros, *Science*. 25 de mayo de 2012; 336(6084): 1040-1044. doi:10.1126/science.1218595; y De la Luz Hdez, K., 2012, *Metabolomics and Mammalian Cell Culture*, *Metabolomics*, Dr Ute Roessner (Ed.), ISBN: 978-953-51-0046-1, InTech, disponible en: <http://www.intechopen.com/books/metabolomics/metabolomics-and-mammalian-cell-cultures>). Puede usarse cualquier número de cambios moleculares que coincidan con o conduzcan directamente a un cambio metabólico en el primer cultivo celular para determinar que ocurrió un cambio metabólico.

Producción de proteínas

10 Los métodos de la invención producen una proteína o polipéptido de interés en un cultivo celular. Para permitir la producción de proteínas en los métodos de la invención, las células se diseñan por ingeniería genética para expresar de forma recombinante el polipéptido o la proteína de interés.

15 Las células se transfieren a un segundo cultivo celular, por ejemplo, un cultivo de producción, después de que ocurrió el cambio metabólico al consumo de lactato en las células, y se mantendrán en el segundo cultivo celular durante un período de tiempo para que el polipéptido o proteína se acumule en el cultivo de células.

20 Como se usa en la presente descripción, un "polipéptido" es una cadena simple de polímero lineal de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. El término "proteína" puede usarse, además, para describir un polipéptido grande, tal como una proteína de siete dominios transmembrana, con una estructura particular espacial o plegada. Como tal, el término "proteína" pretende incluir estructuras cuaternarias, estructuras ternarias y otras macromoléculas complejas compuestas por al menos un polipéptido. Si la proteína está compuesta por más de un polipéptido que se asocian físicamente entre sí, entonces el término "proteína", como se usa en la presente descripción, se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y funcionan juntos como la unidad discreta. El término "proteína" incluye polipéptido.

25 Los ejemplos de polipéptidos y proteínas producidos por los métodos de la invención incluyen anticuerpos, proteínas de fusión, proteínas de fusión a Fc, receptores, proteínas de fusión receptor-Fc y similares.

30 El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consta de dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) y un par de cadenas pesadas (H), que pueden estar interconectadas las cuatro por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas está bien caracterizada. Ver, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada típicamente comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como V_H o VH) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de la cadena pesada típicamente comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios C_H1 y C_H2 están unidos por una bisagra. Cada cadena ligera comprende típicamente una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como V_L o VL) y una región constante de cadena ligera. Hay dos tipos de cadenas ligeras en humanos, y otros mamíferos: cadena kappa (κ) y cadena lambda (λ). La región constante de cadena ligera típicamente comprende un dominio (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o forma de bucles definidos estructuralmente), denominadas, además, regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino (N terminal) hasta el extremo carboxi (C terminal) en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver, además, Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Típicamente, la numeración de los residuos de aminoácidos en esta región es según IMGT, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), o por el sistema de numeración de la UE de Kabat (conocido, además, como "numeración de la UE" o "índice de la UE"), por ejemplo, como en Kabat, EA y otros. *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991).

40 El término "Fc" se refiere a una porción de una región constante de cadena pesada que comprende al menos los dominios CH2 y CH3 que típicamente se unen a un receptor Fc, por ejemplo, un Fc- yR, a saber, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) o un FcRn, es decir, un receptor de Fc neonatal. Se entiende que una proteína de fusión Fc puede contener todo o parte de un dominio Fc nativo o contener delecciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que la hagan incapaz de unirse a algún receptor Fc, lo que hace que el dominio no sea funcional o "sin efecto" en términos de su función biológica típica como se alcanza a través de un receptor Fc.

45 El término "anticuerpo" (Ab) como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de la misma, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno como se describió anteriormente en "inmunoglobulina". Un anticuerpo puede ser, además, un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar (ver, por ejemplo, Hollinger, y otros, 1993, *PNAS USA* 90(14), 6444-8, para una descripción de diacuerpos). Además, se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, es decir "fragmentos de unión a antígeno" o "proteínas de unión a antígeno". Como ocurre con las moléculas de anticuerpos completas, las

proteínas de unión a antígenos pueden ser monoespecíficas o multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas). Los ejemplos de moléculas o fragmentos de unión abarcados dentro del término "anticuerpo" incluyen, pero no se limitan a (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en la publicación de patente internacional núm. WO2007059782; (ii)

5 Fragmentos F(ab')2, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la
región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que
consiste esencialmente en los dominios VL y VH, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, 1989, *Nature* 341, 544-546), que
consiste esencialmente en un dominio VH llamado, además, anticuerpos dominio (Holt y otros, 2003, *Trends
Biotechnol.* 21(11):484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Revets y otros, 2005, *Expert Opin Biol Ther.* 5(1):111-24) y
10 (vii) una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo particular.

