

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 780**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2016** **PCT/IB2016/055666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017** **WO17051347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2016** **E 16778886 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3353313**

54 Título: **Células y procedimiento de cultivo celular**

30 Prioridad:

**23.09.2015 US 201562222555 P**

**19.09.2016 US 201662396475 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2024**

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)**  
**66 Hudson Boulevard East**  
**New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**HILLER, GREGORY WALTER;**  
**MITCHELL, JEFFREY JOSEPH;**  
**MULUKUTLA, BHANU CHANDRA y**  
**PEGMAN, PAMELA MARY**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 989 780 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

Células y procedimiento de cultivo celular

### Campo de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento de cultivo celular en el que las células se modifican para reducir el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad por la célula. La invención también se refiere a un procedimiento de cultivo celular para mejorar el crecimiento celular y la productividad, en especial en el cultivo de alimentación discontinua de células de mamífero a alta densidad celular.

### Antecedentes de la invención

10 Las proteínas han adquirido una importancia creciente como agentes diagnósticos y terapéuticos. En la mayoría de los casos, las proteínas para aplicaciones comerciales se producen en cultivos celulares, a partir de células que han sido diseñadas y/o seleccionadas para producir niveles excepcionalmente elevados de una proteína concreta de interés. La optimización de las condiciones de cultivo celular es importante para el éxito de la producción comercial de proteínas. Las células de mamífero tienen un metabolismo ineficiente que hace que consuman grandes cantidades de nutrientes y conviertan una cantidad importante de ellos en subproductos. Los subproductos se liberan al cultivo y se  
15 acumulan durante el desarrollo del mismo. El lactato y el amoníaco, conocidos por ser los inhibidores convencionales de las células en cultivo, son los dos principales subproductos del metabolismo celular que se acumulan a niveles elevados en cultivo y, más allá de determinadas concentraciones, empiezan a inhibir el crecimiento y la productividad de las células en cultivo. Se han desarrollado procedimientos de cultivo celular destinados a reducir la cantidad de lactato y amoníaco en el medio de cultivo celular que pueden aumentar el crecimiento y la productividad de las células de mamífero. Sin embargo, el crecimiento celular sigue ralentizándose incluso cuando las concentraciones de lactato y amoníaco se mantienen bajas, lo que limita la densidad celular máxima y la productividad de las células. Martje *et al.*, "BCAT1 promotes cell proliferation through amino acid catabolism in gliomas carrying wild-type IDH1", Nature Medicine, vol. 19, n.º 7 2013, páginas 901-908, divulgan el papel de BCAT1 en gliomas portadores de IDH1 de tipo salvaje. Zhi-Qiang Wang *et al.*, "BCAT1 expression associates with ovarian cancer progression: possible implications in altered disease metabolism", Oncotarget, 2015, página 31522, notifican que la atenuación de la expresión de BCAT1 en células de cáncer de ovario epitelial ("epithelial ovarian cancer", EOC) condujo a una fuerte disminución de la proliferación celular, la migración y la invasión e inhibió la progresión del ciclo celular. Wen Zhou *et al.*, "Over-expression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma", Molecular Cancer, Biomed Central, vol. 12, n.º 1 2013, página 53 divulgan el efecto de la sobreexpresión de BCAT1 en el carcinoma nasofaríngeo.  
30

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo celular mejorados para la producción óptima de proteínas. En concreto, se necesitan procedimientos de cultivo celular que proporcionen una mayor densidad y/o valoración de células viables y, en especial, células modificadas para reducir el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad.

### 35 Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

En un aspecto se proporciona una célula que comprende un gen modificado que reduce el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad por la célula, en la que el gen modificado es Bcat1, en la que la modificación reduce la expresión génica de Bcat1, y en la que la célula expresa una proteína recombinante o una  
40 proteína recombinante heteróloga, en la que la célula es una célula CHO, en la que la célula comprende la inactivación o la atenuación del gen Bcat1 y en la que la atenuación de Bcat1 es menor o igual a cualquiera del 10, 5, 2,5 por ciento del nivel de expresión o actividad de Bcat1 en comparación con células no modificadas.

La invención también se refiere a un procedimiento de cultivo celular que comprende proporcionar células como se reivindica en un medio de cultivo celular para iniciar un proceso de cultivo celular, en el que las células se modifican para reducir el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad por la célula.  
45

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra las características de crecimiento y los perfiles metabólicos de las células CHO en el proceso convencional de alimentación discontinua. Los datos indicados incluyen densidades de células viables (cuadrados negros), niveles de lactato en cultivo (triángulos negros) y niveles de amoníaco (rombos negros). También se indica la valoración de la recolección (concentración de proteínas en el día 12).  
50

La figura 1B muestra las características de crecimiento y los perfiles metabólicos de las células CHO en un proceso HiPDOG. Los datos indicados incluyen densidades de células viables (cuadrados negros), niveles de lactato en cultivo (triángulos negros) y niveles de amoníaco (rombos negros). También se indica la valoración de la recolección (concentración de proteínas en el día 12).

- La figura 2 muestra gráficos que indican la densidad de células viables de las células GS-CHO (en adelante GS-CHO, línea celular A) en el día 0, el día 3 y el día 6 cuando se exponen a concentraciones crecientes de ácido 2-hidroxibutírico (figura 2A), homocisteína (figura 2B) o ácido indolcarboxílico (figura 2C). Las células GS-CHO se inocularon en medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con las concentraciones indicadas de los inhibidores, individualmente. El efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de las células se controló durante 6 días.
- La figura 3 muestra el efecto de concentraciones crecientes de dos metabolitos, el 4-hidroxifenilpiruvato (figura 3A) y el fenil-lactato (figura 3B) sobre la densidad de células viables de las células GS-CHO. Las células GS-CHO se inocularon en medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con las concentraciones indicadas de los inhibidores, individualmente.
- Las figuras 4 y 5 muestran el efecto de concentraciones crecientes de cuatro metabolitos, indol-lactato (figura 4A), 3-(4-hidroxifenil)lactato (figura 4B), formiato de sodio (figura 5A) e isovalerato (figura 5B), sobre la densidad de células viables de las células GS-CHO. Las células GS-CHO se inocularon en medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con las concentraciones indicadas de los inhibidores, individualmente.
- La figura 6 muestra el efecto de cuatro metabolitos (4-hidroxifenilpiruvato, indol-lactato, fenil-lactato y 3-(4-hidroxifenil)lactato) sobre la densidad de células viables de las células GS-CHO en comparación con un control en el que las células se cultivan en ausencia de los metabolitos. Las células GS-CHO se inocularon en medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con medio fresco solo o medio fresco que contenía los cuatro metabolitos mencionados en combinación a concentraciones que se detectaron en el día 7 del cultivo HiPDOG (véase la tabla 4). El efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de las células se controló durante 6 días.
- La figura 7A muestra las densidades de células viables de las células GS-CHO en el proceso "HiPDOG" (cuadrados negros) y "bajo en AA + HiPDOG" (rombos negros).
- La figura 7B muestra la valoración del cultivo (IgG) en diferentes días en el proceso "HiPDOG" (cuadrados negros) y "bajo en AA + HiPDOG" (rombos negros).
- Las figuras 8 y 9 muestran las concentraciones de cuatro aminoácidos en el "proceso HiPDOG con restricción de aminoácidos (bajo en AA + HiPDOG)" (cuadrados negros) y en el proceso "HiPDOG" (rombos negros). Los cuatro aminoácidos son tirosina (figura 7A), triptófano (figura 8B), fenilalanina (figura 9A) y metionina (figura 9B).
- La figura 10A muestra las densidades de células viables de las células GS-CHO durante un proceso de cultivo celular utilizando diferentes condiciones divulgadas en el ejemplo 5 (HiPDOG1 (cuadrados negros), HiPDOG2 (círculos negros), bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- La figura 10B muestra la valoración del cultivo (IgG) en diferentes días en un proceso de cultivo celular utilizando células GS-CHO y diferentes condiciones de cultivo celular divulgadas en el ejemplo 5 ((HiPDOG1 (cuadrados negros), HiPDOG2 (círculos negros), bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- Las figuras 11, 12, 13 y 14 muestran las concentraciones de tirosina (figura 11A), metionina (figura 11B), fenilalanina (figura 12A), triptófano (figura 12B), leucina (figura 13A), treonina (figura 13B), glicina (figura 14A) y serina (figura 14B) durante el cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones descritas en el ejemplo 5 ((HiPDOG1 (cuadrados negros), (HiPDOG2 (círculos negros), bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- Las figuras 15 y 16 muestran la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato (figura 15A), isovalerato (figura 15B) e indol-3-lactato (figura 16) en el día 5, día 7 y día 9 del cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el ejemplo 5 ((HiPDOG1 (cuadrados negros), HiPDOG2 (círculos negros), bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- La figura 17 muestra las densidades de células viables de las células GS-CHO y la valoración del cultivo (IgG) durante un proceso de cultivo celular utilizando las condiciones divulgadas en el ejemplo 5 ((bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- Las figuras 18A y 18B muestran las densidades de células viables de las células GS-CHO y la valoración del cultivo (IgG) durante un proceso de cultivo celular utilizando las condiciones divulgadas en el ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- Las figuras 19 y 20 muestran la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato (figura 19A), isovalerato (figura 19B) e indol-3-lactato (figura 20) en el día 5, día 7 y día 10 del cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados negros), bajo en 8AA+HiPDOG (triángulos negros)).
- Las figuras 21A y 21B muestran las densidades de células viables de las células GS-CHO y la valoración del cultivo (IgG) durante un proceso de cultivo celular utilizando diferentes condiciones divulgadas en el ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados negros), bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros)).

Las figuras 22 y 23 muestran la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato (figura 22A), isovalerato (figura 22B) e indol-3-lactato (figura 23) en el día 5 y en el día 7 del cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados negros), bajo en 4AA+HiPDOG (rombos negros)).

- 5 Las figuras 24 y 25 muestran respectivamente las vías de la fenilalanina/tirosina y de la leucina incluidas las enzimas metabólicas implicadas en la vía y sus ramas, también se tabula la medición de RT qPCR de la abundancia de transcritos indicada para los genes de la vía como número de ciclo o  $C_T$  ("Threshold Cycle", ciclo umbral). Los valores de  $C_T$  de los genes metabólicos se tabulan y comparan con el valor de  $C_T$  de un gen de mantenimiento bien caracterizado, beta-actina. La diferencia entre el  $C_T$  del gen diana y el  $C_T$  de beta-actina se tabula como el  $\Delta C_T$ . Un valor de  $\Delta C_T$  elevado indica un nivel de expresión génica bajo.
- 10 Figura 26: Análisis de la expresión génica de los genes de la vía de la fenilalanina/tirosina mediante ensayo RT-qPCR. (A) Niveles de expresión de los genes de la vía de la fenilalanina/tirosina en la línea celular A de CHO y en la línea celular original de CHO. Los datos se representan como el logaritmo de la relación entre el nivel de transcripción del gen de interés y el nivel de transcripción de B-actina. Un valor más alto indica una mayor expresión del gen. (B) Esquema de la vía catabólica de la fenilalanina/tirosina. El fenilpiruvato, el fenil-lactato, el 4-hidroxifenilpiruvato y el 3-(4-hidroxifenil)lactato son intermedios inhibidores y subproductos de la vía. Las enzimas en gris claro son las que se expresan a niveles muy bajos.
- 15 Figura 27: Análisis de la expresión génica de genes de la vía de biosíntesis y regeneración de la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) mediante ensayo RT-qPCR. (A) Esquema de la vía de biosíntesis y regeneración de la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ). El GTP es la fuente de carbono para la biosíntesis de  $BH_4$  catalizada por tres enzimas, GCH1, PTS y SPR. La vía de regeneración de la  $BH_4$  consta de dos enzimas, PCBD1 y QDPR, que juntas regeneran la  $BH_4$  a partir de la  $BH_4$ -4a-carbinolamina, que es el producto de la reacción catalizada por PAH. (B) Niveles de expresión de genes de la vía de biosíntesis y regeneración de la tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) en agrupamientos de células de la línea celular A de CHO, de la línea celular B de CHO o de la línea celular original de CHO que sobreexpresan PAH de ratón. Los datos se representan como el logaritmo de la relación entre el nivel de transcripción del gen de interés y el nivel de transcripción de B-actina. Un valor más alto indica una mayor expresión del gen.
- 20 Figura 28: Plásmidos utilizados para generar líneas de células CHO transgénicas que expresan PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón. (A) Mapa del plásmido del vector de expresión para HAP de ratón. (B) Mapa del plásmido del vector de expresión para HPD de ratón. (C) Mapa del plásmido del vector de expresión para el HGD de ratón. (D) Mapa del plásmido del vector de expresión para PCBD1 de ratón.
- 25 Figura 29: Cinética de crecimiento de agrupamientos de células con transfección cuádruple (4x-tfxn) o de control con transfección cuádruple negativa (4x-control-tfxn) en dos pases posteriores de cultivo celular sin tirosina. La duración del primer pase fue de tres días y la del segundo, de cinco. (A) Agrupamientos de células derivadas de la línea celular B de CHO. (B) Agrupamientos de células derivadas de la línea celular original de CHO. ▲: 4x-tfxn, ■: 4x-control-tfxn.
- 30 Figura 30: Comparación del rendimiento de los agrupamientos de células con transfección cuádruple derivadas de la línea celular B (4x-tfxn) en el proceso de alimentación discontinua HiPDOG sin tirosina en comparación con los agrupamientos de células de control de transfección cuádruple negativa (4x-control-tfxn) en el proceso de alimentación discontinua HiPDOG original (suplementado con tirosina). (A) Densidad de células viables, (B) Viabilidad, (C) Valoración, (D) Niveles de 3-(4-hidroxifenil)lactato ▲: 4x-tfxn, ■: 4x-control-tfxn.
- 35 Figura 31: Efecto de diferentes concentraciones de 2-metilbutirato (A) o isobutirato (B) sobre el crecimiento de la línea celular A de CHO
- 40 Figura 32: Supresión de la acumulación de 2-metilbutirato (B) e isobutirato (D) mediante el control de la concentración de isoleucina (A) y valina (C) a niveles bajos en los cultivos de alimentación discontinua de la línea celular C de CHO. ▲: bajo en AA, ◆: bajo en AA, ■: Control
- 45 Figura 33: Análisis de la expresión génica de los genes de la vía de la leucina mediante ensayo RT-qPCR. (A) Niveles de expresión de genes de la vía de la leucina en la línea celular A de CHO y en la línea celular original de CHO. Los datos se representan como el logaritmo de la relación entre el nivel de transcripción del gen de interés y el nivel de transcripción de B-actina. Un valor más alto indica una mayor expresión del gen. (B) Esquema de las vías catabólicas de la leucina, isoleucina y valina. El isovalerato, el 2-metilbutirato y el isobutirato son subproductos inhibidores del crecimiento de las vías catabólicas de la leucina, la isoleucina y la valina, respectivamente. BCAT1 (BCAT2) y BCKHDA/BCKHDB son compartidos por las tres vías catabólicas. La atenuación, la inactivación o la inhibición, por ejemplo, la inhibición con una molécula de inhibidor de molécula pequeña, de la actividad enzimática de BCAT1 (y/o BCAT2) o BCKHDA/BCKHDB reducirá al mismo tiempo la biosíntesis de los tres metabolitos inhibidores (isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato).
- 50 Figura 34: Transferencia Western para sondear los niveles de BCAT1 y B-actina en células CHO transfectadas transitoriamente de forma independiente con cinco miARN contra BCAT1. (A) Niveles de proteína B-actina en la línea celular original de CHO no transfectada o transfectada, (B) Niveles de proteína BCAT1 en la línea celular original de CHO no transfectada o transfectada, (C) Niveles de proteína B-actina en la línea celular B de CHO no transfectada o
- 55

transfectada, (D) Niveles de proteína BCAT1 en la línea celular B de CHO no transfectada o transfectada. Carril 1: escalera de proteínas, carril 2: células no transfectadas, carril 3: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq1.1a, carril 4: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq2.1a, carril 5: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq3.1a, carril 6: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq4.1a, carril 7: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq5.1a, carril 8: células transfectadas con miARN de control negativo. Tamaño de la proteína: 42 kD para B-actina y 43 kD para BCAT1

Figura 35: Transferencia Western para sondear los niveles de BCAT1 y B-actina en un agrupamiento estable de células CHO generado a partir de transfecciones independientes con cinco miARN contra BCAT1. (A) Niveles de proteína B-actina en agrupamientos estables generados a partir de transfecciones hacia la línea celular original de CHO, (B) Niveles de proteína BCAT1 en agrupamientos estables generados a partir de transfecciones hacia la línea celular original de CHO. Los detalles de la carga de gel para todos los geles son los siguientes. Carril 1: escalera de proteínas, carril 2: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq1.1a, carril 3: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq2.1a, carril 4: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq3.1a, carril 5: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq4.1a, carril 6: células transfectadas con miARN de BCAT1 seq5.1a, carril 7: células transfectadas con miARN de control negativo. Tamaño de la proteína: 42 kD para B-actina y 43 kD para BCAT1

### Descripción detallada

La presente invención proporciona procedimientos y medios para el cultivo celular. La presente invención proporciona procedimientos de cultivo celular en los que la concentración de al menos un metabolito seleccionado de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenil-lactato, fenilpiruvato, indol-lactato (indol-3-lactato), ácido indolcarboxílico (indol-3-carboxilato), homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato, 2-metilbutirato, isobutirato y formiato y/o al menos un aminoácido seleccionado entre fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, treonina y glicina se mantiene en niveles bajos en el medio de cultivo celular.

Los inventores han descubierto inesperadamente que, en cultivo celular, y en concreto en cultivo celular de alta densidad, tal como, por ejemplo, el cultivo celular de alimentación discontinua con el objetivo de producir una cantidad elevada de una proteína recombinante de interés, el crecimiento de las células se inhibía por la acumulación de metabolitos, tales como 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenil-lactato, fenilpiruvato, indol-lactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato, 2-metilbutirato, isobutirato y formiato en el medio de cultivo celular. El efecto inhibidor de estos metabolitos puede limitarse manteniendo su concentración en el medio de cultivo celular por debajo de los niveles en los que inhiben el crecimiento celular. Los efectos inhibidores de estos metabolitos pueden limitarse modificando uno o más genes de la célula para reducir el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad por la célula, en concreto cuando dicho uno o más genes modificados se selecciona entre Bcat1, Bcat2, Auh, Mccc1, Mccc2, Ivd, Hpd, Hgd, Pah, PCBD1 y QDPR.