15 El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o durante el reordenamiento de genes o por mutación somática *in vivo*). El término "anticuerpo monoclonal de ratón o murino" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal de ratón o murino.

25 El término "proteína de fusión" como se usa en la presente descripción incluye proteína de fusión a Fc y proteína de fusión receptor-Fc. Una proteína de fusión puede ser cualquier polipéptido formado por la expresión de un gen químérico elaborado al combinar más de una secuencia de ADN de diferentes orígenes, típicamente al clonar un gen en un vector de expresión en marco con un segundo gen de manera que los dos genes codifiquen un polipéptido continuo.

30 En un aspecto, la invención proporciona un método descrito en la presente descripción para producir un polipéptido o proteína recombinante de interés. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína recombinante de interés se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, proteína de unión a antígeno, proteína de fusión, proteína de fusión a Fc y proteína de fusión receptor-Fc.

35 Sistemas de expresión celular

El uso de sistemas de expresión celular es un requisito previo para una alta producción de tales polipéptidos o proteínas en cultivo celular.

40 Un producto de acuerdo con la invención es un polipéptido, o una proteína, que se expresa en las células y se cosecha del sistema de cultivo, es decir las células y/o el medio celular. Puede ser cualquier polipéptido o proteína de interés (*supra*).

45 Los vectores de expresión típicamente usan promotores de genes fuertes para impulsar la transcripción del ARNm del producto. En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un vector de expresión que codifica un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, proteína de unión a antígeno o proteína de fusión, de interés. Dichos vectores de expresión pueden usarse en los métodos de la invención para la producción recombinante de polipéptidos o proteínas de interés mediante cultivo celular.

50 Un vector de expresión en el contexto de los métodos de la invención puede ser cualquier vector adecuado, incluidos vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico y sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos y vectores de ácidos nucleicos virales (ARN o ADN). Tales vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, los documentos núms. US 5,589,466 y US 5,973,972).

60 En la célula huésped se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido o proteína de interés, en donde la molécula de ácido nucleico está operativamente ligada a una secuencia de control de expresión adecuada para la expresión en una célula huésped de mamífero.

65 Las secuencias de control de la expresión se diseñan por ingeniería genética para controlar e impulsar la transcripción de genes de interés que codifican polipéptidos y la expresión posterior de polipéptidos o proteínas en varios sistemas celulares. Los plásmidos combinan un gen de interés expresable con secuencias de control de la expresión (es decir casetes de expresión) que comprenden elementos convenientes tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, marcadores seleccionables, operadores, etc. En un vector de expresión, las moléculas de

ácido nucleico pueden comprender o estar asociadas con cualquier promotor, potenciador, marcador seleccionable, operador, proteína represora, secuencias de terminación poliA y otros elementos adecuados facilitadores de la expresión.

5 "Promotor", como se usa en la presente descripción, indica una secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN a la que está ligada operativamente, es decir, ligada de tal manera que controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos. La expresión de una secuencia de nucleótidos puede ponerse bajo el control de cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica. Ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano o promotor IE principal de CMV (CMV-MIE), así como también RSV, promotor tardío de SV40, SL3-3, MMTV, ubiquitina (Ubi), ubiquitina C (UbC) y promotores LTR del HIV).

10 En algunas modalidades, el vector comprende un promotor que se selecciona del grupo que consiste en SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC y HIV LTR.

15 15 Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido o proteína de interés pueden, además, unirse operativamente a una secuencia de terminación poli (A) eficaz, un origen de replicación para el producto plásmido en E. coli, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos pueden comprender, además, un promotor inducible regulable (inducible, reprimible, regulado por el desarrollo) en contraposición a un promotor constitutivo como CMV IE (el experto en la técnica reconocerá que tales términos son realmente descriptores de un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

20 25 Los marcadores seleccionables son elementos que se conocen bien en la técnica. En las condiciones selectivas, solo las células que expresan el marcador seleccionable apropiado pueden sobrevivir. Comúnmente, los genes marcadores seleccionables expresan proteínas, usualmente enzimas, que confieren resistencia a diversos antibióticos en cultivos celulares. En otras condiciones selectivas, las células que expresan un marcador proteico fluorescente se hacen visibles y, por tanto, pueden seleccionarse. Las modalidades incluyen betalactamasa (bla) (gen de resistencia a antibióticos betalactámicos o gen de resistencia a ampicilina o ampR), bls (gen de resistencia a blasticidina acetil transferasa), bsd (gen de resistencia a la blasticidina-S desaminasa), bsr (gen de resistencia a blasticidina-S), Sh ble (gen de resistencia a Zeocin®), higromicina fosfotransferasa (hpt) (gen de resistencia a higromicina), tetM (gen de resistencia a tetraciclina o tetR), neomicina fosfotransferasa II (npt) (gen de resistencia a neomicina o neoR), kanR (gen de resistencia a kanamicina) y pac (gen de resistencia a puromicina). Los marcadores seleccionables (o de selección) se usan típicamente dentro del desarrollo de líneas celulares estables.