*Procedimientos que comprenden el control de la concentración de metabolitos en el medio de cultivo celular a niveles bajos*

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cultivo celular que comprende (i) proporcionar células en un medio de cultivo celular para iniciar un proceso de cultivo celular, en el que las células comprenden un gen modificado que reduce el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad por la célula, en el que el gen modificado es Bcat1, donde la modificación reduce la expresión génica de Bcat1, y en el que la célula expresa una proteína recombinante o una proteína recombinante heteróloga, en el que la célula es una célula CHO, en el que la célula comprende la inactivación o la atenuación del gen Bcat1 y en el que la atenuación de Bcat1 es hasta un nivel menor o igual a cualquiera del 10, 5, 2,5 por ciento de la expresión o actividad de Bcat1 en comparación con células no modificadas.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además:

(ii) mantener al menos un metabolito seleccionado de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenil-lactato, indol-lactato (indol-3-lactato), ácido indolcarboxílico (indol-3-carboxilato), homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato, 2-metilbutirato, isobutirato y formiato por debajo de una concentración C1 en el medio de cultivo celular, en el que C1 es 3 mM.

En algunas realizaciones, C1 es 2,5 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,9 mM, 0,8 mM, 0,7 mM, 0,6 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM o 0,1 mM. En algunas realizaciones, C1 es 1 mM. En algunas realizaciones, C1 es 0,5 mM.

En algunas realizaciones, la etapa (ii) comprende la etapa de medir la concentración de dicho al menos un metabolito.

En algunas realizaciones, cuando la concentración medida está por encima de un valor predefinido, la concentración del precursor de dicho al menos un metabolito en el medio de cultivo celular disminuye al reducir la cantidad del precursor suministrada a las células. Dicho valor predefinido se selecciona de forma que la disminución de la concentración de dicho precursor impida que la concentración de metabolito aumente por encima de C1. El valor predefinido puede ser igual a C1 o puede ser un porcentaje de C1. En algunas realizaciones, el porcentaje es del 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de C1. En algunas realizaciones, el porcentaje es del 80 % de C1.

- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y/o fenil-lactato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de fenilalanina disminuye en el medio de cultivo celular.
- 5 En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato y/o 4-hidroxifenilpiruvato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de tirosina disminuye en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y/o fenil-lactato está por encima de dicho valor predefinido, las concentraciones de tirosina y fenilalanina disminuyen en el medio de cultivo celular.
- 10 En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de indol-lactato y/o ácido indolcarboxílico está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de triptófano disminuye en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de homocisteína y/o ácido 2-hidroxibutírico está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de metionina disminuye en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de isovalerato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de leucina disminuye en el medio de cultivo celular.
- 15 En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de 2-metilbutirato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de isoleucina disminuye en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de isobutirato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de valina disminuye en el medio de cultivo celular.
- 20 En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de formiato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de serina, treonina y/o glicina disminuye en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de formiato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de serina disminuye en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de formiato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de treonina disminuye en el medio de cultivo celular.
- 25 En algunas realizaciones, cuando la concentración medida de formiato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de glicina disminuye en el medio de cultivo celular.
- La concentración del precursor en el medio de cultivo celular puede disminuir reduciendo la cantidad de precursor suministrada a las células, por ejemplo, reduciendo la concentración de dicho precursor en el medio de alimentación, reduciendo la velocidad de alimentación o reduciendo el número o volumen de las alimentaciones. Por ejemplo, el medio de alimentación puede sustituirse por otro que contenga una concentración menor de precursor.
- 30 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenil-lactato, indol-lactato (indol-3-lactato), ácido indolcarboxílico (indol-3-carboxilato), homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato, 2-metilbutirato, isobutirato y formiato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- 35 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenil-lactato, indol-lactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína y ácido 2-hidroxibutírico por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el 3-(4-hidroxifenil)lactato, el 4-hidroxifenilpiruvato y el fenil-lactato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- 40 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el indol-lactato (indol-3-lactato) y el ácido indolcarboxílico (indol-3-carboxilato) por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener la homocisteína y el ácido 2-hidroxibutírico por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- 45 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el isovalerato, el 2-metilbutirato y el isobutirato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el isobutirato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el 2-metilbutirato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el isovalerato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el formiato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

- 5 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el isovalerato y el 4-hidroxifenilpiruvato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener el 3-(4-hidroxifenil)lactato, el 4-hidroxifenilpiruvato, el fenil-lactato, el indol-lactato (indol-3-lactato), el ácido indolcarboxílico (indol-3-carboxilato), la homocisteína, el isovalerato de ácido 2-hidroxibutírico, el 2-metilbutirato, el isobutirato y el formiato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

- 10

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato se mantiene por debajo de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM o 0,1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato se mantiene por debajo de 0,3 mM.

- 15 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato se mantiene por debajo de 0,1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 4-hidroxifenilpiruvato se mantiene por debajo de 0,1 mM, 0,08 mM, 0,06 mM, 0,05 mM, 0,04 mM, 0,03 mM o 0,02 mM.

- 20 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 4-hidroxifenilpiruvato se mantiene por debajo de 0,05 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 4-hidroxifenilpiruvato se mantiene por debajo de 0,02 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de fenil-lactato se mantiene por debajo de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM o 0,1 mM.

- 25 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de fenil-lactato se mantiene por debajo de 0,2 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de fenil-lactato se mantiene por debajo de 0,1 mM.

- 30 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indol-lactato (indol-3-lactato) se mantiene por debajo de 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,3 mM o 0,1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indol-lactato se mantiene por debajo de 1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indol-lactato se mantiene por debajo de 0,3 mM.

- 35 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indol-lactato se mantiene por debajo de 0,1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido indolcarboxílico (indol-3-carboxilato) se mantiene por debajo de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM o 0,2 mM.

- 40 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido indolcarboxílico se mantiene por debajo de 0,5 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido indolcarboxílico se mantiene por debajo de 0,2 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de homocisteína se mantiene por debajo de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM o 0,1 mM.

- 45 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de homocisteína se mantiene por debajo de 0,3 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de homocisteína se mantiene por debajo de 0,1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido 2-hidroxibutírico se mantiene por debajo de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM o 0,2 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido 2-hidroxibutírico se mantiene por debajo de 0,5 mM.

- 5 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido 2-hidroxibutírico se mantiene por debajo de 0,2 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de isovalerato y/o 2-metilbutirato y/o isobutirato se mantiene por debajo de 2 mM, 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM o 0,2 mM.

- 10 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de isovalerato y/o 2-metilbutirato y/o isobutirato se mantiene por debajo de 1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de isovalerato y/o 2-metilbutirato y/o isobutirato se mantiene por debajo de 0,5 mM.

- 15 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de formiato se mantiene por debajo de 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM o 0,2 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de formiato se mantiene por debajo de 3 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de formiato se mantiene por debajo de 1 mM.

- 20 *Procedimientos que comprenden el control de la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular a niveles bajos*

En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular comprende además

- 25 (iii) mantener al menos un aminoácido seleccionado entre fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina por debajo de una concentración C2 en el medio de cultivo celular, en el que C2 es 2 mM.

En algunas realizaciones, dicha concentración se mantiene entre 0,1 mM y C2, entre 0,2 mM y C2, entre 0,3 mM y C2, entre 0,4 mM y C2, o entre 0,5 mM y C2. En algunas realizaciones, dicha concentración se mantiene entre 0,5 mM y C2.

- 30 En algunas realizaciones, C2 es 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,9 mM, 0,8 mM, 0,7 mM, 0,6 mM, 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, 0,1 mM, 0,05 mM. En algunas realizaciones, C2 es 1 mM.

*Procedimientos que comprenden la medición de la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular*

En algunas realizaciones, la etapa (iii) comprende la etapa de medir la concentración de dicho al menos un aminoácido. La concentración de aminoácidos puede medirse por cualquier procedimiento conocido por el experto, incluidos los procedimientos de medición en línea y fuera de línea.

- 35 La concentración de aminoácidos puede medirse una o varias veces durante el cultivo celular. En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide de forma continua, intermitente, cada 30 minutos, cada hora, cada dos horas, dos veces al día, a diario o cada dos días. En una realización preferida, la concentración de aminoácidos se mide a diario.

- 40 La concentración de aminoácidos puede medirse por cualquier procedimiento conocido por el experto. Los procedimientos preferidos para medir la concentración de aminoácidos en procedimientos en línea o fuera de línea incluyen, por ejemplo, la cromatografía líquida, tal como HPLC, UPLC o LCMS, RMN o GCMS.

- 45 En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide fuera de línea tomando una muestra del medio de cultivo celular y midiendo la concentración de dicho al menos un aminoácido en dicha muestra. En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide como se describe en el ejemplo 4. Un procedimiento preferido para medir la concentración de aminoácidos en un procedimiento fuera de línea es el UPLC.

En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide en línea. En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide en línea mediante espectroscopia Raman. En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide en línea utilizando espectroscopia Raman como se describe en el ejemplo 7. En algunas realizaciones, la concentración de aminoácidos se mide en línea utilizando una tecnología basada en



HPLC o UPLC con un automuestreador que extrae la muestra del reactor y la transfiere al equipo de forma programada.

5 En algunas realizaciones, cuando la concentración medida está por encima de un valor predefinido, la concentración de dicho al menos un aminoácido disminuye en el medio de cultivo celular. El valor predefinido puede ser igual a C2 o puede ser un porcentaje de C2. En algunas realizaciones, el porcentaje es del 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de C2. En algunas realizaciones, el porcentaje es del 80 % de C2.

10 La concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular puede disminuir reduciendo la cantidad de aminoácidos suministrada a las células, por ejemplo, reduciendo la concentración de dicho aminoácido en el medio de alimentación, reduciendo la velocidad de alimentación o reduciendo el número o volumen de las alimentaciones. Por ejemplo, el medio de alimentación puede sustituirse por otro que contenga una concentración menor de aminoácidos.

*Concentración de fenilalanina, tirosina, triptófano metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en el medio de cultivo celular*

15 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de fenilalanina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de fenilalanina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de fenilalanina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de fenilalanina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de fenilalanina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

20 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de tirosina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de tirosina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de tirosina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de tirosina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de tirosina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

25 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de triptófano se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de triptófano se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de triptófano se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de triptófano se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de triptófano se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

30 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de metionina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de metionina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de metionina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de metionina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de metionina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

40 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de leucina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de leucina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de leucina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de leucina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de leucina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

45 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de isoleucina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de isoleucina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de isoleucina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de isoleucina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de isoleucina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

50 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de valina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de valina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de valina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de valina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de valina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

55 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de serina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de serina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de serina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de

cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de serina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de serina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

5 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de treonina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de treonina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de treonina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de treonina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de treonina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

10 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de glicina se mantiene por debajo de 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de glicina se mantiene entre 0,1 y 2 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de glicina se mantiene entre 0,1 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de glicina se mantiene entre 0,2 y 1 mM en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de glicina se mantiene entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

15 En algunas realizaciones, en la etapa (iii), la concentración de tirosina, fenilalanina y leucina se mantiene por debajo de 2 mM, preferentemente entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,2 y 1 mM o entre 0,5 y 1 mM en el medio de cultivo celular.

20 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de glicina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM o 5 mM.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno de glicina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM.

25 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno de glicina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 5 mM.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM o 5 mM.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno de prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM.

30 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende uno de prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 5 mM.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular no contiene tirosina. En algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo HiPDOG, en el que el medio no contiene tirosina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular es el medio HiPDOG, medio utilizado en el proceso HiPDOG, pero que no contiene tirosina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular no contiene tirosina cuando se utiliza un cultivo o proceso HiPDOG que no contiene tirosina.

35

#### *Concentración de lactato y amoníaco*

En algunas realizaciones, otros metabolitos que inhiben el crecimiento de las células, tales como el lactato y el amoníaco, también se mantienen en niveles bajos en el medio de cultivo celular. Los procedimientos para mantener el lactato y el amoníaco en niveles bajos son conocidos por la persona experta.

40 Por ejemplo, el lactato puede mantenerse en niveles bajos en cultivo celular utilizando procedimientos divulgados en el documento WO2004104186, Gagnon *et al.*, Biotechnology and Bioengineering, vol. 108, n.º 6, junio de 2011 (Gagnon *et al.*) o el documento WO2004048556.

Se pueden emplear diversas otras estrategias para restringir la producción de lactato y/o inducir el consumo de lactato. Entre ellas se incluye el cultivo de células con un pH ligeramente reducido (6,7-7,0), el cultivo de células con bajas concentraciones de glucosa mediante el uso de fuentes de carbono alternativas que incluyen, entre otras, la fructosa (Wlaschin y Hu, 2007) y la galactosa (Altamirano *et al.*, 2006), el uso de una línea celular que tenga niveles reducidos de proteínas de enzimas glucolíticas que incluyen, entre otras, el transportador de hexosa o la lactato deshidrogenasa (Kim y Lee, 2007a), el empleo de una línea celular con niveles de proteínas celulares reducidos tanto de la lactato deshidrogenasa como de la piruvato deshidrogenasa cinasa (Zhou *et al.*, 2011) o una línea celular con sobreexpresión de la enzima piruvato carboxilasa (Kim y Lee, 2007b), o con el uso de inhibidores (basados en moléculas pequeñas o proteínas) de vías de transducción de señales (tales como AKT (Mulukutla *et al.*, 2012), mTOR (Duvel *et al.*, 2010; Lee y Lee, 2012), HIF1a) que regulan la actividad de las vías del metabolismo energético (glucólisis, ciclo de TCA y vía redox).

45

50

En algunas realizaciones, el lactato se mantiene en niveles bajos utilizando la administración de glucosa dirigida por el aumento del pH ("high-end pH-controlled delivery of glucose", proceso HIPDOG/cultivo HIPDOG) descrita en Gagnon *et al.*

5 En algunas realizaciones, el lactato se mantiene en niveles bajos en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 90 mM. En una realización preferida, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 70 mM. En algunas realizaciones, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 40 mM. En algunas realizaciones, el lactato se mantiene en niveles bajos controlando la cantidad de glucosa suministrada al cultivo celular. En algunas realizaciones, el lactato se mantiene en niveles bajos utilizando el proceso/cultivo HIPDOG. En algunas realizaciones, se utiliza un detector de pH para controlar el pH del cultivo celular y, en respuesta a un aumento por encima de un valor de pH predeterminado, se suministra glucosa al cultivo celular. En algunas realizaciones, el valor de pH predeterminado es de aproximadamente 7.

15 El amoníaco puede mantenerse en niveles bajos en el cultivo celular mediante cualquier procedimiento conocido por el experto, tal como, por ejemplo, los procedimientos divulgados en Butler *et al.*, Cytotechnology, 15: 87-94, 1994; o Hong *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2010), 88:869-876. Como alternativa, el amoníaco puede mantenerse en niveles bajos utilizando un sistema de expresión de glutamina sintetasa (GS). Estos sistemas están disponibles en el mercado (Lonza) y pueden utilizarse para generar líneas celulares recombinantes. Las líneas celulares que utilizan el sistema de expresión de GS muestran la ganancia de función para sintetizar glutamina *in vivo*, aliviando así por completo la dependencia celular de la glutamina suministrada externamente. Dado que la mayor parte del amoníaco producido en el cultivo procede de la catabolisis de la glutamina suministrada externamente, esta ganancia de la función metabólica reduce los niveles de amoníaco producidos en el cultivo.

20 En algunas realizaciones, el amoníaco se mantiene en niveles bajos en el medio de cultivo celular. En una realización preferida, la concentración de amoníaco en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 20 mM. En una realización preferida, la concentración de amoníaco en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 10 mM. En una realización preferida, la concentración de amoníaco en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 8 mM.

#### *Procedimientos de cultivo celular*

30 El término "cultivo" y la expresión "cultivo celular" utilizados en el presente documento se refieren a una población celular suspendida en un medio en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como quedará claro para los expertos en la materia, en algunas realizaciones, este término y expresión utilizados en el presente documento se refieren a la combinación que comprende la población celular y el medio en el que se suspende la población. En algunas realizaciones, las células del cultivo celular comprenden células de mamífero.

35 La presente invención puede utilizarse con cualquier procedimiento de cultivo celular que sea susceptible del proceso deseado (por ejemplo, producción de una proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo)). Como ejemplo no limitante, las células pueden crecer en cultivos discontinuos o con alimentación discontinua, en los que el cultivo se termina tras una expresión suficiente de la proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo), tras lo cual se recoge la proteína expresada (por ejemplo, anticuerpo). Como alternativa, como otro ejemplo no limitante, las células pueden cultivarse con alimentación discontinua repetida, en los que el cultivo no se termina y nuevos nutrientes y otros componentes se añaden periódica o continuamente al cultivo, durante lo cual la proteína recombinante expresada (por ejemplo, anticuerpo) se recoge periódica o continuamente. Otros procedimientos adecuados (por ejemplo, cultivos en tubos de centrifugación) son conocidos en la técnica y pueden utilizarse para poner en práctica la presente invención.

45 En algunas realizaciones, un cultivo celular adecuado para la presente invención es un cultivo de alimentación discontinua. La expresión "cultivo de alimentación discontinua", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos posteriores al inicio del proceso de cultivo. Tales componentes proporcionados suelen comprender componentes nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Normalmente, un cultivo de alimentación discontinua se interrumpe en algún momento y las células y/o los componentes del medio se recogen y, opcionalmente, se purifican. En algunas realizaciones, el cultivo de alimentación discontinua comprende un medio base suplementado con medios de alimentación.

55 Las células pueden cultivarse en cualquier volumen conveniente elegido por el profesional. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en recipientes de reacción a pequeña escala, cuyo volumen oscile entre unos pocos mililitros y varios litros. Como alternativa, las células pueden cultivarse en biorreactores comerciales a gran escala, cuyo volumen oscile aproximadamente entre al menos 1 litro y 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10 000, 12 000, 15 000, 20 000 o 25 000 litros o más, o cualquier volumen intermedio.

La temperatura de un cultivo celular se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas en el que el cultivo celular permanece viable y el intervalo en el que se produce un alto nivel del producto deseado (por

ejemplo, una proteína recombinante). En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien y pueden producir los productos deseados (por ejemplo, proteínas recombinantes) dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos descritos en la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. Determinadas células de mamífero crecen bien y pueden producir los productos deseados (por ejemplo, proteínas recombinantes o anticuerpos) dentro del intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. En determinadas realizaciones, un cultivo celular se cultiva a una temperatura de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C, 43 °C, 44 °C o 45 °C en uno o más momentos durante el proceso de cultivo celular. Los expertos en la materia podrán seleccionar la temperatura o temperaturas adecuadas para cultivar las células, en función de las necesidades concretas de las células y de los requisitos de producción concretos del usuario. Las células pueden cultivarse durante cualquier cantidad de tiempo, en función de las necesidades del profesional y de los requisitos de las propias células. En algunas realizaciones, las células se cultivan a 37 °C. En algunas realizaciones, las células se cultivan a 36,5 °C.