30 35 40 En ciertas modalidades, el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables que se seleccionan del grupo que consiste en bla, bls, BSD, bsr, Sh ble, hpt, tetR, tetM, npt, kanR y pac. En otras modalidades, el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables que codifican proteína verde fluorescente (GFP), proteína verde fluorescente mejorada (eGFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente cian mejorada (eCFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), o similares.

45 Para los propósitos de esta invención, la expresión génica en células eucariotas puede regularse estrechamente mediante el uso de un promotor fuerte que está controlado por un operador que a su vez está regulado por una proteína de fusión reguladora (RFP). La RFP consiste esencialmente en un dominio de bloqueo de la transcripción y un dominio de unión a ligando que regula su actividad. Ejemplos de tales sistemas de expresión se describen en el documento núm. US20090162901A1.

50 55 60 Como se usa en la presente descripción, "operador" indica una secuencia de ADN que se introduce en o cerca de un gen de interés de tal manera que el gen puede regularse mediante la unión del RFP al operador y, como resultado, evita o permite la transcripción del gen de interés. Varios operadores en células procariotas y bacteriófagos están bien caracterizados (Neidhardt, ed. *Escherichia coli and Salmonella; Cellular and Molecular Biology* 2d, Vol 2 ASM Press, Washington DC 1996). Estos incluyen, pero no se limitan a, la región del operador del gen *LexA* de *E. coli*, que une el péptido *LexA* y los operadores lactosa y triptófano, que unen las proteínas represoras codificadas por los genes *LacI* y *trpR* de *E. coli*. Estos incluyen, además, los operadores de bacteriófagos de los genes de lambda PR y del fago P22 *ant/mnt* que se unen a las proteínas represoras codificadas por lambda cl y P22 arc. En algunas modalidades, cuando el dominio de bloqueo de la transcripción de la RFP es una enzima de restricción, como NotI, el operador es la secuencia de reconocimiento para esa enzima. Un experto en la técnica reconocerá que el operador debe ubicarse adyacente o en 3' al promotor de manera que sea capaz de controlar la transcripción por parte del promotor. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos núm. 5,972,650, especifica que las secuencias *tetO* deben estar dentro de una distancia específica de la caja TATA.

65 En ciertas modalidades, el operador se selecciona del grupo que consiste en operador *tet* (*tetO*), secuencia de reconocimiento NotI, operador *LexA*, operador de lactosa, operador de triptófano y operador de *Arc* (*AO*). En algunas modalidades, la proteína represora se selecciona del grupo que consiste en *TetR*, *LexA*, *LacI*, *TrpR*, *Arc*, *LambdaC1* y *GAL4*. En otras modalidades, el dominio de bloqueo de la transcripción se deriva de una proteína represora eucariota, por ejemplo, un dominio represor derivado de *GAL4*.

5 En un sistema de expresión celular ilustrativo, las células se diseñan por ingeniería genética para expresar la proteína represora de tetraciclina (TetR) y un polipéptido de interés se coloca bajo el control transcripcional de un promotor cuya actividad está regulada por TetR. Dos operadores TetR en tandem (tetO) se colocan inmediatamente aguas abajo de un promotor/potenciador de CMV-MIE en el vector. La transcripción del gen que codifica la proteína de interés dirigida por el promotor CMV-MIE en tal vector puede bloquearse por TetR en ausencia de tetraciclina o algún otro inductor adecuado (por ejemplo, doxiciclina). En presencia de un inductor, la proteína TetR es incapaz de unirse a tetO, por lo que ocurre la transcripción y, así, la traducción (expresión) del polipéptido de interés. (Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,435,553.

10 Dichos sistemas de expresión celular pueden usarse para "activar" la producción del polipéptido de interés únicamente durante el cultivo de producción. Así, pueden añadirse antibióticos, tales como tetraciclina u otros inductores adecuados, al biorreactor a un primer cultivo celular.