En algunas realizaciones, las células pueden cultivarse durante la fase inicial de crecimiento (o fase de crecimiento) durante una mayor o menor cantidad de tiempo, en función de las necesidades del profesional y de los requisitos de las propias células. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular predefinida. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular que es un porcentaje determinado de la densidad celular máxima que las células alcanzarían en último término si se les permitiera crecer sin perturbaciones. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad de células viables deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad celular máxima. En algunas realizaciones, las células se cultivan hasta que la densidad celular no aumenta más del 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % por día de cultivo. En algunas realizaciones, las células se cultivan hasta que la densidad celular no aumenta más de un 5 % por día de cultivo.

En algunas realizaciones, las células se dejan crecer durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, en función de la concentración de partida del cultivo celular, de la temperatura a la que se cultivan las células y de la tasa de crecimiento intrínseca de las células, éstas pueden cultivarse durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días, preferentemente de 4 a 10 días. En algunos casos, las células pueden cultivarse durante un mes o más. El profesional que use la presente invención podrá elegir la duración de la fase inicial de crecimiento en función de los requisitos de producción de proteínas y de las necesidades de las propias células.

El cultivo celular puede agitarse o sacudirse durante la fase inicial de cultivo para aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes entre las células. De acuerdo con la presente invención, un experto en la materia entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas del biorreactor durante la fase inicial de crecimiento, incluidas, entre otras, el pH, la temperatura, la oxigenación, etc.

Al final de la fase de crecimiento inicial, al menos una de las condiciones de cultivo puede cambiarse de modo que se aplique un segundo conjunto de condiciones de cultivo y se produzca un cambio metabólico en el cultivo. El cambio metabólico puede lograrse, por ejemplo, modificando la temperatura, el pH, la osmolalidad o el nivel de inductor químico del cultivo celular. En una realización no limitante, las condiciones de cultivo se modifican cambiando la temperatura del cultivo. Sin embargo, como se sabe en la técnica, el cambio de temperatura no es el único mecanismo a través del cual se puede lograr un cambio metabólico adecuado. Por ejemplo, este cambio metabólico también puede lograrse modificando otras condiciones de cultivo, tales como el pH, la osmolalidad y los niveles de butirato de sodio. El momento de la modificación del cultivo será determinado por el profesional que use la presente invención, basándose en los requisitos de producción de proteínas o en las necesidades de las propias células.

Al cambiar la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser gradual. Por ejemplo, el cambio de temperatura puede tardar varias horas o días en completarse. Como alternativa, el cambio de temperatura puede ser brusco. Por ejemplo, el cambio de temperatura puede completarse en menos de varias horas. Si se dispone del equipo de producción y control adecuado, como el que es habitual en la producción comercial a gran escala de polipéptidos o proteínas, el cambio de temperatura puede incluso completarse en menos de una hora.

En algunas realizaciones, una vez que las condiciones del cultivo celular han sido cambiadas como se analizó anteriormente, el cultivo celular se mantiene para una fase de producción posterior con un segundo conjunto de condiciones de cultivo favorables para la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y apropiadas para la expresión del polipéptido o proteína deseada a niveles comercialmente adecuados.

Tal como se analizó anteriormente, el cultivo puede ser modificado cambiando una o más de una serie de condiciones de cultivo que incluyen, entre otras, la temperatura, el pH, la osmolalidad y los niveles de butirato de sodio. En algunas realizaciones, se cambia la temperatura del cultivo. Según esta realización, durante la fase de producción posterior, el cultivo se mantiene a una temperatura o intervalo de temperaturas inferior a la temperatura o intervalo de temperaturas de la fase de crecimiento inicial. Como se ha comentado anteriormente, se pueden emplear múltiples cambios discretos de temperatura para aumentar la densidad o viabilidad celular o para aumentar la expresión de la proteína recombinante.

En algunas realizaciones, las células pueden mantenerse en la fase de producción posterior hasta que se alcance una densidad celular o una valoración de producción deseadas. En otra realización de la presente invención, las células se dejan crecer durante un periodo de tiempo definido durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, en función de la concentración del cultivo celular al inicio de la fase de crecimiento posterior, de la temperatura a la que se cultiven las células y de la velocidad de crecimiento intrínseca de las células, éstas podrán cultivarse durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, las células pueden cultivarse durante un mes o más. El profesional que use la presente invención podrá elegir la duración de la fase de producción posterior en función de los requisitos de producción de polipéptidos o proteínas y de las necesidades de las propias células.

El cultivo celular puede agitarse o sacudirse durante la fase de producción posterior para aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes entre las células. De acuerdo con la presente invención, un experto en la materia comprenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento posterior, incluidas, entre otras, el pH, la temperatura, la oxigenación, etc.

En algunas realizaciones, las células expresan una proteína recombinante y el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción.

En algunas realizaciones del procedimiento de cultivo celular, la etapa (ii) y/o (iii) se aplica durante la totalidad del procedimiento de cultivo celular. En algunas realizaciones, la etapa (ii) y/o (iii) se aplica durante una parte del procedimiento de cultivo celular. En algunas realizaciones, la etapa (ii) y/o (iii) se aplica hasta obtener una densidad de células viables predeterminada.

En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) y/o (iii) se aplica durante la fase de crecimiento. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) y/o (iii) se aplica durante una parte de la fase de crecimiento. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) y/o (iii) se aplica durante la fase de crecimiento y la fase de producción. En la etapa (ii) y/o (iii), el término "mantener" puede referirse a mantener la concentración de aminoácidos o metabolitos por debajo de C1 o C2 durante todo el proceso de cultivo (hasta la recolección) o durante una parte del proceso de cultivo tal como, por ejemplo, la fase de crecimiento, una parte de la fase de crecimiento o hasta que se obtenga una densidad celular predeterminada.

Los ejemplos divulgan procedimientos de producción de células con crecimiento celular mejorado y/o productividad en cultivo celular. Como se ilustra en los ejemplos, el procedimiento de producción de células con crecimiento celular mejorado y/o productividad en cultivo celular implica la identificación de los inhibidores de metabolitos producidos por la célula. El procedimiento comprende además la identificación de las vías metabólicas que conducen a la síntesis, al punto de síntesis del inhibidor o que se alejan de este punto, de manera que el metabolismo se canalice hacia y/o desde el punto de síntesis del inhibidor (véase la figura 24). Asimismo, se identifican vías que se ramifican a partir de estas vías metabólicas (véase la figura 25). Dichas ramificaciones pueden surgir en nodos de la vía situados por encima, por debajo o en el punto de síntesis del inhibidor y servir igualmente para canalizar el metabolismo hacia el inhibidor y/o para alejarse del punto de síntesis del inhibidor, o servir para canalizar el metabolismo hacia o alejándose del punto de síntesis de intermedios de la síntesis del inhibidor. Además, el procedimiento ilustrado en los ejemplos implica la identificación de genes que codifican enzimas en estas vías mencionadas, lo que incluye las ramas o vías de ramificación. Estos genes pueden codificar enzimas que sintetizan el inhibidor; pueden codificar enzimas que sintetizan intermedios o intermedios previos para la síntesis del inhibidor; pueden codificar enzimas para las que el inhibidor es un intermedio o un intermedio previo para la acción enzimática; o pueden codificar enzimas para las que el inhibidor es un intermedio directo o un sustrato para la acción enzimática (por ejemplo, esto se ilustra en la figura 24 con los genes Hpd y Hgd) o pueden codificar enzimas que generan cofactores en la vía o vías metabólicas celulares, por ejemplo, BH4 (tetrahidrobiopterina), o BH4-4a (carbinolamina), o q-BH2.

Como se ilustra en los ejemplos, el procedimiento implica además la modificación de la expresión de uno o más genes mencionados anteriormente para reducir el nivel de síntesis de los inhibidores del crecimiento y/o productividad celular. Este objetivo puede alcanzarse de varias maneras, como ilustran los ejemplos. Los genes que codifican enzimas que sintetizan el inhibidor o que sintetizan intermedios en la vía que conduce al inhibidor o vías que se ramifican a partir de él, pueden modificarse para reducir la expresión génica, reduciendo así la canalización metabólica hacia la producción del inhibidor, especialmente en el caso de que el gen o genes estén altamente expresados. Los genes que codifican las enzimas para las que el inhibidor es un sustrato o un intermedio o un intermedio previo en la vía que surge desde el inhibidor o las vías que se ramifican a partir de él, pueden modificarse para aumentar la expresión del gen, incrementando así la canalización metabólica alejándola de la producción del inhibidor, especialmente en el caso de que el gen o genes estén infraexpresados y/o mutados y/o sufran pérdida de función o de actividad enzimática. Del mismo modo, los genes que codifican enzimas para las que un intermedio o un intermedio previo de la síntesis del inhibidor es también un intermedio, es decir, los genes de una vía que se ramifica a partir de un nodo situado en un punto de síntesis un intermedio previo al punto de síntesis del inhibidor, pueden modificarse para aumentar la expresión del gen, aumentando así la canalización metabólica alejándola de la vía que conduce a la producción del inhibidor, especialmente en el caso de que el gen o los genes estén infraexpresados y/o mutados y/o sufran una pérdida de función o de actividad enzimática.

En los casos en los que uno o más genes identificados codifican una enzima que sintetiza directamente el inhibidor o un intermedio de la síntesis del inhibidor o metabolitos del inhibidor o intermedio, puede no ser deseable modificar dichos genes si están implicados en otros procesos metabólicos importantes, como se ilustra en el ejemplo 4 (figura 24) con referencia a los genes Got1, Got2, Nup62-il4i1 y Mif, que pueden expresarse a niveles normales o altos. En esta situación, pueden modificarse uno o más genes en una vía de ramificación, por ejemplo, en una vía que se ramifica desde un nodo situado en un punto de síntesis de un intermedio previo al punto de síntesis del inhibidor, para aumentar la canalización metabólica alejándola de la vía que conduce a la producción del inhibidor. Esto puede lograrse aumentando la expresión de los genes de la ramificación y, en especial, en el caso de que uno o más genes de la ramificación estén infraexpresados y/o mutados y/o sufran pérdida de función o de actividad enzimática. Esto se ilustra en el ejemplo 4 (figura 24) para el gen Pah. Como alternativa, los genes que codifican las enzimas para las que el inhibidor es un sustrato o un intermedio previo pueden modificarse para aumentar la expresión del gen, incrementando así la canalización metabólica alejándola de la producción del inhibidor, especialmente en el caso de que el gen o genes estén infraexpresados y/o mutados y/o sufran una pérdida de función o de actividad enzimática. Esto se ilustra en el ejemplo 4 (figura 24) para los genes Hpd y/o Hgd. Por lo tanto, las dianas metabólicas para la vía de la fenilalanina/tirosina (figura 24) son uno o más de los genes Pah, Hpd y/o Hgd y/o PCDB1 y/o QDPR (figuras 26 y 27). Se trata de objetivos para aumentar la expresión, lo que puede lograrse mediante la mutación del gen para corregir la pérdida de actividad o aumentar la actividad y/o proporcionando una copia o copias adicionales de tipo salvaje de uno o más genes en un vector expresable que pueda introducirse en la célula.

En los casos en que uno o más genes identificados codifican una enzima que sintetiza directamente el inhibidor o un intermedio de la síntesis del inhibidor o metabolitos del inhibidor o intermedio, puede ser deseable modificar dichos genes para evitar la canalización metabólica hacia la producción de la síntesis del inhibidor. Como se ilustra en el ejemplo 24, esto puede lograrse modificando uno o más genes directamente aguas arriba de la producción del inhibidor, como se muestra para los genes Bcat1 y/o Bcat2. Dicha modificación puede ser por atenuación o inactivación génicas.

Tal como se reivindica, la atenuación de Bcat1 se realiza para conseguir un porcentaje menor o igual a cualquiera de un 10, 5, 2.5 por ciento de nivel de expresión o actividad de Bcat1 en comparación con células no modificadas.

La atenuación puede lograrse mediante uno o más de los siguientes procedimientos: delección de genes, alteración, sustitución, mutación puntual, mutación puntual múltiple, mutación por inserción o mutación por desplazamiento de marco aplicada al gen identificado que se va a expresar a un nivel disminuido o mediante represión de la expresión génica mediante el uso de CRISPR/CAS9 o interferencia CRISPR o ARN interferente, ARNm interferente o aptámero interferente, o ARNip o ARNip interferente o un factor de transcripción de dedo de zinc o una nucleasa de dedo de zinc o una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción ("transcription activator-like effector nuclease", TALEN) o mediante el uso de un inhibidor, tal como una molécula inhibidora o un inhibidor de molécula pequeña, por ejemplo, un inhibidor de la actividad de una proteína o enzima.

Como también se ilustra en los ejemplos, el aumento de la canalización metabólica alejándola de la producción de la síntesis del inhibidor puede lograrse modificando uno o más genes que codifican enzimas que, a su vez, comparten un intermedio de la producción del inhibidor como su propio intermedio. Tal como se ilustra en el ejemplo 5, esto puede lograrse modificando dichos uno o más genes directamente aguas abajo, o aguas abajo de un nodo que se ramifica hacia la producción del inhibidor (figura 25) para aumentar la expresión. Este se realiza en caso concreto cuando uno o más genes están infraexpresados o mutados y sufren una pérdida de función o de actividad enzimática. Este es el caso de los genes lvd, Mccc1 y/o Mccc2, cuyas enzimas han sufrido una mutación que altera su actividad, y del gen Auh, que está infraexpresado. De ahí que las dianas metabólicas de la vía de la leucina sean uno o varios de los genes lvd, Mccc1, Mccc2 y Auh. Se trata de dianas para aumentar la expresión, lo que puede lograrse mediante la mutación del gen para corregir la pérdida de actividad o aumentar la actividad y/o proporcionando una copia de tipo salvaje de uno o más genes en un vector expresable que pueda introducirse en la célula.

En algunas realizaciones, la modificación de la expresión de Bcat1 comprende:

(a) una cualquiera o más de delecciones de genes, alteraciones, sustituciones, mutaciones puntuales, mutaciones puntuales múltiples, mutaciones por inserción o mutaciones por desplazamiento de cuadro aplicadas al gen identificado que se expresa a un nivel aumentado o disminuido o al gen identificado que contiene una mutación, o

(b) la introducción de uno o más ácidos nucleicos que comprenden el gen en la célula, opcionalmente en forma de un ácido nucleico expresable o una construcción de vector,

(c) la represión o la activación de la expresión génica mediante el uso de CRISPR/CAS9 o CRISPR interferente o ARN interferente, ARNm interferente o aptámero interferente, o ARNip o ARNip interferente o un factor de transcripción de dedo de zinc o una nucleasa de dedo de zinc o una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN).

Cuando la modificación de la expresión de Bcat1 comprende el uso de un ARN interferente (ARNi), el ARNi adecuado incluye un ARNi que disminuye o aumenta el nivel de un producto génico, es decir, se dirige a uno o más genes. Por

- ejemplo, un ARNi puede ser un ARNhc o un ARNip. Un "ARN interferente pequeño" o "ARN interferente corto" o ARNip es un dúplex de ARN de nucleótidos dirigido a un gen de interés o a uno o más genes. Un "dúplex de ARN" se refiere a la estructura formada por el apareamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN. El ARNip está "dirigido" a un gen en el sentido de que la secuencia de nucleótidos de la porción dúplex del ARNip es complementaria con una secuencia de nucleótidos del gen diana. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex de ARNip tiene menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el dúplex puede tener 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex es de 19 a 25 nucleótidos. La porción de ARN dúplex del ARNip puede formar parte de una estructura de horquilla. Además de la porción dúplex, la estructura de horquilla puede contener una porción de bucle situada entre las dos secuencias que forman el dúplex. La longitud del bucle puede variar. En algunas realizaciones, el bucle tiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos de longitud. La estructura de horquilla también puede contener porciones protuberantes de 3' o 5'. En algunas realizaciones, la protuberancia es una protuberancia 3' o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. Un "ARN de horquilla corta", o ARNhc, es una construcción polinucleotídica que puede fabricarse para expresar un ARN interferente, tal como ARNip.
- En algunas realizaciones, el vector contiene una o más de una secuencia promotora, un sitio de clonación direccional, un marcador de epítipo, una secuencia de poliadenilación y un gen de resistencia a antibióticos. En algunas realizaciones, la secuencia promotora es el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano, el sitio de clonación direccional es TOPO, el marcador de epítipo es V5 para la detección mediante anticuerpos anti-V5, la secuencia de poliadenilación procede de la timidina cinasa del virus del herpes simple y el gen de resistencia a los antibióticos es blasticidina.
- Según la invención y tal como se reivindica, se proporciona una célula que comprende un gen modificado que reduce el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad de la célula, en el que el gen modificado es Bcat1. La expresión génica de Bcat1 se reduce, ya sea por atenuación o inactivación génicas, y la atenuación de Bcat1 es hasta un nivel menor o igual a cualquiera del 10, 5, 2,5 por ciento de la expresión o actividad de Bcat1 en comparación con células no modificadas.
- Células*
- Las células son células CHO. En algunas realizaciones preferidas, las células son células GS.
- Procedimientos que comprenden la identificación y/o medición de la concentración de metabolitos en el medio de cultivo celular o en las células (muestra de sedimentos celulares)*
- Los metabolitos pueden ser identificados y/o la concentración de metabolitos puede ser medida por cualquier procedimiento conocido por el experto, incluidos procedimientos de medición fuera de línea y en línea, y tales mediciones también constituyen análisis metabolómicos o mediciones metabolómicas, aplicadas al medio de cultivo celular o a muestras de las células, por ejemplo, sedimentos celulares.
- La identificación y/o concentración de metabolitos puede medirse una o varias veces durante el cultivo celular. En algunas realizaciones, la concentración de metabolitos se mide de forma continua, intermitente, cada 30 minutos, cada hora, cada dos horas, dos veces al día, a diario o cada dos días. En una realización preferida, la identificación y/o concentración del metabolito se mide a diario.
- Un procedimiento de medición fuera de línea, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento en el que la medición de un parámetro, tal como una concentración, no está automatizada ni integrada en el procedimiento de cultivo celular. Por ejemplo, un procedimiento de medición en el que se toma manualmente una muestra del medio de cultivo celular para poder medir una concentración específica en dicha muestra se considera un procedimiento de medición fuera de línea.
- Los procedimientos de medición en línea, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a procedimientos en los que la medición de un parámetro, tal como una concentración, está automatizada e integrada en el procedimiento de cultivo celular.
- Por ejemplo, un procedimiento que utiliza la espectroscopia Raman como se describe en el ejemplo 7 es un procedimiento de medición en línea. Como alternativa, el uso de una tecnología basada en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de rendimiento ultraalto (UPLC) con un automuestreador que extrae muestras del reactor y las transfiere al equipo de forma programada es un procedimiento de medición en línea.
- La identificación y/o concentración de metabolitos puede medirse por cualquier procedimiento conocido por el experto. Los procedimientos preferidos para identificar y/o medir la concentración de metabolitos en procedimientos en línea o fuera de línea incluyen, por ejemplo, la cromatografía líquida, tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto (UPLC) o la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS), la resonancia magnética nuclear (RMN) o la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS).
- En algunas realizaciones, la identificación y/o concentración del metabolito se mide fuera de línea tomando una muestra del medio de cultivo celular y midiendo la concentración de dicho al menos un metabolito en dicha muestra.

En algunas realizaciones, la identificación y/o concentración de metabolitos se mide como se describe en el ejemplo 2. Un procedimiento preferido para medir la identificación y/o concentración de metabolitos en un procedimiento fuera de línea es la LCMS.

En algunas realizaciones, la identificación y/o concentración del metabolito se mide en línea. En algunas realizaciones, la identificación y/o concentración del metabolito se mide en línea mediante espectroscopia Raman. En algunas realizaciones, la identificación y/o concentración del metabolito se mide en línea utilizando espectroscopia Raman como se describe en el ejemplo 7. En algunas realizaciones, la identificación y/o concentración del metabolito se mide en línea utilizando una tecnología basada en HPLC o UPLC con un automuestreador que extrae las muestras del reactor y las transfiere al equipo de forma programada. La identificación de un metabolito incluye la determinación de la presencia y/o identidad del metabolito.

#### *Mejora del crecimiento y la productividad celular*

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, el crecimiento y/o la productividad celular se incrementan en comparación con un cultivo de control, siendo dicho cultivo de control idéntico excepto que no comprende la etapa (ii) y/o (iii) y/o no comprende las células modificadas ni las células producidas por el procedimiento de producción de células, es decir, las células no están modificadas.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento de la invención es un procedimiento para mejorar el crecimiento celular. En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención es un procedimiento para mejorar el crecimiento celular en cultivo celular de alta densidad a alta densidad celular.

La alta densidad celular, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una densidad celular superior a  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml,  $1 \times 10^8$  células/ml o  $5 \times 10^8$  células/ml, preferentemente superior a  $1 \times 10^7$  células/ml, más preferentemente superior a  $5 \times 10^7$  células/ml.

En algunas realizaciones, los procedimientos descritos anteriormente sirven para mejorar el crecimiento celular en un cultivo celular en el que la densidad celular es superior a  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml,  $1 \times 10^8$  células/ml o  $5 \times 10^8$  células/ml. En algunas realizaciones, los procedimientos sirven para mejorar el crecimiento celular en un cultivo celular en el que la densidad celular máxima es superior a  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml,  $1 \times 10^8$  células/ml o  $5 \times 10^8$  células/ml.

En algunas realizaciones, el crecimiento celular se determina por la densidad de células viables (DCV), la densidad de células viables máxima o el recuento integrado de células viables ("integrated viable cell count", IVCC). En algunas realizaciones, el crecimiento celular se determina por la densidad máxima de células viables.

La expresión "densidad de células viables", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al número de células presentes en un volumen determinado de medio. La densidad de células viables puede medirse por cualquier procedimiento conocido por el experto. Preferentemente, la densidad de células viables se mide utilizando un contador celular automatizado, tal como Bioprofile Flex®. La expresión densidad celular máxima utilizado en el presente documento se refiere a la densidad celular máxima alcanzada durante el cultivo celular. La expresión "viabilidad celular", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir en un conjunto determinado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. Los expertos en la materia apreciarán que la presente invención abarca uno de los muchos procedimientos para determinar la viabilidad celular. Por ejemplo, se puede utilizar un colorante (por ejemplo, azul tripano) que no atraviese la membrana de una célula viva, pero que pueda atravesar la membrana alterada de una célula muerta o moribunda para determinar la viabilidad celular.

La expresión "recuento integrado de células viables (IVCC)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al área bajo la curva de la densidad de células viables (DCV). El IVCC puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$IVCC_{t+1} = IVCC_t + (VCD_t + VCD_{t+1}) * (\Delta t) / 2$$

en la que  $\Delta t$  es la diferencia temporal entre los puntos temporales  $t$  y  $t+1$ .  $IVCC_{t=0}$  puede considerarse despreciable.  $DCV_t$  y  $DCV_{t+1}$  son las densidades de células viables en los puntos temporales  $t$  y  $t+1$ .

El término "valoración", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a la cantidad total de proteína expresada recombinantemente producida por un cultivo celular en una cantidad determinada de volumen de medio. La valoración suele expresarse en unidades de gramos de proteína por litro de medio.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, el crecimiento celular se incrementa en al menos un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 % o un 25 % en comparación con el cultivo de control. En algunas realizaciones, el crecimiento celular aumenta al menos un 10 % en comparación con el cultivo de control. En algunas realizaciones, el crecimiento celular aumenta al menos un 20 % en comparación con el cultivo de control.



En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la productividad se determina por la valoración y/o productividad volumétrica.

El término "valoración", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a la cantidad total de proteína expresada recombinantemente producida por un cultivo celular en una cantidad determinada de volumen de medio. La valoración suele expresarse en unidades de gramos de proteína por litro de medio.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la productividad se determina por la valoración. En algunas realizaciones, la productividad aumenta al menos un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 % o un 25 % en comparación con el cultivo de control. En algunas realizaciones, la productividad aumenta al menos un 10 % en comparación con un cultivo de control. En algunas realizaciones, la productividad aumenta al menos un 20 % en comparación con un cultivo de control.

En algunas realizaciones de los procedimientos descritos anteriormente, la densidad celular máxima del cultivo celular es superior a  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml,  $1 \times 10^8$  células/ml o  $5 \times 10^8$  células/ml. En algunas realizaciones, la densidad celular máxima del cultivo celular es superior a  $5 \times 10^6$  células/ml. En algunas realizaciones, la densidad celular máxima del cultivo celular es superior a  $1 \times 10^8$  células/ml.

#### Medios de cultivo celular

El término y las expresiones "medio", "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" utilizados en el presente documento se refieren a una solución que contiene componentes o nutrientes que nutren a células de mamífero en crecimiento. Generalmente, los nutrientes incluyen aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos requeridos por la célula para un mínimo crecimiento y/o supervivencia. Dicha solución también puede contener otros nutrientes o componentes suplementarios que mejoren el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluidos, entre otros, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones concretos (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales muy bajas), compuestos inorgánicos presentes en concentraciones finales altas (por ejemplo, hierro), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En algunas realizaciones, un medio se formula ventajosamente a un pH y concentración de sal óptimos para la supervivencia y proliferación celular. En algunas realizaciones, un medio es un medio de alimentación que se añade después del inicio del cultivo celular.

Puede utilizarse una amplia diversidad de medios de crecimiento de células de mamífero de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, las células pueden cultivarse en uno de una diversidad de medios químicamente definidos, en los que los componentes de los medios son conocidos y están controlados. En algunas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio complejo, en el que no todos los componentes del medio son conocidos y/o están controlados. En las últimas décadas se han desarrollado y publicado numerosos medios de crecimiento químicamente definidos para el cultivo de células de mamífero. Todos los componentes de los medios definidos están bien caracterizados, por lo que éstos no contienen aditivos complejos, tales como suero o hidrolizados. Las primeras formulaciones de medios se desarrollaron para permitir el crecimiento celular y el mantenimiento de la viabilidad con poca o ninguna preocupación por la producción de proteínas. Más recientemente, se han desarrollado formulaciones de medios con el propósito expreso de sostener cultivos celulares productores de proteínas recombinantes altamente productivos. Tales medios se prefieren para su uso en el procedimiento de la invención. Por lo general, estos medios contienen grandes cantidades de nutrientes y, en especial, de aminoácidos, para favorecer el crecimiento y/o el mantenimiento de las células a alta densidad. Si es necesario, estos medios pueden ser modificados por el experto para su uso en el procedimiento de la invención. Por ejemplo, la persona experta puede disminuir la cantidad de fenilalanina, tirosina, triptófano y/o metionina en estos medios para su uso como medios base o medios de alimentación en un procedimiento como se divulga en el presente documento.

No todos los componentes de los medios complejos están bien caracterizados, por lo que los medios complejos pueden contener aditivos como fuentes de carbono simples y/o complejas, fuentes de nitrógeno simples y/o complejas y suero, entre otros. En algunas realizaciones, los medios complejos adecuados para la presente invención contienen aditivos, tales como hidrolizados, además de otros componentes del medio definido como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, los medios definidos suelen incluir unas cincuenta entidades o componentes químicos en concentraciones conocidas en agua. La mayoría de ellos también contienen una o más proteínas bien caracterizadas, tales como insulina, IGF-1, transferrina o BSA, pero otros no requieren componentes proteicos, por lo que se denominan medios definidos sin proteínas. Los componentes químicos típicos de los medios se dividen en cinco grandes categorías: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos y una categoría miscelánea que desafía una categorización clara.

El medio de cultivo celular puede suplementarse opcionalmente con componentes suplementarios. La expresión "componentes suplementarios", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a componentes que mejoran el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluyendo, entre otros, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones concretos (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas,

nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En algunas realizaciones, pueden añadirse componentes suplementarios al cultivo celular inicial. En algunas realizaciones, los componentes suplementarios pueden añadirse después del inicio del cultivo celular.

- 5 Generalmente, los componentes que son oligoelementos se refieren a una diversidad de sales inorgánicas incluidas en niveles micromolares o inferiores. Por ejemplo, los oligoelementos habitualmente incluidos son el cinc, el selenio y el cobre, entre otros. En algunas realizaciones, el hierro (sales ferrosas o férricas) puede incluirse como oligoelemento en el medio de cultivo celular inicial a concentraciones micromolares. El manganeso también se incluye con frecuencia entre los oligoelementos en forma de catión divalente ( $\text{MnCl}_2$  o  $\text{MnSO}_4$ ) en una gama de concentraciones nanomolares a micromolares. Se suelen añadir numerosos oligoelementos menos comunes en concentraciones nanomolares.
- 10 En algunas realizaciones, el medio utilizado en los procedimientos de la invención es un medio adecuado para soportar una alta densidad celular, como por ejemplo  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml,  $1 \times 10^8$  células/ml o  $5 \times 10^8$  células/ml, en un cultivo celular. En algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de alimentación discontinua de células de mamífero, preferentemente un cultivo de alimentación discontinua de células CHO.
- 15 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- 20 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende tirosina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular no contiene tirosina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular es el medio HiPDOG, medio utilizado en el proceso HiPDOG, pero que no contiene tirosina. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular no contiene tirosina cuando se utiliza un cultivo o proceso HiPDOG que no contiene tirosina.
- 25 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende triptófano en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- 30 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende leucina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende isoleucina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- 35 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende valina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende serina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- 40 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende treonina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- 45 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende dos de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina y tirosina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- 50 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina y triptófano en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende tirosina y triptófano en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende tirosina y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.

- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende triptófano y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende tres de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina, tirosina y triptófano en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina, tirosina y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina, triptófano y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende tirosina, triptófano y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende cuatro de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende cinco de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende seis de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende siete de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina y glicina en una concentración inferior a 2 mM, inferior a 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 y 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 y 1 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende además al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de glicina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende además al menos 5 de glicina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende además glicina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende además al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende además al menos 5 de prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende además prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración superior a 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.
- En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende serina a una concentración superior a 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente 10 mM. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende cisteína en una concentración superior a 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente

10 mM. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular anterior es para uso en un procedimiento como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular anterior se utiliza en un procedimiento como se divulga en el presente documento como medio base. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular anterior se utiliza un procedimiento como se divulga en el presente documento como un medio de alimentación.

## 5 *Expresión de proteínas*

Como se señaló anteriormente, en muchos casos las células serán seleccionadas o diseñadas para producir altos niveles de productos deseados (por ejemplo, proteína recombinante o anticuerpo). A menudo, las células serán manipuladas por la mano humana para producir altos niveles de proteína recombinante, por ejemplo, mediante la introducción de un gen que codifique la proteína de interés y/o mediante la introducción de elementos de control genético que regulen la expresión de dicho gen (ya sea endógeno o introducido).

Determinadas proteínas pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o alguna otra característica de las células que, en última instancia, limite de alguna manera la producción de la proteína de interés. Incluso entre una población de células de un tipo concreto diseñadas para expresar una proteína específica, existe variabilidad dentro de la población celular, de modo que determinadas células individuales crecerán mejor, producirán más proteína de interés o producirán una proteína con niveles de actividad más elevados (por ejemplo, actividad enzimática). En determinadas realizaciones de la invención, una línea celular es seleccionada empíricamente por el profesional para un crecimiento robusto en las condiciones concretas elegidas para el cultivo de las células. En algunas realizaciones, las células individuales diseñadas para expresar una proteína concreta se eligen para la producción a gran escala basándose en el crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, la valoración de la proteína expresada o cualquier combinación de estas condiciones o cualquier otra condición que el profesional considere importante.

Cualquier proteína que sea pueda expresarse en una célula hospedadora puede producirse de acuerdo con las presentes indicaciones y puede producirse de acuerdo con los procedimientos de la invención o por las células de la invención. La expresión "célula hospedadora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una célula que se manipula de acuerdo con la presente invención para producir una proteína de interés tal como se describe en el presente documento. Una proteína puede expresarse a partir de un gen endógeno de la célula o de un gen heterólogo introducido en la célula. Una proteína puede estar presente en la naturaleza o tener una secuencia diseñada o seleccionada por la mano humana.

Las proteínas que pueden expresarse deseablemente de acuerdo con la presente invención se seleccionarán a menudo basándose en una actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente invención puede emplearse para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. importante desde el punto de vista farmacéutico o comercial. En algunas realizaciones, la proteína expresada por las células en cultivo se selecciona de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio único, glucoproteínas, proteínas terapéuticas, factores de crecimiento, factores de coagulación, citocinas, proteínas de fusión, sustancias farmacológicas, vacunas, enzimas o Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (SMIP, inmunofármacos modulares pequeños). Un experto en la materia comprenderá que cualquier proteína puede expresarse de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína concreta que desee producir en función de sus necesidades concretas.

## *Anticuerpos*

Dado el gran número de anticuerpos actualmente en uso o en investigación como agentes farmacéuticos u otros agentes comerciales, la producción de anticuerpos es de especial interés de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno concreto. Cualquier anticuerpo que pueda expresarse en una célula hospedadora puede producirse de acuerdo con la presente invención y puede producirse según los procedimientos de la invención o por las células de la invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se va a expresar es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos derivados de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se han descrito diversos procedimientos para fabricar anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851 (1985); Takeda *et al.*, Nature, 314, 452 (1985); Cabilly *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4 816 567; Boss *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4 816 397; Tanaguchi *et al.*, publicación de patente europea EP171496; publicación de patente europea 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano obtenido, por ejemplo, mediante el uso de bancos de presentación sobre ribosomas o de presentación sobre fagos (véase, por ejemplo, Winter *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6 291 159 y Kawasaki, patente de EE. UU. n.º 5 658 754) o el uso de especies xenográficas en las que los genes de anticuerpos nativos están inactivados y se sustituyen funcionalmente por genes de anticuerpos humanos, dejando intactos los demás componentes del sistema inmunitario nativo (véase, por ejemplo, Kuchelapati *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6 657 103).

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico en el que la gran mayoría de los residuos de aminoácidos proceden de anticuerpos humanos, minimizando así cualquier posible reacción inmunitaria cuando se administra a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los residuos de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad se sustituyen, al menos en parte, por residuos de una especie no humana que confieren una especificidad o afinidad por el antígeno deseada. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden fabricarse mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson *et al.*, Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)), y se fabrican preferentemente según las indicaciones de la publicación PCT WO92/06193 o el documento EP 0239400). Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos de modo comercial, por ejemplo, por Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña. Para más referencias, véase Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados descritos anteriormente pueden contener residuos de aminoácidos que no se encuentran de forma natural en ningún anticuerpo de ninguna especie en la naturaleza. Estos residuos extraños pueden utilizarse, por ejemplo, para conferir especificidad, afinidad o función efectora nuevas o modificadas al anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos anteriormente pueden conjugarse con fármacos para una farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica y radionúclidos (véase, por ejemplo, Kunz *et al.*, Calicheamicin derivative-carrier conjugates, documento US20040082764 A1).

En general, los profesionales que usen la presente invención seleccionarán una proteína de interés, y conocerán su secuencia precisa de aminoácidos. Cualquier proteína determinada que vaya a expresarse de acuerdo con la presente invención puede tener sus propias características concretas y puede influir en la densidad celular o en la viabilidad de las células cultivadas, puede expresarse a niveles más bajos que otra proteína cultivada en condiciones de cultivo idénticas, y puede tener una actividad biológica diferente en función de las condiciones de cultivo exactas y de las etapas realizadas. Un experto en la materia será capaz de modificar adecuadamente las etapas y las composiciones utilizados para producir una proteína concreta de acuerdo con las indicaciones de la presente invención con el fin de optimizar el crecimiento celular y la producción y/o el nivel de actividad de cualquier proteína expresada.

#### *Introducción de genes para la expresión de proteínas en células hospedadoras*

Generalmente, una molécula de ácido nucleico introducida en la célula codifica la proteína que se desea expresar según la presente invención y puede introducirse y expresarse según los procedimientos de la invención o en las células de la invención y por las células de la invención. Como alternativa, una molécula de ácido nucleico puede codificar un producto génico que induzca la expresión de la proteína deseada por la célula. Por ejemplo, el material genético introducido puede codificar un factor de transcripción que active la transcripción de una proteína endógena o heteróloga. Como alternativa, o además, una molécula de ácido nucleico introducida puede aumentar la traducción o estabilidad de una proteína expresada por la célula.

Los procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de una proteína de interés en células hospedadoras de mamífero son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gething *et al.*, Nature, 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46, 1979; Levinson *et al.*, documento EP117 060; y documento EP 117 058. Para las células de mamífero, los procedimientos habituales de introducción de material genético en células de mamífero incluyen el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Erb (Virology, 52:456-457, 1978) o el procedimiento Lipofectamine™ (Gibco BRL) de Hawley-Nelson (Focus, 15:73, 1993). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema de células hospedadoras de mamífero han sido descritos por Axel en la patente de EE. UU. n.º 4 399 216, expedida el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas de introducción de material genético en células de mamíferos, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 1989; Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537, 1990; y Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352, 1988. Otros procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos incluyen la electroporación, por ejemplo, como la empleada con el electroporador GenePulser XCell™ de BioRad™.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que se va a introducir está en forma de una molécula de ácido nucleico desnuda. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida en una célula puede consistir únicamente en el ácido nucleico que codifica la proteína y los elementos de control genético necesarios. Como alternativa, el ácido nucleico que codifica la proteína (incluidos los elementos reguladores necesarios) puede estar contenido en un vector plasmídico. Algunos ejemplos representativos no limitantes de vectores adecuados para la expresión de proteínas en células de mamífero incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, *et al.*, Mol. Cell Biol., 5:1136-1142, 1985; pMCIneo Poly-A, véase Thomas, *et al.*, Cell, 51:503-512, 1987; un vector de baculovirus, tal como pAC 373 o pAC 610; CDM8, véase Seed, B., Nature, 329:840, 1987; y pMT2PC, véase Kaufman, *et al.* EMBO J., 6:187-195, 1987. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico que se va a introducir en una célula está contenida dentro de un vector viral. Por ejemplo, puede insertarse en el genoma viral (o en un genoma viral parcial) un ácido nucleico que codifique la proteína. Los elementos reguladores que dirigen la expresión de la proteína pueden incluirse con el ácido nucleico insertado en el genoma viral (es decir, ligados al gen insertado en el genoma viral) o pueden ser proporcionados por el propio genoma viral.