15 20 25 Otro sistema de expresión celular ilustrativo incluye proteínas de fusión reguladoras tales como la proteína de fusión TetR-ER_{LBD}T2, en la que el dominio de bloqueo de la transcripción de la proteína de fusión es TetR y el dominio de unión al ligando es el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno (ER_{LBD}) con mutaciones T2 (ER_{LBD}T2; Feil y otros, 1997, Biochem. Biophys. Res. Comun. 237:752-757). Cuando las secuencias tetO se colocaron aguas abajo y próximas al promotor fuerte CMV-MIE, se bloqueó la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés desde el promotor CMV-MIE/tetO en presencia de tamoxifeno y se desbloqueó mediante la eliminación del tamoxifeno. En otro ejemplo, el uso de la proteína de fusión Arc2-ER_{LBD}T2, una proteína de fusión que consta de un dímero de cadena única que consta de dos proteínas Arc conectadas por un enlazador de 15 aminoácidos y el ER_{LBD}T2 (*supra*), involucra un operador Arc (AO), más específicamente dos operadores de Arc en tandem inmediatamente aguas abajo del promotor/potenciador CMV-MIE. Las líneas celulares pueden estar reguladas por Arc2-ER_{LBD}T2, en donde las células que expresan la proteína de interés están dirigidas por un promotor CMV-MIE/ArcO2 y son inducibles con la eliminación del tamoxifeno. (Ver, por ejemplo, el documento núm. US 20090162901A1.) En algunas modalidades, el vector comprende un promotor híbrido CMV-MIE/TetO o CMV-MIE/AO2.

30 35 40 Los vectores adecuados que se usan en los métodos de la invención pueden emplear, además, herramientas Cre-*lox* para la tecnología de recombinación con el fin de facilitar la replicación de un gen de interés. Una estrategia Cre-*ox* requiere al menos dos componentes: 1) Cre recombinasa, una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios *loxP*; y 2) sitios *loxP* (por ejemplo, una secuencia específica de 34 pares de bases que consta de una secuencia núcleo de 8-pb, donde tiene lugar la recombinación, y dos repeticiones invertidas flanqueantes de 13-pb) o sitios mutantes *lox*. (Ver, por ejemplo, Araki y otros, 1995, PNAS 92:160-4; Nagy, A. y otros, 2000, Genesis 26:99-109; Araki y otros, 2002, Nuc Acids Res 30(19):e103; y el documento núm. US20100291626A1). En otra estrategia de recombinación, la FLP recombinasa derivada de levadura puede usarse con la secuencia consenso FRT (ver además, por ejemplo, Dymecki, S., 1996, PNAS 93(12):6191-6196).

45 50 En otro aspecto, un gen (*es decir*, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante de interés) se inserta dentro de una secuencia potenciadora de la expresión del casete de expresión y, opcionalmente, se une operativamente a un promotor, en donde el gen unido al promotor está flanqueado en 5' por un primer sitio de reconocimiento de recombinasa y en 3' por un segundo sitio de reconocimiento de recombinasa. Tales sitios de reconocimiento de recombinasa permiten la recombinación mediada por Cre en la célula huésped del sistema de expresión. En algunos casos, un segundo gen ligado a un promotor está aguas abajo (3') del primer gen y está flanqueado en 3' por el segundo sitio de reconocimiento de recombinasa. En otros casos más, un segundo gen unido a promotor está flanqueado en 5' por el segundo sitio de recombinasa y flanqueado en 3' por un tercer sitio de reconocimiento de recombinasa. En algunas modalidades, los sitios de reconocimiento de recombinasa se seleccionan de un sitio *loxP*, un sitio *lox511*, un sitio *lox2272* y un sitio FRT. En otras modalidades, los sitios de reconocimiento de recombinasa son diferentes. En una modalidad adicional, la célula huésped comprende un gen capaz de expresar una recombinasa Cre.

55 En otro aspecto, el vector comprende un primer gen que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o una cadena pesada de un anticuerpo de interés, y un segundo gen que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o una cadena pesada de un anticuerpo de interés.

60 Se entiende que pueden emplearse uno o más vectores que llevan una o más secuencias de ácido nucleico que codifican y expresan la proteína de interés en tal sistema de expresión.

65 Las células de la descripción pueden, además, modificarse por ingeniería genética para aumentar la expresión del producto mediante la coexpresión de proteínas tales como chaperonas, inhibidores de apoptosis, inhibidores de degradación de proteínas u otras proteínas que pueden mejorar la expresión o estabilidad del producto.