El ADN desnudo puede introducirse en las células formando un precipitado que contenga el ADN y fosfato de calcio. Como alternativa, el ADN desnudo también puede introducirse en las células formando una mezcla del ADN y DEAE-dextrano e incubando la mezcla con las células o incubando las células y el ADN juntos en un tampón apropiado y sometiendo las células a un pulso eléctrico de alto voltaje (por ejemplo, por electroporación). Otro procedimiento para introducir en células un ADN desnudo consiste en mezclar el ADN con una suspensión de liposomas que contenga lípidos catiónicos. A continuación, el complejo de ADN/liposoma se incuba con las células. El ADN desnudo también puede inyectarse directamente en las células mediante, por ejemplo, microinyección.

Como alternativa, el ADN desnudo también puede introducirse en las células complejando el ADN con un catión, tal como la polilisina, que se acopla a un ligando para un receptor de la superficie celular (véase, por ejemplo, Wu, G. y Wu, C.H., *J. Biol. Chem.*, 263:14621, 1988; Wilson *et al.* *J. Biol. Chem.*, 267:963-967, 1992; y la patente de EE. UU. n.º 5 166 320). La unión del complejo DE ADN-ligando al receptor facilita la captación del ADN por endocitosis mediada por el receptor.

El uso de vectores virales que contienen secuencias concretas de ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc que codifica una proteína, es un enfoque habitual para introducir secuencias de ácido nucleico en una célula. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de células recibe el ácido nucleico, lo que puede obviar la necesidad de seleccionar las células que han recibido el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan generalmente de manera eficiente en las células que han captado el ácido nucleico del vector viral. Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia de genes con fines de terapia génica (para un análisis, véase Miller, A.D., Blood, 76:271, 1990). Puede construirse un retrovirus recombinante que tenga insertado en el genoma retroviral un ácido nucleico que codifique una proteína de interés. Además, se pueden eliminar partes del genoma retroviral para que la replicación del retrovirus sea defectuosa. Este retrovirus de replicación defectuosa se encapsida entonces en viriones que pueden utilizarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas convencionales.

El genoma de un adenovirus puede manipularse de tal manera que codifique y exprese una proteína de interés, pero que esté inactivado en cuanto a su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase, por ejemplo, Berkner *et al.*, *BioTechniques*, 6:616, 1988; Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991; y Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992. Los expertos en la materia conocen los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.). Los adenovirus recombinantes tienen la ventaja de que no requieren células en división para ser vehículos eficaces de transporte de genes y pueden utilizarse para infectar una amplia diversidad de tipos celulares, incluido el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld *et al.*, 1992, citado anteriormente), las células endoteliales (Lemarchand *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6482-6486, 1992), hepatocitos (Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993) y células musculares (Quantin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2581-2584, 1992). Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en él) no se integra en el genoma de una célula hospedadora, sino que permanece episómico, evitando así los problemas potenciales que pueden producirse como resultado de la mutagénesis por inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del hospedador (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad del genoma adenoviral para transportar ADN extraño es grande, (hasta 8 kilobases) en comparación con otros vectores de transporte de genes (Berkner *et al.* citado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham, *J. Virol.* 57:267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales de replicación defectuosa que se utilizan en la actualidad tienen delecionados todos o parte de los genes virales E1 y E3, pero conservan hasta el 80 % del material genético adenoviral. El virus adenoasociado (AAV) es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un herpesvirus, como virus auxiliar para una replicación eficaz y un ciclo vital productivo (para un análisis, véase Muzyczka *et al.*, *Curr. Topics in Micro. and Immunol.*, 158:97-129, 1992). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no se dividen y presenta una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte *et al.*, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 7:349-356, 1992; Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 63:3822-3828, 1989; y McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1989). Los vectores que contienen tan sólo 300 pares de bases de AAV pueden encapsidarse e integrarse. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV como el descrito en Tratschin *et al.* (*Mol. Cell. Biol.*, 5:3251-3260, 1985) puede utilizarse para introducir ADN en las células. Se han introducido diversos ácidos nucleicos en diferentes tipos de células utilizando vectores de AAV (véase, por ejemplo, Hermonat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984; Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081, 1985; Wondisford *et al.*, *Mol. Endocrinol.*, 2:32-39, 1988; Tratschin *et al.*, *J. Virol.*, 51:611-619, 1984; y Flotte *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:3781-3790, 1993).

Cuando el procedimiento utilizado para introducir moléculas de ácido nucleico en una población de células dé como resultado la modificación de una gran proporción de las células y la expresión eficiente de la proteína por las células, la población de células modificadas puede ser utilizada sin aislamiento adicional o subclonación de células individuales dentro de la población. Es decir, puede haber suficiente producción de la proteína por parte de la población de células, de modo que no sea necesario aislar más las células y la población pueda utilizarse inmediatamente para sembrar un cultivo celular para la producción de la proteína. Como alternativa, puede ser deseable aislar y expandir una población homogénea de células a partir de unas pocas células o de una única célula que produzcan eficientemente la proteína o proteínas.

Como alternativa a la introducción en una célula de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, el ácido nucleico introducido puede codificar otro polipéptido o proteína que induzca o aumente el nivel de expresión de la proteína producida endógenamente por una célula. Por ejemplo, una célula puede ser capaz de expresar una proteína concreta, pero no hacerlo sin un tratamiento adicional de la célula. Del mismo modo, la célula puede expresar cantidades insuficientes de la proteína para el fin deseado. Así, puede utilizarse un agente que estimula la expresión de la proteína de interés para inducir o aumentar la expresión de esa proteína por la célula. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida puede codificar un factor de transcripción que active o regule al alza la transcripción de la proteína de interés. La expresión de dicho factor de transcripción conduce a su vez a la expresión, o a una expresión más robusta, de la proteína de interés.

En determinadas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de la proteína se introduce de forma estable en la célula hospedadora. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de la proteína se introduce transitoriamente en la célula hospedadora. Un experto en la materia podrá elegir entre introducir de forma estable o transitoria un ácido nucleico en la célula en función de sus necesidades experimentales.

Un gen que codifica una proteína de interés puede estar opcionalmente ligado a uno o más elementos reguladores de control genético. En determinadas realizaciones, un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva de la proteína. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un elemento de control genético que proporcione una expresión inducible de un gen que codifica la proteína de interés. El uso de un elemento de control genético inducible (por ejemplo, un promotor inducible) permite modular la producción de la proteína en la célula. Algunos ejemplos no limitantes de elementos de control genético inducibles potencialmente útiles para su uso en células eucariotas incluyen elementos regulados por hormonas (por ejemplo, véase Mader, S. y White, J.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5603-5607, 1993), elementos regulados por ligandos sintéticos (véase, por ejemplo, Spencer, D.M. *et al.*, Science, 262:1019-1024, 1993) y elementos regulados por radiaciones ionizantes (véase, por ejemplo, Manome, Y. *et al.*, Biochemistry, 32:10607-10613, 1993; Datta, R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10149-10153, 1992). De acuerdo con la invención, pueden utilizarse otros sistemas reguladores específicos de célula u otros sistemas reguladores conocidos en la técnica.

Un experto en la materia podrá elegir y, opcionalmente, modificar adecuadamente el procedimiento de introducción de genes que hace que la célula exprese la proteína de interés de acuerdo con las indicaciones de la presente invención.

#### *Aislamiento de la proteína expresada*

En general, será deseable aislar y/o purificar proteínas expresadas según la presente invención. En determinadas realizaciones, la proteína expresada se secreta al medio y, por lo tanto, las células y otros sólidos pueden retirarse, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, como primera etapa en el proceso de purificación.

Como alternativa, la proteína expresada puede unirse a la superficie de la célula hospedadora. Por ejemplo, se puede retirar el medio y lisar las células hospedadoras que expresan la proteína como primera etapa del proceso de purificación. La lisis de las células hospedadoras de mamífero puede lograrse por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, incluida la alteración física mediante esferas de vidrio y la exposición a condiciones de pH elevado.

La proteína expresada puede aislarse y purificarse por procedimientos convencionales que incluyen, entre otros, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de exclusión por tamaño y de hidroxipatita), filtración en gel, centrifugación o solubilidad diferencial, precipitación con etanol y/o mediante cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 2ª edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1987; Higgins, S.J. y Hames, B.D. (eds.), Protein Expression: A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, vol. 182), Academic Press, 1997). Para la cromatografía de inmunoafinidad en concreto, la proteína puede aislarse uniéndola a una columna de afinidad que comprenda anticuerpos que hayan sido generados contra esa proteína y que hayan sido fijados a un soporte estacionario. Como alternativa, pueden fijarse a la proteína, mediante técnicas recombinantes convencionales, marcadores de afinidad, tales como una secuencia de la cubierta del virus de la gripe, poli-histidina o glutatión-S-transferasa, para facilitar la purificación mediante el paso por la columna de afinidad adecuada. Los inhibidores de proteasas, tales como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), la leupeptina, la pepstatina o la aprotinina, pueden añadirse en cualquier etapa o en todas las etapas para reducir o eliminar la degradación de la proteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de proteasas son especialmente ventajosos cuando hay que lisar las células para aislar y purificar la proteína expresada.

Un experto en la materia apreciará que la técnica de purificación exacta variará en función del carácter de la proteína que se va a purificar, el carácter de las células a partir de las cuales se expresa la proteína y/o la composición del medio en el que se cultivaron las células.

#### *Formulaciones farmacéuticas*

Los polipéptidos o proteínas producidos tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones de la invención descritas anteriormente pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse primero para su administración por cualquier vía disponible, incluidas, entre otras, las vías parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención suelen incluir un polipéptido o proteína purificados expresados a partir de una línea celular de mamífero, un agente de administración (es decir, un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, un tensioactivo, etc., como se ha descrito anteriormente) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse a las composiciones compuestos activos suplementarios. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con la vía de administración prevista. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. El preparado parenteral puede presentarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable suelen incluir soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato ("phosphate buffered saline", PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida hasta el punto de que se pueda inyectar fácilmente. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben protegerse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo pertinente puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el polipéptido o proteína purificado en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el polipéptido purificado o la proteína expresada a partir de una línea celular de mamífero en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración. Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Con la finalidad de la administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificados pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse utilizando un vehículo fluido para su uso como enjuague bucal. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa, un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante, tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Las formulaciones para la administración oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

Para la administración por inhalación, las composiciones de la invención que comprenden un polipéptido o proteína purificados expresados a partir de una línea celular de mamífero y un agente de administración se administran preferentemente en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como el dióxido de carbono, o un nebulizador. La presente invención contempla en concreto la administración de las composiciones mediante aerosol nasal, inhalador u otra administración directa en las vías respiratorias superiores y/o inferiores. Se ha demostrado que la administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra los virus de la gripe induce respuestas de linfocitos T CD8, lo que indica que al menos algunas células



del tracto respiratorio pueden captar ADN cuando se administra por esta vía, y que los agentes de administración de la invención mejorarán la captación celular. Según determinadas realizaciones de la invención, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado expresado a partir de una línea celular de mamífero y un agente de administración se formulan en forma partículas porosas grandes para administración en aerosol.

- 5 La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados a la barrera que se desea permeabilizar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en el arte, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede realizarse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el
- 10 polipéptido o la proteína purificados y los agentes de administración se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Las composiciones también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

- 15 Las composiciones se preparan con vehículos que protegerán al polipéptido o proteína frente a la eliminación rápida del organismo, tales como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como el etileno-acetato de vinilo, los polianhídridos, el poli(ácido glicólico), el colágeno, los poliortoésteres y el poli(ácido láctico). Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las
- 20 suspensiones liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) también pueden utilizarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Pueden prepararse según procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4 522 811.

- 25 Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma farmacéutica unitaria, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de polipéptido o proteína activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

- 30 El polipéptido o proteína expresado según la presente invención puede administrarse a diversos intervalos y durante diferentes periodos de tiempo según sea necesario, por ejemplo, una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, de 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 y 7 semanas, aproximadamente durante 4, 5 o 6 semanas, etc. El experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en la dosis y el tiempo necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, incluidos, entre otros, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Generalmente, el tratamiento de
- 35 un sujeto con un polipéptido o proteína como se describe en el presente documento puede incluir un único tratamiento o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Se entiende además que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y, opcionalmente, pueden adaptarse al receptor concreto, por ejemplo, mediante la administración de dosis crecientes hasta alcanzar una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal concreto puede depender de diversos factores,
- 40 incluida la actividad del polipéptido o proteína específicos empleados, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que se desea modular.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con las instrucciones de administración.

- 45 Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la presente invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las que se muestran y describen en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente y entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

### Ejemplos

- 50 *Ejemplo 1: Identificación de los subproductos metabólicos, que se acumulan en cultivos de alimentación discontinua, que tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento de células de mamífero en cultivo*

Objetivo:

- Este experimento se llevó a cabo para identificar los principales inhibidores del crecimiento (subproductos metabólicos) que se acumulan en los cultivos de células de mamífero con restricción de glucosa y con alimentación discontinua
- 55 convencional, utilizando enfoques de perfilado global de metabolitos.

Materiales y procedimientos:

## Células y medio

5 En el experimento actual se utilizaron células CHO con un sistema de expresión de glutamina sintasa (disponible en el mercado en Lonza) (en adelante GS-CHO, línea celular A) y que expresaban un anticuerpo recombinante. En este experimento se utilizaron dos tipos de medio. El primer medio es el "medio A" que se utiliza para la inoculación del experimento en el día 0 del cultivo. El segundo medio es el "medio B", que es el medio nutritivo enriquecido utilizado como medio de alimentación para los procesos de cultivo convencional y de alimentación discontinua HIPDOG (descrito en la siguiente sección). El medio A es una versión enriquecida del medio 9 sin insulina (documento US7294484, tabla 14), con ligeras diferencias en las concentraciones de bicarbonato sódico y cloruro de potasio, y que contiene Pluronic F68 en lugar de poli(alcohol vinílico). Se enriqueció añadiendo medio 5 sin glutamina al 10 % (documento US7294484, tabla 7) y aumentando aún más las concentraciones de ocho aminoácidos (Glu, Tyr, Gly, Phe, Pro, Thr, Trp y Val). Las concentraciones de aminoácidos figuran en la tabla 1.

Tabla 1: Concentración de aminoácidos en el medio A

Aminoácidos	Concentración en el medio A ( mM)
alanina	0,4
arginina	5,3
asparagina•H <sub>2</sub> O	21,1
ácido aspártico	2,3
cisteína•HCl•H <sub>2</sub> O	0,4
cistina•2HCl	1,5
ácido glutámico	0
glutamato monosódico	2,0
glutamina	0
glicina	3,6
histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	2,7
isoleucina	5,4
leucina	9,4
lisina•HCl	8,9
metionina	3,1
fenilalanina	4,5
prolina	9,1
serina	11,8
treonina	10,8
triptófano	2,3
tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	5,1

Aminoácidos	Concentración en el medio A ( mM)
valina	10,3

El medio B tiene la misma composición que el medio 5 (documento US7294484, tabla 7), pero con niveles más altos de aminoácidos (en un factor de 2,5). Las concentraciones de aminoácidos en el medio B se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Concentración de aminoácidos en el medio B

Aminoácidos	Concentración en el medio B ( mM)
alanina	6,0
arginina	32,9
asparagina•H <sub>2</sub> O	54,0
ácido aspártico	15,0
cisteína•HCl•H <sub>2</sub> O	0,0
cistina•2HCl	4,7
ácido glutámico	6,0
glutamato monosódico	0,0
glutamina	0,0
glicina	6,0
histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	10,5
isoleucina	27,0
leucina	38,9
lisina•HCl	30,0
metionina	12,0
fenilalanina	15,0
prolina	18,0
serina	45,2
treonina	24,0
triptófano	4,8
tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	12,0
valina	24,0

## Configuración del biorreactor

Se emplearon dos condiciones, que incluían un proceso convencional de alimentación discontinua y un proceso de alimentación discontinua con restricción de glucosa. En el proceso de alimentación discontinua con restricción de glucosa (en adelante, cultivo HIPDOG), la glucosa se limitó mediante el uso de la tecnología HIPDOG (Gagnon *et al.*, 2011). La banda sin cambios de pH utilizada mientras funcionaba el control de HIPDOG fue de 7,025 +/- 0,025.

El proceso convencional fue idéntico al proceso/cultivo HIPDOG en lo que respecta a la densidad celular del inóculo deseada (1E6 células/ml), los medios utilizados, el volumen de cultivo (1 l), la cantidad de alimentación añadida a diario al cultivo y los parámetros del proceso, incluidos la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la velocidad de agitación (267 rpm). Los dos cultivos sólo diferían en sus niveles de glucosa. En el cultivo convencional, la glucosa se mantuvo a más de 2 g/l entre los días 2 y 5, mientras que, en el cultivo HIPDOG, la glucosa fue consumida por las células de forma natural hasta que el nivel de glucosa cayó hasta un punto en el que las células empezaron a consumir también ácido láctico (observado por un ligero aumento del pH del cultivo) y comenzó la estrategia de alimentación/tecnología HIPDOG. Después del día 5, los niveles de glucosa en ambas condiciones se mantuvieron en concentraciones superiores a 2 g/l mediante la alimentación de glucosa según fuera necesario y se trataron de manera similar hasta el día 12. La densidad de células viables y la concentración de lactato y amoníaco en el medio de cultivo celular se midieron a diario en ambas condiciones. El medio de base utilizado es el medio A y el medio de alimentación utilizado fue el medio B.

Para el análisis metabólico, se recogieron y analizaron muestras de medio agotado y de sedimentos celulares de ensayos en reactores por duplicado, realizados para cada condición. Los puntos temporales considerados para el análisis incluyen los días 0, 2, 3, 5, 7, 9 y 10. El enfoque metabólico utilizado empleó técnicas de RMN (grupos 4 y 5 de la tabla 3), LC/MS y GC/MS (grupos 1 a 3 de la tabla 3) para evaluar los niveles relativos de metabolitos en diferentes momentos del cultivo. A continuación se describen los detalles de la preparación de las muestras y el tipo de equipos/procedimientos utilizados para los análisis por RMN, LC/MS y GC/MS. Se midieron y calcularon los niveles relativos (cambios en n.º de veces) de todos los metabolitos. Los niveles relativos se determinaron tanto en el medio agotado como en las muestras de sedimentos celulares, que se calcularon en función de los cambios en n.º de veces en comparación con el nivel del metabolito cuando se detectó por primera vez. Los cambios en n.º de veces se utilizaron para identificar los metabolitos que se acumulaban a niveles muy altos en el séptimo día del cultivo HIPDOG y del cultivo convencional de alimentación discontinua.

## Procedimientos de análisis metabólico

## Cromatografía líquida/de gases con espectrometría de masas

La preparación de la muestra se llevó a cabo mediante una extracción con metanol para eliminar la fracción proteica y permitir al mismo tiempo la máxima recuperación de moléculas pequeñas. El extracto resultante se secó al vacío y posteriormente se utilizó para la preparación de muestras para el instrumento apropiado, ya fuera LC/MS o GC/MS.

La parte de LC/MS de la plataforma se basó en un UPLC ACQUITY de Waters y un espectrómetro de masas Thermo-Finnigan LTQ, que consistía en una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas de trampa de iones lineal (LIT). La muestra se analizó independientemente en los modos de iones positivos y negativos. La muestra se reconstituyó en condiciones ácidas para el modo de iones positivos y se eluyó en gradiente utilizando agua y metanol, que contenían ambos un 0,1 % de ácido fórmico, mientras que, para el modo de iones negativos, la muestra se reconstituyó en extractos básicos, que también utilizaron agua/metanol, que contenían bicarbonato amónico 6,5 mM para la elución en gradiente. El análisis MS alternó entre MS y exploraciones de MS<sup>2</sup> dependientes de los datos utilizando exclusión dinámica.

Las muestras destinadas al análisis GC/MS se volvieron a secar al vacío durante un mínimo de 24 horas antes de ser derivatizadas en nitrógeno seco utilizando bistrimetil-silil-trifluoroacetamida (BSTFA). La columna de GC contenía fenilo al 5 % y la rampa de temperatura comenzó en 40 °C hasta 300 °C en un período de 16 minutos. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de cuadrupolo único de barrido rápido Thermo-Finnigan Trace DSQ mediante ionización por impacto de electrones. El instrumento se ajustó y calibró con frecuencia para comprobar su resolución y precisión de masa.

Se extrajeron los datos de los archivos de datos de espectrometría de masas en bruto y se identificaron los picos. Posteriormente, los picos se anotaron y cuantificaron (valores de intensidad arbitrarios) con información sobre los compuestos mediante comparación con las entradas de un banco de patrones purificados o entidades desconocidas recurrentes. La combinación de las propiedades cromatográficas y los espectros de masas dio una indicación de coincidencia con el compuesto específico o con una entidad isobárica.

## Preparación de muestras de RMN, adquisición y procesamiento de datos

Se filtraron 1000 µl de cada muestra utilizando tubos de filtro de microcentrífuga Nanosep 3K Omega durante 60 minutos y se utilizaron 630 µl de la muestra filtrada para el análisis de RMN. Estos filtros se conservan con glicerol, por lo que pueden aparecer trazas de glicerol en el análisis. Se añadió solución de patrón interno a cada solución de

muestra, y la mezcla resultante se agitó en vórtice durante 30 s. Se transfirieron 700 µl de la solución centrifugada a un tubo de RMN para la adquisición de datos.

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro de RMN VNMRS 700 MHz de cuatro canales Varian equipado con una sonda biomolecular de triple resonancia  $1\text{H}/^{13}\text{C}$  refrigerada criogénicamente con autoajuste. La secuencia de pulsos utilizada fue una 1D-ttnoesy con una presaturación de 990 ms en agua y un tiempo de adquisición de 4 s. Los espectros se recogieron con 32 transitorios y 4 barridos de estado estacionario a 298 K.

Los espectros fueron procesados y los archivos .cnx fueron generados usando el módulo Processor en Chenomx NMR Suite 8.0. Los compuestos se identificaron y cuantificaron utilizando el módulo Profiler de Chenomx NMR Suite 8.0 con la Chenomx Compound Library versión 9, que contiene 332 compuestos. A efectos de información, las concentraciones perfiladas se han corregido para reflejar la composición de la muestra original, en lugar del contenido del tubo de RMN. Durante la preparación de las muestras, cada una de ellas se diluye introduciendo un patrón interno y, en caso necesario, para aumentar el volumen analizado de una muestra pequeña.

#### Resultados:

Inicialmente, las células crecieron exponencialmente tanto en cultivos convencionales como en cultivos HIPDOG y alcanzaron densidades celulares máximas el día 6 y el día 7, respectivamente, y el cultivo HIPDOG alcanzó unas densidades celulares máximas mucho más altas (figura 1). Los niveles de lactato en el proceso/cultivo HIPDOG se mantuvieron bajos debido a la aplicación del control de HIPDOG (entre el día 2-día 5), mientras que los niveles de lactato se acumularon a niveles muy altos en el caso del cultivo convencional de alimentación discontinua. El amoníaco también se mantuvo en niveles bajos durante el cultivo convencional e HIPDOG mediante el uso de células que incluían un sistema de expresión de glutamina sintetasa. La valoración (cantidad de proteína de interés por litro de medio de cultivo celular) se midió al final del cultivo (día 12). El cultivo HIPDOG alcanzó una valoración más elevada en comparación con el proceso convencional. Las diferencias en las densidades celulares y en los valores de las valoraciones son probablemente el resultado de las diferencias en las acumulaciones de lactato observadas entre los dos cultivos.

Los metabolitos que se acumulaban a altos niveles en el día 7 del cultivo HIPDOG se identificaron basándose en los cambios en  $n^\circ$  de veces medidos utilizando las técnicas de perfilado global de metabolitos. Para cada uno de los metabolitos identificados anteriormente, se determinó la concentración en la que el metabolito afecta negativamente al crecimiento de la célula mediante experimentos de enriquecimiento utilizando compuestos purificados (véase el ejemplo 3). Los resultados de estos experimentos se utilizaron para reducir la lista de posibles nuevos inhibidores. Mediante este proceso se identificaron un total de 9 inhibidores. La lista de los 9 metabolitos identificados como inhibidores potenciales, así como su posible fuente metabólica en el medio de cultivo celular, se recogen en la tabla 3.

La tabla 3 muestra los nombres y las clases funcionales de los nueve metabolitos identificados como inhibidores putativos del crecimiento que se acumulan en los cultivos de alimentación discontinua de GS-CHO

<u>Grupo</u>	<u>Metabolito</u>	<u>Clase funcional/Fuente metabólica</u>
1	3-(4-hidroxifenil)lactato (HPLA)	Metabolismo de la fenilalanina y la tirosina
	4-hidroxifenilpiruvato	
	Fenil-lactato (PLA)	Metabolismo de la fenilalanina
2	Indol-lactato (indol-3-lactato)	Metabolismo del triptófano
	Ácido indolcarboxílico (ácido indol-3-carboxílico)	
3	Homocisteína	Metabolismo de la metionina
	Ácido 2-hidroxibutírico	
4	Isovalerato	Leucina
5	Formiato	Serina, treonina y glicina

Ejemplo 2: Determinación de la concentración a la que se acumulan los inhibidores putativos en fases tardías de los cultivos HIPDOG de alimentación discontinua

Objetivo:

- 5 Este experimento se llevó a cabo para evaluar las concentraciones de los inhibidores de crecimiento putativos recién identificados (subproductos metabólicos) en diferentes puntos temporales en los cultivos de alimentación discontinua HIPDOG de células GS-CHO.

Materiales y procedimientos:

- 10 La configuración experimental es la misma que la definida en el ejemplo 1. La cuantificación se realizó mediante los procedimientos de LC/MS y GC/MS para los metabolitos de los dos primeros grupos de la tabla 3 y se utilizó la tecnología NMR para la cuantificación de los metabolitos de los grupos 4 y 5. Para los dos primeros grupos de metabolitos enumerados en la columna de metabolitos de la tabla 3, se obtuvieron en el mercado compuestos purificados y se prepararon soluciones de estos compuestos en concentraciones conocidas utilizando el medio A como disolvente base. Utilizando un enfoque de perfilado global de metabolitos con LC/MS y GC/MS similar al utilizado para la identificación de inhibidores y la cuantificación relativa (véase el ejemplo 1), se prepararon curvas de calibración independientes para cuatro metabolitos. Estas curvas de calibración son correlaciones matemáticas de las cantidades reales del metabolito utilizado en las técnicas de LC/MS y GS/MS con los valores de intensidad generados por las mismas. Las correlaciones se utilizan posteriormente junto con los valores de intensidad generados en el ejemplo 1 para calcular la concentración de los metabolitos en diferentes puntos temporales del cultivo.

Resultados:

- 20 Las concentraciones de los metabolitos recién identificados de los dos primeros grupos de la tabla 3 se determinaron usando las curvas de calibración desarrolladas, y las concentraciones para los metabolitos enumerados en los grupos 4 y 5 se determinaron mediante tecnología de RMN como se analizó en la sección Materiales y procedimientos del ejemplo 1. La concentración de seis inhibidores putativos (fenil-lactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, indol-lactato, isovalerato y formiato) en el día 7 de los cultivos de alimentación discontinua HIPDOG se indican en la
- 25 tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones de seis metabolitos en el día 7 del cultivo HIPDOG

<u>Metabolito</u>	<u>Día 7</u> <u>Concentración ( mM)</u>
3-(4-hidroxifenil)lactato (HPLA)	0,38
4-hidroxifenilpiruvato	0,08
Fenil-lactato (PLA)	0,20
Indol-lactato	0,26
Isovalerato	2,41
Formiato	3,97

Ejemplo 3: Experimento para establecer el efecto supresor del crecimiento de los inhibidores putativos identificados en las concentraciones detectadas en el día 7 del cultivo de alimentación discontinua HIPDOG

- 30 Objetivo:

- 35 Este experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de los inhibidores putativos recién identificados, en las concentraciones determinadas en el día 7 del cultivo HIPDOG, sobre el crecimiento de las células GS-CHO en cultivo. En primer lugar, se comprobó el efecto independiente de los nueve metabolitos (fenil-lactato, 3-hidroxifenil-lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, indol-lactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formiato) sobre el crecimiento de las células. Posteriormente, se comprobó el efecto sinérgico de cuatro metabolitos (fenil-lactato, 3(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato e indol-lactato) sobre el crecimiento celular.

Materiales y procedimientos:

Se inocularon células GS-CHO productoras de un anticuerpo recombinante en bajas densidades de células viables ( $0,1 \times 10^6$  células/ml) en diversas condiciones en cultivos en placas de 6 pocillos de 5 ml de volumen. Estas condiciones incluyen medio A fresco o Medio A fresco enriquecido con cuatro inhibidores putativos en concentraciones detectadas en el día 7 del cultivo HIPDOG del ejemplo 1 (fenil-lactato a 0,2 mM, 3-(4-hidroxifenil)lactato a 0,38 mM, 4-hidroxifenilpiruvato 0,08 mM e indol-lactato 0,26 mM). En un experimento separado, las células GS-CHO productoras de un anticuerpo recombinante se inocularon en bajas densidades de células viables en medio A fresco enriquecido con diferentes concentraciones de 9 inhibidores (ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, fenil-lactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, indol-lactato, isovalerato y formiato) con un inhibidor cada vez por condición. El pH del medio A, enriquecido con uno cualquiera de los nueve metabolitos o cualquier combinación de los nueve metabolitos, se ajustó a 7 antes de inocular las células (el día 0). Las concentraciones ensayadas son:

- ácido indolcarboxílico: 0, 0,5 y 1 mM
- homocisteína: 0, 0,5 y 1 mM
- ácido 2-hidroxibutírico: 0, 1 y 5 mM
- fenil-lactato: 0, 1 y 5 mM
- 3-(4-hidroxifenil)lactato: 0, 0,1, 0,3, 0,5, 1 y 5 mM
- 4-hidroxifenilpiruvato: 0, 0,05, 0,1 y 0,25 mM
- indol-lactato: 0, 1 y 3 mM
- isovalerato: 0, 1, 2,5 y 5 mM
- formiato: 0, 2, 4 y 6 mM

Para el indol-lactato, se preparó la solución madre (500 mM) en DMSO. Por lo tanto, se incluyeron condiciones de enriquecimiento de DMSO puro ("DMSO cont" o DMSO control) para cada concentración de indol-lactato ensayada, con el fin de controlar el efecto del DMSO sobre el crecimiento de las células. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado o triplicado. El crecimiento de las células en las condiciones descritas se controló durante 5 o 6 días.

#### Resultados:

Se investigó el efecto independiente de los nueve inhibidores sobre el crecimiento de las células GS-CHO (figura 2, figura 3, figura 4 y figura 5). Se observó que el ácido indolcarboxílico y el 4-hidroxifenilpiruvato tenían un potente efecto negativo sobre el crecimiento de las células en concentraciones de 1 mM o inferiores. Se observó una modesta inhibición del crecimiento cuando las células GS-CHO se expusieron a homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico o lactato de 3(4-hidroxifenilo) en concentraciones superiores a 0,5 mM o 1 mM. El L-fenil-lactato tuvo un efecto leve sobre el crecimiento de las células en una concentración de 1 mM. El indol-lactato mostró poco o ningún efecto sobre el crecimiento de las células en concentraciones de 3 mM o inferiores. El formiato tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento en concentraciones de 2 mM y superiores. El isovalerato tuvo un efecto negativo significativo sobre el crecimiento de las células en concentraciones superiores a 1 mM.

Experimentos anteriores demostraron que la concentración en la que se inhibe el crecimiento celular era mucho mayor cuando cada uno de los nueve inhibidores putativos se añadía independientemente que la concentración observada en el día 7 del cultivo de alimentación discontinua HIPDOG. Por lo tanto, posteriormente se investigó el efecto de estos inhibidores cuando se trataban combinados. Curiosamente, al tratar las células con la combinación de cuatro [fenil-lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, 3(4-hidroxifenil)lactato, indol-lactato] de los nueve metabolitos, en concentraciones detectadas en el día 7 de cultivo HIPDOG, el crecimiento celular se inhibió significativamente en comparación con el crecimiento celular en el medio fresco (figura 6). Estos datos indican que los cuatro metabolitos mencionados actúan de forma sinérgica para inhibir el crecimiento de las células. Los nueve metabolitos mencionados son subproductos del metabolismo de la fenilalanina, la tirosina, el triptófano, la leucina, la serina, la treonina, la metionina y la glicina. La identificación de las enzimas de estas vías que contribuyen a la biosíntesis de los inhibidores proporciona una estrategia para modificar genéticamente las células con el fin de suprimir la producción de los mismos mediante la modificación de genes.

Dado que estos cuatro metabolitos son subproductos del metabolismo de la fenilalanina, tirosina y triptófano, la reducción de las concentraciones de estos aminoácidos precursores en el cultivo puede limitar la formación de los correspondientes metabolitos inhibidores. Además, dado que los metabolitos de la metionina (homocisteína y 2-hidroxibutirato) y los metabolitos de la leucina, serina, treonina y glicina (isovalerato y formiato) también tienen un efecto negativo sobre el crecimiento celular, la reducción de los niveles de metionina, leucina, serina, treonina y glicina en el cultivo podría limitar potencialmente la formación de estos metabolitos y favorecer el crecimiento celular.

Ejemplo 4: Reducción del efecto supresor del crecimiento de los inhibidores recién identificados mediante estrategias de limitación de nutrientes en cultivos de alimentación discontinua

Objetivo:

- 5 Este experimento se realizó para reducir la formación de inhibidores recién identificados limitando el suministro de las fuentes de carbono responsables de su biosíntesis. El objetivo de este experimento era evaluar si dicha reducción en la formación de inhibidores alivia la supresión del crecimiento en las últimas fases del cultivo, lo que se traduce en un aumento de las densidades de células viables máximas en los cultivos de alimentación discontinua.

Materiales y procedimientos:

Células y configuración del biorreactor

- 10 En el experimento actual se utilizaron células GS-CHO que expresaban un anticuerpo recombinante (línea celular A). Como parte de este experimento, se ensayaron dos condiciones: A) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de cuatro aminoácidos ((tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano) (condición de contenido bajo en AA)), B) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (condición/cultivo HIPDOG de control). Las células en crecimiento exponencial procedentes del cultivo de siembra se
- 15 inocularon a  $1 \times 10^6$  células/ml en cada biorreactor de producción. En ambas condiciones, la estrategia HIPDOG se aplicó entre el día 2 y el día 7 del cultivo. En la condición de contenido bajo en aminoácidos, las concentraciones de tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los siete primeros días del cultivo, tras lo cual se ajustaron a los niveles de cada uno de esos aminoácidos en la condición HIPDOG de control. Después del séptimo día, ambas condiciones se trataron de forma similar. Se midieron a diario la densidad de células
- 20 viables, las concentraciones de lactato, de amoníaco y de aminoácidos (los aminoácidos sólo se midieron durante los siete primeros días). Para ambas condiciones, la densidad de células viables del inóculo deseada ( $1 \times 10^6$  células/ml), y el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del proceso, incluidos la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la velocidad de agitación (267 rpm), fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición HIPDOG control fue el medio A y el utilizado en la condición de contenido bajo en AA fue la versión modificada del medio A con bajas concentraciones de los cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina a aproximadamente 0,6 mM). El medio de alimentación utilizado para el cultivo HIPDOG de control fue el medio B. Para la condición de contenido
- 25 bajo en AA, se formuló y utilizó como medio de alimentación el medio B original o una versión modificada del medio B con mayor concentración de cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, metionina y fenilalanina) (un 60 % más alto para la metionina y niveles aproximadamente un 100 % más altos para la tirosina, el triptófano y la fenilalanina en comparación con el medio B de alimentación original). Los niveles de los cuatro aminoácidos en la versión modificada del medio B se configuraron basándose en las tasas de consumo específicas de las células para los cuatro aminoácidos y en el programa de alimentación previamente determinado para la línea celular A en un proceso de cultivo HIPDOG. Las concentraciones de aminoácidos se midieron cada día utilizando un procedimiento de aminoácidos basado en UPLC que se describe en detalle más adelante. En función del nivel de aminoácidos en un
- 30 punto de muestreo determinado y del programa de alimentación, se eligió uno de los dos tipos de medio B (concentración original o superior) como medio de alimentación hasta el siguiente punto de muestreo, de forma que la concentración de los cuatro aminoácidos se situara entre 0,5 mM-1 mM en el siguiente punto de muestreo.