70 En algunos aspectos, el vector comprende, además, una proteína de unión a caja X 1(mXBP1) y/o un gen EDEM2 capaz de mejorar la producción/secreción de proteínas a través del control de la expresión de genes implicados en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER). (Ver, por ejemplo, Ron D y Walter P.,

2007, Nat Rev Mol Cell Biol. 8:519-529; Olivari y otros, 2005, J. Biol. Chem. 280(4):2424-2428, Vembar y Brodsky, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(12): 944-957, 2008).

5 El uso de células transfectadas transitoriamente que producen rápidamente cantidades significativas del producto puede, además, llevarse a cabo para la optimización de un proceso de cultivo celular, sin embargo, la transfección estable se usa típicamente para escalas de producción de gran volumen.

10 En el contexto de la presente descripción, la célula modificada metabólicamente puede contener cualquiera o todos los elementos de un sistema de expresión celular necesarios para la producción recombinante eficaz de una proteína de interés, como se describe en la presente descripción.

15 Incluso en un aspecto más, la descripción se refiere a una célula huésped eucariota recombinante metabólicamente modificada que produce una proteína de interés. Los ejemplos de células huésped incluyen células de mamíferos, tales como CHO, PER.C6, líneas celulares linfoides murinas y de hibridoma murino (*supra*). Por ejemplo, en un aspecto, la presente descripción proporciona una célula modificada metabólicamente que comprende una secuencia de ácido nucleico integrada de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica una proteína de interés. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula modificada metabólicamente que comprende una secuencia de ácido nucleico no integrada (*es decir*, episomal), tal como un plásmido, cósmido, fagérido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica una proteína de interés.

20 La "cosecha" o "cosecha de células" tiene lugar al final de un lote de producción en un proceso aguas arriba. Las células se separan del medio mediante una serie de métodos, tales como filtración, encapsulación celular, adherencia celular a microportadores, sedimentación celular o centrifugación. La purificación de la proteína tiene lugar en etapas adicionales para aislar el producto proteico. Pueden cosecharse polipéptidos o proteínas de las células o del medio de cultivo celular.

25 30 Las estrategias de purificación de proteínas se conocen bien en la técnica. Las formas solubles del polipéptido, tales como anticuerpos, fragmentos de unión de anticuerpos y proteínas que contienen Fc, pueden someterse a filtros de concentración disponibles comercialmente y subsecuentemente purificarse por afinidad por métodos bien conocidos, tales como resinas de afinidad, resinas de intercambio iónico, columnas de cromatografía, y similares. Las formas del polipéptido unidas a membranas pueden purificarse mediante la preparación de una fracción de membrana total de la célula de expresión y extraer las membranas con un detergente no iónico como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA, Estados Unidos). Pueden prepararse proteínas citosólicas o nucleares 35 mediante lisis de las células huésped (mediante fuerza mecánica, sonicación, detergente, etc.), al eliminar la fracción de membrana celular por centrifugación y retener el sobrenadante.

40 45 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo, una proteína de unión a antígeno o una proteína de fusión de interés, dicho método comprende las etapas de a) cultivar células de acuerdo con el método como se describió anteriormente en la presente descripción, b) cosechar las células, y c) purificar el polipéptido o la proteína, tales como el anticuerpo, la proteína de unión a antígeno o la proteína de fusión, a partir de las células o del medio de cultivo celular.

50 55 Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, concentraciones, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

50 EJEMPLOS

Ejemplo 1- Determinación de los parámetros de cambio metabólico: Línea celular productora de proteína de fusión

55 Se transfectaron células CHO con ADN que expresaba una proteína de fusión. La línea celular productora de proteína de fusión CHO se incubó en un cultivo en recipiente de semillas, en un medio patentado que contenía soja, y se midieron y registraron parámetros tales como el pH en línea, el lactato fuera de línea y el recuento de células viables para determinar el estado metabólico (ver #1, #2, o #3 de la Figura 1A). Además, se monitoreó el uso de base y se normalizó a 1 para esta línea celular (ver, además, la Figura 1A).

60 65 Se usaron células bajo la condición #1 y la condición #2 para inocular biorreactores de producción replicados cuando el pH estaba controlado en el extremo inferior del intervalo de control y el lactato y VCC estaban en aumento. Las células bajo la condición #3 se inocularon cuando el pH comenzaba a aumentar por debajo del intervalo de control, *es decir* el uso de base se había detenido, lo que indicaba la remetabolización del lactato (*es decir* consumo). El crecimiento celular en la condición #3 había entrado en una fase de crecimiento post-exponencial. Todos los biorreactores de producción se hicieron funcionar con las mismas condiciones de funcionamiento.

El título de producto (ver Figura 1B) y los perfiles de lactato (ver Figura 1C) se midieron en cada biorreactor de producción mediante el uso de métodos conocidos para determinar el impacto del estado metabólico del tren de semillas #1, #2 o #3. Las líneas de tendencia de los biorreactores de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan \pm una desviación estándar.