Análisis de aminoácidos

- 40 Se mezclaron 10 µl de una solución de mezcla de aminoácidos patrón o una muestra de medio agotado (muestra diluida 10 veces) con 70 µl de tampón borato AccQ•Tag Ultra (kit de aplicaciones Waters UPLC AAA H-Class [176002983]), y se añadieron 20 µl de reactivo AccQ•Tag previamente disuelto en 1,0 ml de diluyente de reactivo AccQ•Tag Ultra. Se dejó que la reacción se desarrollase durante 10 min a 55 °C. El análisis cromatográfico líquido se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC, equipado con un gestor de disolventes binarios, un automuestreador, un calentador de columna y un detector PDA. La columna de separación fue una columna Waters AccQ•Tag Ultra (2,1
- 45 mm d.i.  $\times$  100 mm, partículas de 1,7 µm). El calentador de la columna se ajustó a 55 °C y el caudal de la fase móvil se mantuvo a 0,7 ml/min. El eluyente A fue disolvente A concentrado de AccQ•Tag Ultra al 10 %, y el eluyente B fue disolvente B de AccQ•Tag Ultra al 100 %. El gradiente de separación no lineal fue 0-0,54 min (A al 99,9 %), 5,74 min (A al 90,0 %), 7,74 min (A al 78,8 %), 8,04-8,64 min (A al 40,4 %), 8,73-10 min (A al 99,9 %). Se inyectó un microlitro de muestra para el análisis. El detector PDA se ajustó a 260 nm. Los tiempos de elución previamente determinados para los aminoácidos se utilizan para identificar los picos de aminoácidos específicos en el cromatograma para cada muestra. Las concentraciones de aminoácidos se calcularon utilizando el área bajo el pico y se generó la curva de calibración utilizando la solución patrón (Amino Acids Standard H, Thermo Scientific, PI-20088).
- 50

Resultados:

- 55 Las concentraciones de los aminoácidos se mantuvieron satisfactoriamente entre 0.5 mM-1 mM en las condiciones de contenido bajo en AA (figura 8 y Figura 9). Las concentraciones de aminoácidos en el proceso HIPDOG de control se mantuvieron elevadas a lo largo del cultivo. Como se muestra en la figura 7, las densidades celulares en la condición de bajo AA alcanzaron un máximo de aproximadamente  $35 \times 10^6$  células/ml en el día 7, mientras que las densidades celulares en la condición de control de HIPDOG alcanzaron un máximo de aproximadamente  $32 \times 10^6$  células/ml. Los



niveles de valoración de la recolección en la condición de bajo AA (5,3 g/l) fueron un 18 % superiores a los de la condición de control (4,5 g/l). Claramente, la limitación del suministro de aminoácidos aumentó las densidades celulares (y, por tanto, la valoración) en las últimas fases de los cultivos.

5 El ejemplo 5 demuestra que tal aumento en el crecimiento y la productividad puede explicarse como resultado de una producción reducida de los inhibidores recién identificados.

Ejemplo 5: Demostración de (i) la reducción de la acumulación de los inhibidores recién identificados mediante la limitación de aminoácidos y (ii) la reproducibilidad del efecto positivo de dicha limitación de metabolitos inhibidores sobre el crecimiento de células GS-CHO (línea celular A) en cultivos de alimentación discontinua.

Objetivo:

10 El objetivo principal de este ejemplo era demostrar la reducción de la acumulación de los inhibidores recién identificados en cultivos de alimentación discontinua limitando el suministro de las fuentes de carbono (aminoácidos) responsables de su biosíntesis. En este ejemplo, se incluyen dos experimentos para demostrar que dicha reducción  
15 alivia la supresión del crecimiento en las últimas fases del cultivo de alimentación discontinua, lo que da como resultado un aumento de las densidades de células viables máximas.

Materiales y procedimientos:

Células y configuración del biorreactor

La línea celular A se utilizó en los dos experimentos realizados como parte de este ejemplo. En el primer experimento se ensayaron tres condiciones:

- 20 A) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano (condición de contenido bajo en 4AA + HIPDOG para el cultivo),  
B) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, serina, treonina y glicina (condición de contenido bajo en 8AA + HIPDOG), y,  
25 C) dos cultivos de alimentación discontinua HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (HIPDOG 1 e HIPDOG 2).

En un segundo experimento se ensayaron dos condiciones:

- A) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, serina, treonina y glicina (condición de contenido bajo en 8AA + HIPDOG), y,  
30 B) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano (condición de contenido bajo en 4AA + HIPDOG).

El primer experimento se realizó durante 12 días, mientras que el segundo se realizó durante 16 días.

En ambos experimentos, se inocularon células en crecimiento exponencial procedentes de cultivos de siembra a  $1 \times 10^6$  células/ml en cada biorreactor de producción. Para todas las condiciones, el control de HIPDOG se aplicó entre el día 2 y el día 7 del cultivo. En las condiciones de contenido bajo en aminoácidos, las concentraciones de los  
35 cuatro u ocho aminoácidos mencionados se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los siete primeros días del cultivo, tras lo cual se ajustaron a los niveles más próximos a los respectivos aminoácidos en las condiciones de HIPDOG de control. Después del séptimo día, ambas condiciones se trataron de forma similar. Se midieron a diario las concentraciones de células viables, amoníaco y aminoácidos. Para todas las condiciones, la densidad de células viables del inóculo deseada ( $1 \times 10^6$  células/ml), el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del proceso, incluidos la  
40 temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la velocidad de agitación (259 rpm), fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición HIPDOG fue el medio A y el utilizado en condiciones de bajo contenido en aminoácidos fue la versión modificada del medio A con bajas concentraciones de cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina aproximadamente 0,6 mM) u ocho aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina, metionina, leucina, serina, treonina y glicina aproximadamente 0,6 mM). El medio de alimentación utilizado para todas las condiciones fue el medio B. Las  
45 concentraciones de aminoácidos se midieron cada día utilizando el procedimiento de aminoácidos basado en UPLC descrito en el ejemplo 4. En las condiciones de bajo contenido en aminoácidos, en función del nivel de aminoácidos en un punto de muestreo determinado y del programa de alimentación que se iba a seguir, se añadieron soluciones concentradas de aminoácidos a las condiciones, de modo que la concentración de los cuatro aminoácidos o de los ocho aminoácidos en las condiciones de bajo contenido en aminoácidos correspondientes se situara entre 0,5 mM-  
50 1 mM en el siguiente punto de muestreo. Se analizaron muestras de medio agotado de diferentes condiciones de ambos experimentos para determinar los niveles de los inhibidores recién identificados utilizando la tecnología de RMN descrita en la sección de Materiales y procedimientos del ejemplo 1.

## Resultados:

En el primer experimento, las concentraciones de los aminoácidos se mantuvieron satisfactoriamente entre 0,5 mM-1 mM en ambas condiciones de contenido bajo en 4AA y contenido bajo en 8AA hasta el día 7 de los cultivos de alimentación discontinua (figuras 11-14). Esta limitación de los niveles de aminoácidos en las dos condiciones dio lugar a niveles más bajos de acumulación de los metabolitos recién identificados (figura 15 y figura 16). Se perfilaron específicamente el isovalerato, el formiato, el 3-hidroxifenil-lactato y el indol-3-lactato. El isovalerato y el formiato son subproductos de la leucina, la serina, la glicina y la treonina, que se controlan a niveles bajos sólo en la condición de contenido bajo en 8AA. Estos aminoácidos no se controlan a niveles bajos en la condición de contenido bajo en 4AA. En consecuencia, sólo se observaron concentraciones significativamente más bajas de isovalerato en la condición de contenido bajo en 8AA. Los niveles de isovalerato fueron más altos en las condiciones de control de HIPDOG y en la condición de contenido bajo en 4AA (figura 15B). Los niveles de formiato fueron similares en todas las condiciones en el día 7 del cultivo; sin embargo, por célula, la cantidad de formiato producida es menor en la condición de contenido bajo en 8AA en comparación con las condiciones HIPDOG. Los otros dos inhibidores perfilados, el 3-(4-hidroxifenil)lactato y el indol-3-lactato, son subproductos de los aminoácidos fenilalanina y triptófano, que se controlan a niveles más bajos tanto en condiciones de contenido bajo en 8AA como en condiciones de contenido bajo en 4AA. Se observaron concentraciones significativamente más bajas de estos dos inhibidores en las condiciones de contenido bajo en 8AA y contenido bajo en 4AA en comparación con las condiciones HIPDOG en el día 7 (figuras 15A y 16).

Las células en condiciones de contenido bajo en 8AA y contenido bajo en 4AA crecieron mejor que las condiciones de control (HIPDOG1 e HIPDOG 2) alcanzando un máximo de densidad celular de  $50 \times 10^6$  células/ml y  $45 \times 10^6$  células/ml, respectivamente, en el día 9, mientras que las densidades celulares en condiciones de control de HIPDOG alcanzaron un máximo de aproximadamente  $32 \times 10^6$  células/ml (figura 10A). Este aumento del crecimiento celular observado en las últimas fases de las condiciones de bajo contenido en aminoácidos puede explicarse como resultado de la menor acumulación de inhibidores en el cultivo (figuras 15 y 16). Además, las condiciones de bajo contenido en aminoácidos tuvieron valoraciones más altas en comparación con las condiciones HIPDOG de control hasta el día 9, y luego disminuyeron hasta igualar los niveles de valoraciones de las condiciones HIPDOG al final del cultivo (figura 10B). La reducción de la producción de proteínas después del día 9 en condiciones de bajo contenido en aminoácidos se atribuyó al casi agotamiento de los niveles de tirosina en los cultivos después del día 9 (figura 11A).

El segundo experimento fue realizado para verificar y reproducir el efecto positivo incrementado de limitar la leucina, serina, glicina y treonina en la condición de contenido bajo en 8AA cuando se compara con la condición de contenido bajo en 4AA (figura 17). Sólo se ensayaron dos condiciones en este experimento, que incluían la condición de contenido bajo en 8AA y de contenido bajo en 4AA, utilizando la línea celular A. Los ocho aminoácidos o los cuatro aminoácidos se controlaron entre 0,5 mM y 1 mM hasta el día 7 del cultivo. Los datos de aminoácidos no se muestran para este experimento, pero son similares a los perfiles de aminoácidos observados para las dos condiciones en el experimento anterior (figuras 11-14) excepto para la tirosina, que no se agotó en este experimento. Las células crecieron mejor en la condición de contenido bajo en 8AA, alcanzando un máximo de  $42 \times 10^6$  células/ml el día 9, mientras que las densidades celulares en la condición de contenido bajo en 4AA alcanzaron un máximo de  $33 \times 10^6$  células/ml (figura 17). Este aumento de la densidad celular también se tradujo en niveles más altos de valoración de la recolección en las condiciones de contenido bajo en 8AA en comparación con la condición de contenido bajo en 4AA.

Ejemplo 6: Demostración de (i) la reducción en la acumulación de los inhibidores recién identificados a través de la limitación de aminoácidos y (ii) el efecto positivo de dicha limitación de metabolitos inhibidores sobre el crecimiento de una línea celular GS-CHO diferente (línea celular B) en cultivos de alimentación discontinua.

## Objetivo:

Este experimento se realizó para demostrar que los efectos beneficiosos de limitar los niveles de determinados aminoácidos sobre el crecimiento de las células no eran específicos de una línea celular (línea celular A), sino que son más generales y pueden aplicarse a otras líneas celulares. Como parte de este ejemplo se realizaron dos experimentos de limitación de nutrientes utilizando una línea celular CHO diferente (línea celular B) que produce un anticuerpo recombinante diferente. El objetivo de estos experimentos era demostrar que, en los cultivos de alimentación discontinua, el control de los aminoácidos a niveles más bajos da lugar a una reducción de las acumulaciones de inhibidores, y que estas bajas acumulaciones de inhibidores pueden explicar el aumento de las densidades de células viables y de las valoraciones de proteínas que se observaron en los cultivos de alimentación discontinua con bajos niveles de aminoácidos.

## Materiales y procedimientos:

## Células y configuración del biorreactor

En este ejemplo se utilizó una nueva línea celular GS-CHO (línea celular B) que expresaba un anticuerpo recombinante diferente. Se realizaron dos experimentos para comprender el efecto de limitar simultáneamente cuatro u ocho aminoácidos. En el primer experimento, se ensayaron dos condiciones: A) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de ocho aminoácidos, que incluye tirosina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina,

serina, glicina y treonina (condición de contenido bajo en 8AA + HIPDOG) y B) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (condición HIPDOG). En el segundo experimento, se ensayaron dos condiciones: A) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con niveles bajos de cuatro aminoácidos, incluyendo tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano (condición de contenido bajo en 4AA + HIPDOG) y B) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (condición HIPDOG). El primer experimento se llevó a cabo durante 12 días, mientras que el segundo sólo se realizó hasta el octavo día de cultivo.

Se inocularon células en crecimiento exponencial de cultivos de siembra a  $1 \times 10^6$  células/ml en cada biorreactor de producción. Para todas las condiciones, la estrategia HIPDOG se aplicó entre el día 2 y el día 7 del cultivo. En las condiciones de contenido bajo en aminoácidos, las concentraciones de los cuatro u ocho aminoácidos mencionados se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los siete primeros días del cultivo, tras lo cual se ajustaron a los niveles más próximos a los respectivos aminoácidos en la condición HIPDOG de control. Después del séptimo día, ambas condiciones se trataron de forma similar. Las concentraciones de células viables, amoníaco y aminoácidos se midieron a diario durante todo el cultivo. Para todas las condiciones, la densidad de células viables del inóculo deseada ( $1 \times 10^6$  células/ml), y el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del proceso, incluidos la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la velocidad de agitación (259 rpm), fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición HIPDOG fue el medio A y el utilizado en las condiciones de contenido bajo en AA fue la versión modificada del medio A con bajas concentraciones de cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina a aproximadamente 0,6 mM) u ocho aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina, metionina, leucina, serina, treonina y glicina a aproximadamente 0,6 mM). El medio de alimentación utilizado para todas las condiciones fue el medio B. Las concentraciones de aminoácidos se midieron cada día utilizando el procedimiento de aminoácidos basado en UPLC descrito en el ejemplo 4. En las condiciones de bajo contenido en aminoácidos, en función del nivel de aminoácidos en un punto de muestreo determinado y del programa de alimentación que se va a seguir, se añadieron soluciones concentradas de aminoácidos a las condiciones, de forma que la concentración de los cuatro aminoácidos o de los ocho aminoácidos en las condiciones correspondientes se situara entre 0,5 mM-1 mM en el siguiente punto de muestreo. Se analizaron muestras de medio agotado de diferentes condiciones en los dos experimentos de este ejemplo para cuantificar los niveles de los inhibidores recién identificados utilizando la tecnología de RMN, tal como se describe en la sección de Materiales y procedimientos del ejemplo 1.

#### Resultados:

En el primer experimento, las concentraciones de los ocho aminoácidos se mantuvieron satisfactoriamente entre 0,5 mM-1 mM en la condición de contenido bajo en 8AA hasta el día 7 de los cultivos en lote alimentado. Los perfiles de cultivo de aminoácidos no se muestran para este experimento, pero son similares a los observados para las condiciones similares en el experimento 1 del ejemplo 5 (figuras 11-14) excepto para la tirosina, que no se agotó en este experimento. Tal limitación de los niveles de aminoácidos en la condición de contenido bajo en 8AA dio lugar a niveles más bajos de biosíntesis y a una menor acumulación de los metabolitos recién identificados. Se perfilaron cuatro de los nueve inhibidores enumerados en la tabla 3 (figura 19 y figura 20). En la condición de contenido bajo en 8AA, se observaron acumulaciones significativamente menores de isovalerato, 3-(4-hidroxifenil)lactato e indol-3-lactato en comparación con la condición HIPDOG de control. Se observó que los niveles de formiato eran más altos en la condición de contenido bajo en 8AA en el día 10 del cultivo, aunque, en caso de células individuales, la cantidad de formiato producido fue similar en la condición de contenido bajo en 8AA en comparación con la condición HIPDOG. Las células en condiciones de contenido bajo en 8AA crecieron mejor que la condición de control (HIPDOG), alcanzando un máximo de densidad celular de  $40 \times 10^6$  células/ml el día 9, mientras que las densidades celulares en condiciones de control HIPDOG alcanzaron un máximo de aproximadamente  $32 \times 10^6$  células/ml (figura 18A). Además, el mayor crecimiento observado en la condición de contenido bajo en 8AA se tradujo en mayores niveles de valoración en comparación con la condición HIPDOG de control (figura 18B). Este aumento del crecimiento celular y de la productividad observado en condiciones de bajo contenido en aminoácidos puede explicarse como resultado de la reducción de la biosíntesis y la acumulación de inhibidores (figuras 19 y 20).

El segundo experimento fue realizado para investigar el efecto de controlar los niveles de cuatro aminoácidos (tirosina, fenilalanina, triptófano y metionina) entre 0,5 mM-1 mM (bajo en 4AA + HIPDOG) en el crecimiento y productividad de la línea celular B, cuando se comparó con la condición control de HIPDOG (figuras 21-23). Los perfiles de cultivo de aminoácidos no se muestran para este experimento, pero son similares a los observados para las condiciones similares en el experimento 1 del ejemplo 5 (figuras 11-14) excepto para la tirosina, que no se agotó en este experimento. Tal limitación de los niveles de aminoácidos en la condición de contenido bajo en 8AA dio lugar a niveles más bajos de biosíntesis y a una menor acumulación de los metabolitos recién identificados. Se perfilaron cuatro de los nueve inhibidores enumerados en la tabla 3 (figura 22 y figura 23). Excepto el isovalerato, los niveles de los otros tres inhibidores fueron más bajos en la condición de contenido bajo en 4AA en comparación con la condición HIPDOG. Puesto que la leucina no es uno de los aminoácidos que se controla a niveles bajos en la condición de contenido bajo en 4AA, su intermedio metabólico isovalerato se acumula en la condición de contenido bajo en 4AA a niveles similares a los observados en la condición control de HIPDOG. Las células en condiciones de contenido bajo en 4AA crecieron mejor, alcanzando un máximo de densidad celular de  $37 \times 10^6$  células/ml en el día 9 del cultivo, mientras que las densidades celulares en condición control de HIPDOG alcanzaron un máximo de aproximadamente  $32 \times 10^6$  células/ml (figura 21A). Además, el mayor crecimiento observado en la condición de contenido bajo en 8AA se tradujo en mayores niveles de valoración en comparación con la condición HIPDOG de control (figura 21B). Este aumento del crecimiento

celular y de la productividad observado en condiciones de bajo contenido en aminoácidos puede explicarse como resultado de la reducción de la biosíntesis y la acumulación de inhibidores (figuras 22 y 23).

Ejemplo 7: Utilización de la espectroscopia RAMAN para la medición en línea de los cuatro aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) y los inhibidores recién identificados

La espectroscopia Raman se basa en la dispersión inelástica de luz monocromática (fotones) por una molécula. La tecnología utiliza el desplazamiento de la frecuencia de la luz, debido al cambio de energía del fotón cuando es absorbido y reemitido por la molécula, para determinar las características de la molécula. Esta tecnología se ha utilizado con éxito en biorreactores de cultivos celulares microbianos y de mamífero para medir los niveles de diversos parámetros del proceso. La espectroscopia Raman también se ha utilizado para determinar las concentraciones de glucosa, lactato, amoníaco, glutamina y glutamato en cultivos de células CHO.