5 Las células de la condición #3 tuvieron el efecto más significativo sobre la productividad y la acumulación de lactato en el segundo cultivo celular, lo que dio como resultado un aumento de más de 2 veces en el título del producto (en comparación con las condiciones #1 y #2), en el biorreactor de producción (ver Figura 1B). Además, las células de la condición #3 dieron como resultado una disminución de la concentración de lactato después de la transferencia al segundo cultivo celular (en comparación con las condiciones #1 y #2- ver la Figura 1C). Las células de la condición #3 tienen un perfil de lactato indicativo de consumo neto de lactato (ver Figura. 1C a los 8-12 días de cultivo celular). Células transferidas del primer cultivo bajo la condición #1 (es decir antes de un cambio metabólico en el primer cultivo) no alcanzan el consumo neto de lactato en el biorreactor de producción.

10 15 Ejemplo 2- Determinación de parámetros de cambio metabólico: Línea celular productora de anticuerpos

20 Se usó un recipiente de siembra de la línea celular CHO que produce anticuerpos para inocular biorreactores de producción replicados similares al Ejemplo 1, sin embargo, en un medio químicamente definido. Se midieron cuatro estados metabólicos diferentes (mediante monitorización del pH fuera de línea, el lactato y los recuentos de células viables- ver #1, #2, #3, y #4 de la Figura 2A). El VCC continuó en aumento durante la duración de la incubación del recipiente de semillas cuando se inocularon los biorreactores de producción.

25 30 La condición #1 se inoculó muy temprano en el tren de semillas cuando el pH todavía estaba en el extremo superior del intervalo de control y cuando el lactato era bajo pero estaba en aumento. La condición #2 se inoculó cuando el pH comenzaba a disminuir y el lactato aumentaba y se acercaba a los niveles máximos. La condición #3 se inoculó cuando el pH estaba cerca de lo más bajo del intervalo de control y los niveles de lactato se habían estabilizado. La condición #4 se inoculó cuando el pH comenzaba a aumentar por debajo del intervalo de control y durante la remetabolización del lactato (es decir consumo de lactato). Todos los biorreactores de producción se hicieron funcionar con las mismas condiciones de funcionamiento. La condición #1 se perdió después de una semana.

35 40 Se determinaron el impacto del estado metabólico del tren de semillas sobre el título del biorreactor de producción (Figura 2B) y los perfiles de lactato (Figura 2C). Las líneas de tendencia de los biorreactores de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan \pm una desviación estándar.

45 50 Las células de las condiciones #3 y #4 tuvieron el efecto más significativo sobre la productividad en el segundo cultivo celular. Además, las células de las condiciones #3 y #4 dieron como resultado una concentración reducida de lactato en el biorreactor de producción (en comparación con las condiciones #1 y #2), lo cual es indicativo de un fenotipo metabólico para el consumo de lactato (ver Figuras 2B y 2C). De manera similar al Ejemplo 2, las células transferidas del primer cultivo bajo la Condición #1 no logran el consumo neto de lactato durante la fase de producción. Las condiciones #2, #3 y #4 logran un consumo neto de lactato durante la fase de producción, sin embargo, la condición #4 es la más óptima ya que el consumo neto de lactato ocurre antes que en las otras condiciones y el nivel máximo de lactato es el más bajo.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína de interés que comprende:
 - 5 (a) cultivar células que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés en un primer cultivo celular;
 - (b) determinar que ha ocurrido un cambio metabólico al consumo de lactato en dicho primer cultivo celular;
 - (c) transferir células de dicho primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después de que haya ocurrido dicho cambio metabólico al consumo de lactato;
 - 10 (d) mantener dicho segundo cultivo celular durante un período de tiempo para que dicha proteína de interés se acumule en dicho segundo cultivo celular;
 - (e) cosechar dicha proteína de interés a partir de dicho segundo cultivo celular; y
 - (f) purificar dicha proteína de interés.
- 15 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde las células se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, COS, de retina, Vero, CV1, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431, CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT, PER.C6, linfoides murinas y de hibridoma murino.
- 20 4. El método de conformidad con la reivindicación 3, en donde las células son células CHO.
- 25 5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína de interés se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, proteína de unión a antígeno, proteína de fusión, proteína de fusión a Fc y proteína de fusión receptor-Fc.
- 30 6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína de interés es un anticuerpo o proteína de fusión.
- 35 7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la proteína de interés se produce en dicho segundo cultivo celular con un título que es mayor que el título que se produce en un cultivo celular por lo demás idéntico en otras condiciones por lo demás idénticas excepto que la transferencia de dichas células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico al consumo de lactato en el primer cultivo celular.
- 40 8. El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde la proteína de interés se produce en dicho segundo cultivo celular con un título que es al menos 2 veces mayor que el título que se produce en un cultivo celular por lo demás idéntico en condiciones por lo demás idénticas excepto que la transferencia de dichas células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico al consumo de lactato en el primer cultivo celular.
- 45 9. El método de conformidad con la reivindicación 7, en donde la proteína de interés se produce en dicho segundo cultivo celular con un título que es al menos 2 veces, o 2,5 veces, 3 veces, o 4 veces, o 5 veces, o hasta 10 veces mayor que el título que se produce en un cultivo celular por lo demás idéntico en condiciones por lo demás idénticas excepto que la transferencia de dichas células al segundo cultivo celular es antes de que ocurra un cambio metabólico al consumo de lactato en el primer cultivo celular.
- 50 10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta mediante mediciones de pH, lactato o bases en el primer cultivo celular.
11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta después de que el pH aumenta en el primer medio de cultivo celular sin adición de base.
- 55 12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cambio metabólico al consumo de lactato se detecta cuando los niveles de lactato se estabilizan en el primer cultivo celular.
- 60 13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la etapa de determinar el cambio metabólico comprende:
 - (a) medir el pH en el primer cultivo celular,
 - (b) añadir una base para mantener el pH por encima de un límite inferior predeterminado,
 - (c) determinar que el pH está por encima del límite inferior predeterminado para intervalos consecutivos, y

(d) cesar la adición de base, y así determinar que el cambio metabólico al consumo de lactato ha ocurrido en el primer cultivo celular.

- 5 14. El método de conformidad con cualquier de las reivindicaciones 1-13, en donde el cambio metabólico ocurre en el primer cultivo celular en o después de 3 días de crecimiento celular en el primer cultivo celular.
- 10 15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde las células se transfieren después de que las células emergen de la fase logarítmica en el primer cultivo celular o después de que las células han alcanzado la fase de crecimiento estacionario en el primer cultivo celular.
- 15 16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde las células se transfieren al segundo cultivo celular a una densidad celular inicial mayor o igual a $0,5 \times 10^6$ células/mL, o a una densidad celular inicial entre $0,5-3,0 \times 10^6$ células/mL.
- 20 17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el primer cultivo celular es un cultivo de tren de semillas.
- 25 18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el segundo cultivo celular es un cultivo de producción.
- 30 19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde el primer cultivo celular es un cultivo de tren de semillas, el segundo cultivo celular es un cultivo de producción y el segundo cultivo celular se lleva a cabo en un recipiente de cultivo diferente del primer cultivo celular.
- 35 20. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el segundo cultivo celular se realiza en un biorreactor de producción.
- 40 21. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde la población celular en el primer cultivo celular se transfiere al segundo cultivo celular de manera que el primer cultivo celular es una fracción del segundo cultivo celular.
- 45 22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde la secuencia de ácido nucleico está integrada de forma estable en el genoma celular de las células.
- 50 23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde las células comprenden uno o más vectores que codifican la proteína de interés.
- 55 24. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde el cambio metabólico al consumo de lactato en el primer cultivo celular comprende un cambio metabólico al consumo neto de lactato.

60
65

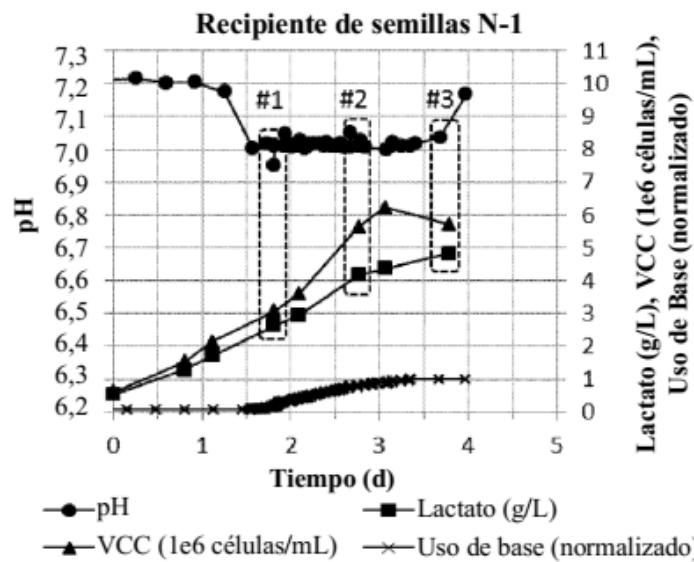
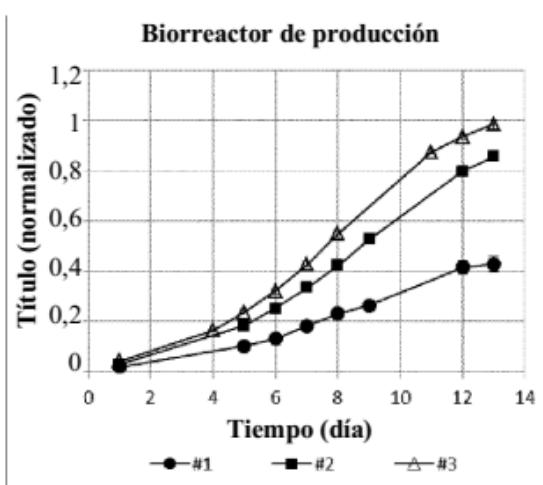
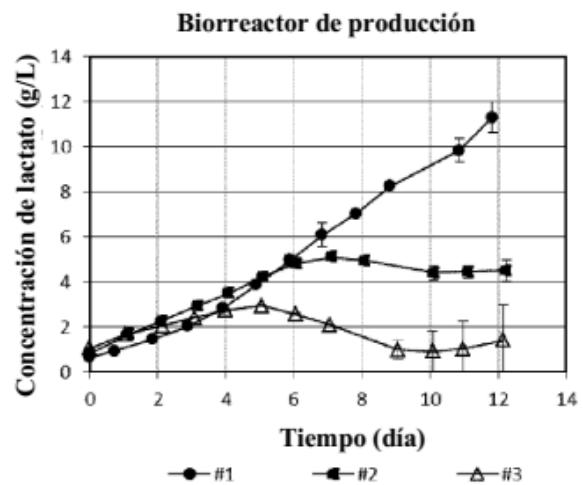
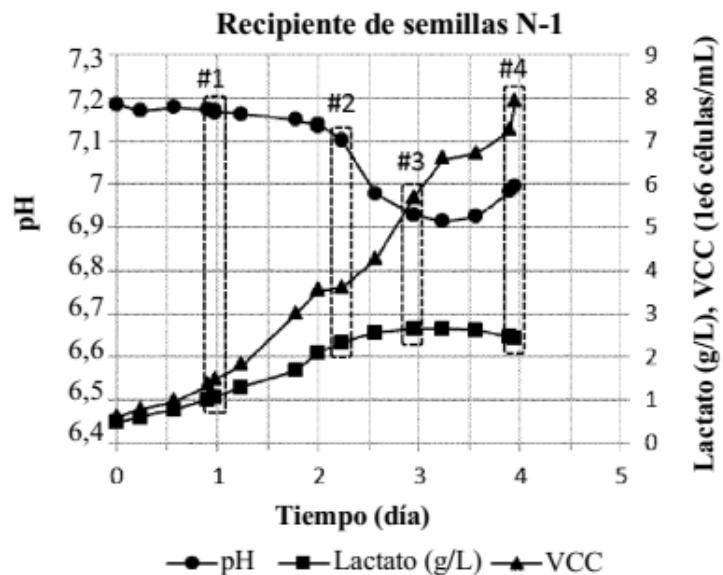
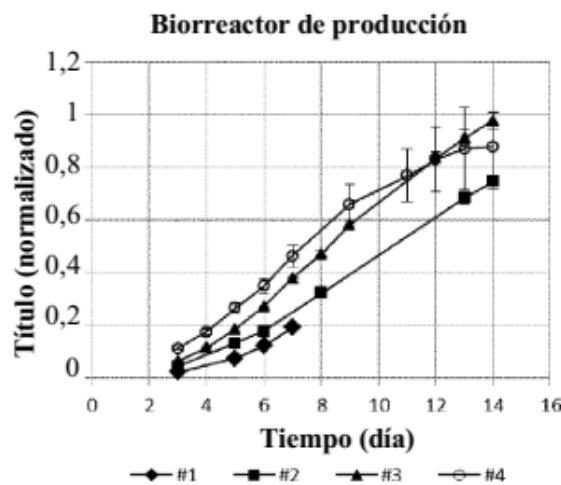
Figura 1A: Parámetros metabólicos: Línea celular productora de proteína de fusión**Figura 1B:**
Título de proteína**Figura 1C:**
Perfil de lactato

Figura 2A: Parámetros metabólicos: Línea celular productora de anticuerpos**Figura 2B:**
Título de proteína**Figura 2C:**
Perfil de lactato