Los espectros Raman para todos los aminoácidos han sido previamente notificados en la literatura. Los espectros Raman de los metabolitos inhibidores recién identificados se caracterizan utilizando una solución de los metabolitos purificados. Se construye un modelo empírico empleando un conjunto de entrenamiento de datos espectrales generados utilizando concentraciones conocidas de cada uno de los cuatro u ocho aminoácidos o de los inhibidores recién identificados, individualmente. La matriz de muestras (fondo) utilizada para la preparación de las muestras de calibración (utilizadas como conjunto de entrenamiento) es una mezcla de muestras de medios agotados tomadas de diferentes momentos de diferentes procesos de cultivo celular. El modelo desarrollado utilizando dicho conjunto de entrenamiento es más general y puede aplicarse a cualquier otro proceso de cultivo celular. Este modelo se utiliza para medir la concentración de los cuatro u ocho aminoácidos o de los metabolitos (inhibidores) en el cultivo (en línea) y, en consecuencia, controlar los niveles de aminoácidos mediante estrategias de alimentación con control de realimentación.

Ejemplo 8: Supresión de la formación de inhibidores mediante el control de aminoácidos a niveles bajos en cultivos de alimentación discontinua utilizando la medición en línea de la concentración de inhibidores

Un proceso de alimentación discontinua está diseñado para reducir la formación de los inhibidores mediante el control de cuatro aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) a niveles bajos, por ejemplo, entre 0,2-1 mM en el medio de cultivo celular. Este control de la producción de inhibidores se consigue mediante una estrategia de alimentación que funciona como un bucle de retroalimentación basado en la medición en línea de los propios inhibidores. Dichas mediciones en línea se realizan en forma de espectroscopia RAMAN o mediante el uso de una tecnología basada en HPLC/UPLC con un automuestreador que extrae la muestra del reactor y la transfiere al equipo de forma programada. A medida que la concentración de los inhibidores supera un nivel determinado (por ejemplo: 0,2 mM), la cantidad de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina suministrada a las células se reduce hasta que la concentración de inhibidores cae por debajo de un nivel predefinido (por ejemplo, 0,1 mM).

Ejemplo 9: Supresión de la formación de inhibidores mediante la medición y el control en línea o fuera de línea de aminoácidos a niveles bajos en cultivos de alimentación discontinua

Se diseña un proceso de alimentación discontinua para reducir la formación de los inhibidores mediante el control de los cuatro aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) a niveles bajos (0,2-1 mM). Este control de la formación de inhibidores se consigue mediante una estrategia de alimentación que funciona como un bucle de retroalimentación basado en la medición en línea de los aminoácidos. Dichas mediciones en línea se realizan en forma de espectroscopia RAMAN o mediante el uso de una tecnología basada en HPLC/UPLC con un automuestreador que extrae la muestra del reactor y la transfiere al equipo de forma programada. A medida que la concentración de aminoácidos desciende por debajo de un nivel determinado (por ejemplo: 0,5 mM), se añaden al cultivo cantidades calculadas de medio de alimentación (similar al medio B) para mantener las concentraciones de los cuatro u ocho aminoácidos.

Como alternativa, las muestras se toman una vez al día y las concentraciones de aminoácidos se miden fuera de línea utilizando un procedimiento de UPLC/HPLC. Las concentraciones de aminoácidos obtenidas se utilizan para calcular las tasas de captación específica de las células de los cuatro aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) entre los dos puntos temporales de muestreo anteriores. Suponiendo que las células mantienen la misma tasa específica de consumo de aminoácidos hasta el siguiente punto temporal de muestreo, se determina la cantidad de medio de alimentación (ejemplo: el medio B) que se añadirá hasta el siguiente punto de muestreo y se suministra a las células, de forma que las concentraciones de los aminoácidos estén siempre dentro del intervalo deseado (0,2 mM-1 mM).

Ejemplo 10: Supresión de la formación de inhibidores mediante la alimentación programada para mantener los aminoácidos en niveles bajos en los cultivos de alimentación discontinua

La formación de los inhibidores recién identificados en cultivo se mantiene baja manteniendo la concentración de los cuatro aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano,

metionina, leucina, serina, glicina y treonina) en niveles bajos en el cultivo (0,2-1 mM). Esto se consigue diseñando una estrategia de alimentación programada (utilizando el medio B modificado) de forma que las concentraciones de aminoácidos, en cualquier momento dado del cultivo, estén siempre dentro del intervalo deseado (0,2 mM-1 mM). Dicha estrategia de alimentación se elabora evaluando las tasas específicas de consumo de aminoácidos en diferentes puntos temporales a lo largo del cultivo y modificando la concentración en el medio de alimentación (medio B) de forma que, con la estrategia/programa de alimentación definido anteriormente, se suministren al cultivo cantidades suficientes de aminoácidos para mantener las concentraciones de aminoácidos dentro del intervalo deseado (0,2-1 mM).

Ejemplo 11: Experimento para determinar las dianas génicas de la modificación metabólica para suprimir la biosíntesis de los inhibidores relacionados con la vía de la fenilalanina/tirosina

Objetivo:

El experimento fue realizado para determinar la causa de la producción de moléculas inhibitoras, incluidas fenil-lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y 3-(4-hidroxifenil)lactato. La expresión génica de todas las enzimas de la vía de la fenilalanina/tirosina se sondeó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real ("Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction", RT-qPCR). Basándose en la expresión génica y la bioquímica de la vía catabólica de la fenilalanina/tirosina, se identificaron dianas génicas para la modificación metabólica de la línea celular A de CHO que suprimen la biosíntesis de los inhibidores mencionados.

Materiales y procedimientos:

Análisis de la expresión génica

Se utilizó el ensayo de RT-qPCR para evaluar los niveles relativos de expresión génica de las enzimas en las vías metabólicas de la leucina y la fenilalanina/tirosina. La RT qPCR mide la abundancia de transcritos y, por tanto, la expresión génica mediante la amplificación de una secuencia diana de ADNc utilizando la PCR en combinación con un reactivo de detección (concretamente, SYBR Green). El SYBR Green es una molécula que emite fluorescencia cuando se une al ADN bicatenario y la fluorescencia puede medirse en tiempo real durante el ensayo de RT-qPCR. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de la PCR bicatenario (también llamado amplicón) en la reacción. Los niveles relativos de expresión génica se determinan midiendo el número de ciclos de PCR necesarios para que la fluorescencia de SYBR Green supere la fluorescencia de fondo y aumente logarítmicamente. Este número de ciclo se denomina habitualmente  $C_T$  ("Threshold Cycle", ciclo umbral). Un transcrito de gran abundancia tendría un valor de  $C_T$  más bajo, ya que necesitaría menos ciclos de PCR para que la fluorescencia superase la fluorescencia de fondo, mientras que, por el contrario, un transcrito de menor abundancia tendría un valor de  $C_T$  más alto, ya que necesitaría más ciclos de PCR para que la fluorescencia superase el nivel de fondo.

El ensayo de RT-qPCR se realizó utilizando un sistema PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems) y el reactivo PowerUP SYBR Green Master Mix (Life Technologies). Los cebadores de la PCR se diseñaron utilizando el algoritmo Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) a partir de las secuencias de ADN genómico contenidas en el navegador del genoma del ovino de hámster chino (CHO) (chogenome.org). El ARN se preparó a partir de la línea celular A de CHO utilizando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen), que, a su vez, se utilizó como molde para la síntesis de ADNc cebada con oligo dT utilizando el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Life Technologies). Los valores de  $C_T$  de los genes metabólicos seleccionados se tabularon y compararon con el valor de  $C_T$  de un gen de mantenimiento bien caracterizado, la beta-actina. La diferencia entre el  $C_T$  del gen diana y el  $C_T$  de la beta-actina se notificó como  $\Delta C_T$ . Un valor de  $\Delta C_T$  elevado indica un nivel de expresión génica bajo.

Resultados:

Los valores de  $C_T$  y  $\Delta C_T$  para los genes en la vía de la fenilalanina/tirosina se muestran en la figura 24. Los datos de expresión génica de la vía de la fenilalanina/tirosina indican que la línea celular A de CHO tiene una baja expresión de los genes PAH, HPD y HGD. Dado que los niveles expresados de proteínas (o enzimas) se correlacionan con los niveles de transcripción, unos niveles bajos de la enzima PAH pueden dar lugar a que la fenilalanina se convierta en fenilpiruvato y, posteriormente, en fenil-lactato por la acción catalítica de las enzimas GOT1/GOT2 y MIF, ambas expresadas a niveles elevados en la línea celular A de CHO. Del mismo modo, debido a los bajos niveles de las enzimas HPD y HGD en la línea celular CHO, la tirosina se canaliza hacia la producción de 4-hidroxifenilpiruvato y 3-(4-hidroxifenil)lactato por la acción catalítica de las enzimas GOT1/GOT2 y MIF. La reducción de la canalización del flujo de fenilalanina y tirosina hacia la producción de inhibidores requiere la regulación a la baja de la expresión de los genes GOT1/GOT2 y MIF. Sin embargo, GOT1/GOT2 y MIF son cruciales para otras funciones metabólicas fisiológicamente importantes. Por lo tanto, la regulación a la baja de las dos enzimas no produciría potencialmente una línea celular viable. Una forma alternativa de reducir la biosíntesis de inhibidores es mediante la sobreexpresión de los genes PAH, HPD y HGD, que canalizarían el flujo alejándolo de la producción de inhibidores hacia la producción de metabolitos del ciclo de Krebs (que se utilizan para la síntesis de energía en las mitocondrias). De ahí que las dianas metabólicas de la vía de la fenilalanina/tirosina sean los genes PAH, HPD y HGD.

Ejemplo 12: Experimento para determinar las dianas génicas de la modificación metabólica para suprimir la biosíntesis de los inhibidores relacionados con la vía de la leucina

Objetivo:

El experimento se realizó para determinar la causa de la biosíntesis y acumulación de ácido isovalérico, que es un subproducto del metabolismo de la leucina y que se acumula a niveles muy altos en cultivos de alimentación discontinua de células CHO. La expresión génica de todas las enzimas de la vía de la leucina se sondeó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Además, se ha notificado que la producción de ácido isovalérico en enfermedades humanas, tales como la academia isovalérica, se debe a mutaciones por "pérdida de función" en enzimas posteriores a la isovaril-CoA, un intermedio en la vía del catabolismo de la leucina. Estas enzimas incluyen Ivd, Mccc1 y Mccc2, que pueden portar mutaciones de pérdida de actividad aunque se expresen a altos niveles. Por lo tanto, se investigó el estado de mutación de estas enzimas en la línea celular A de CHO. Basándose en el análisis de la expresión génica y el análisis de mutaciones de las enzimas mencionadas en la vía del catabolismo de la leucina, se identificaron dianas génicas para la modificación metabólica de la línea celular A de CHO que suprimirán la biosíntesis del ácido isovalérico.

Materiales y procedimientos:

Análisis de mutaciones

Se identificó la secuencia de ADN genómico que flanquea las regiones traducidas de Ivd, Mccc1 y Mccc2 (en los extremos 5' y 3') y se utilizó como plantilla para el diseño de cebadores de PCR utilizando el algoritmo Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). El ARN se preparó a partir de la línea celular A de CHO utilizando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen), que, a su vez, se utilizó como molde para la síntesis de ADNc cebado con oligo dT utilizando el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Life Technologies). Se realizó una reacción de PCR optimizada en cuanto a temperatura de extensión y concentración de magnesio utilizando Pfu Turbo HotStart 2X Master Mix (Agilent). Las muestras se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se enviaron para el análisis de secuencias a Wyzerbio (Cambridge, MA).

Resultados:

Los valores de  $C_T$  y  $\Delta C_T$  para los genes de la vía de la leucina se muestran en la figura 25. Los datos de expresión génica de la vía de la fenilalanina/tirosina indican que la línea celular A de CHO tiene niveles más bajos de la enzima AUH en relación con las otras enzimas de la vía. Sin embargo, estos datos no explican de forma rotunda los altos niveles de producción de ácido isovalérico registrados en los experimentos anteriores, ya que la enzima se encuentra después del nodo que se ramifica hacia la producción de ácido isovalérico (figura 25). Por lo tanto, la pérdida de función (actividad enzimática) de IVD, MCCC1 y/o MCCC2 podría justificar mejor la producción de ácido isovalérico. Los resultados de la secuenciación del ADN revelan el estado de mutación y el nivel probable de función de la enzima codificada. En caso de que se encuentre una mutación que altere la actividad enzimática en los genes IVD, MCCC1 y MCCC2, se emprenderá un enfoque de modificación metabólica que implique la sobreexpresión del correspondiente gen de tipo salvaje (no mutado); en este caso, el gen original procedería de una línea celular CHO, aunque se pueden obtener y utilizar otras fuentes originales para genes de tipo salvaje, tales como seres humanos, de rata o de ratón. Además, el gen AUH también se sobreexpresará en la misma línea celular A de CHO.

Una correlación de los acrónimos de los genes con la nomenclatura completa para los genes analizados en el presente documento se proporciona a continuación en la tabla 5.

Tabla 5: Genes de las vías de la fenilalanina/tirosina y la leucina, como también se ilustra en las figuras 24 y 25

Símbolo	Nombre
Pah	fenilalanina hidroxilasa
Mif	factor inhibidor de la migración de macrófagos
Got1	glutámico-oxaloacético transaminasa 1, soluble
Got2	glutámico-oxaloacético transaminasa 2, mitocondrial
Hpd	ácido 4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa
Hgd	homogentisato 1,2-dioxigenasa

Símbolo	Nombre
Gstz1	glutación transferasa zeta 1 (maleilacetoacetato isomerasa)
Fah	fumarilacetoacetato hidrolasa
Bcat1	aminotransferasa de cadena ramificada 1, citosólica
Bckdha	cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada E1, polipéptido alfa
Bckdhb	cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada E1, polipéptido beta
Dbt	dihidrolipoamida transacilasa de cadena ramificada E2
Old	dihidrolipoamida deshidrogenasa
Ivd	isovaleril coenzima A deshidrogenasa
Acadm	acil-coenzima A deshidrogenasa, cadena de longitud intermedia
Mccc1	metilcrotonoil-coenzima A carboxilasa 1 (alfa)
Mccc2	metilcrotonoil-coenzima A carboxilasa 2 (beta)
Auh	proteína de unión al ARN AU/enoil-coenzima A hidratasa
Hmgcl	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A liasa
Fasn	ácido graso sintasa
Nup62-il4i1	1/L-aminoácido oxidasa inducida por nucleoporina 62-interleucina 4

Ejemplo 13: Experimento para expresar ectópicamente en la línea celular A de CHO los genes de ratón de HPD, HGD, PAH, AUH y la forma de tipo salvaje de cualquier otra diana génica determinada en el ejemplo 12 mediante análisis de mutaciones

##### 5 Objetivo:

Basándose en los bajos niveles de expresión génica con respecto a la beta-actina determinados por el ensayo RT qPCR, se seleccionaron cuatro dianas para su sobreexpresión en células CHO: Auh (vía metabólica de la leucina) y HPD, HGD y PAH (vía metabólica de la fenilalanina/tirosina). Además, basándose en el estado de mutación de pérdida de actividad de IVD, MCCC1 y MCCC2, se seleccionará el gen de tipo salvaje de las enzimas mutadas para su sobreexpresión en células CHO. Por lo general, cuando se detectan genes mutados o inactivos, la estrategia consiste en sobreexpresar los genes salvajes. El objetivo es clonar secuencias de ARNm de ratón de estos genes en un vector de expresión de mamíferos disponible en el mercado y transfectar la línea celular A de CHO con estos vectores de expresión. Las líneas celulares resultantes tienen un alto nivel de expresión de los genes AUH, HPD, HGD o PAH de ratón y, por extensión, un mayor nivel de actividad enzimática AUH, HPD, HGD o PAH. El aumento de la actividad de estas enzimas cruciales probablemente mejorará el flujo metabólico y reducirá la concentración celular de determinadas sustancias inhibitoras conocidas.

##### Materiales y procedimientos:

Se construyeron casetes de sobreexpresión utilizando secuencias de ADNc de ratón de la colección MGC (<http://genecollections.nci.nih.gov/MGC/>) de los genes AUH, HPD, HGD y/o PAH. Las secuencias se suministraron como soluciones madre en glicerol de *E. coli* que contenían vectores lanzadera con ADNc de los genes diana (GE Dharmacon). Los cebadores de PCR se diseñaron utilizando el algoritmo Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) para amplificar las regiones codificantes de los ADNc en reacciones con una polimerasa de corrección de errores denominada Pfu Turbo HotStart 2X Master Mix (Agilent). Los productos de la PCR se clonaron direccionalmente en el vector de expresión pcDNA Gateway Direction TOPO (Invitrogen). El vector contiene una

secuencia promotora viral (promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano), un sitio de clonación TOPO direccional, un marcador de epítipo (V5) para la detección mediante anticuerpos anti-V5, una secuencia de poliadenilación (timidina cinasa del virus del herpes simple) y un gen de resistencia a antibióticos (blastidina). La secuencia de los vectores es confirmada por WyzerBio y se transfectan en la línea celular A de CHO para la sobreexpresión utilizando el electroporador GenePulser XCell (BioRad) y se recuperan en presencia de blastidina para ejercer presión selectiva. Se evalúa la expresión del transgén en las células CHO modificadas mediante RT-qPCR, hibridación Western y ensayo enzimático. Tras la selección con un medio que contiene blastidina, las células se criopreservan para su posterior experimentación en biorreactores.

Por lo tanto, las líneas celulares transfectadas se diseñan para expresar los genes AUH, HPD, HGD y/o PAH de ratón a niveles elevados y, por extensión, tienen una mayor actividad enzimática AUH, HPD, HGD o PAH. Se realizan análisis mediante RT qPCR, hibridación Western y ensayo enzimático para revelar el aumento de la expresión génica total de AUH, HPD, HGD o PAH y de la actividad enzimática (tanto endógena como transgénica) en las líneas celulares transgénicas recién creadas.

Ejemplo 14: Experimento para sondear la supresión de la formación de inhibidores en líneas celulares modificadas genéticamente que expresan los genes diana determinados en los ejemplos 11 y 12

Objetivo:

Como parte de este experimento, se investigó el fenotipo de los clones (y agrupamientos) que sobreexpresaban los genes diana. La determinación del fenotipo implica principalmente las densidades celulares máximas y la productividad de estos clones en el cultivo de alimentación discontinua HIPDOG y/o el nivel de acumulación de moléculas inhibitoras en el cultivo.

Materiales y procedimientos:

Células y configuración del biorreactor

Las células CHO utilizadas en el experimento son la forma modificada de la línea celular A de CHO obtenida de la sobreexpresión de los genes diana PAH, HPD, HGD, AUH y la forma de tipo salvaje de cualquier otro gen diana determinado en los ejemplos 11 y 12 mediante análisis de mutaciones. Como parte de este experimento, se ensayan dos condiciones: A) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con células CHO que expresan todos los genes diana y B) Cultivo de alimentación discontinua HIPDOG con células CHO que expresan la proteína GFP. Los detalles sobre el uso de la tecnología HIPDOG se describen en la sección de Materiales y procedimientos del ejemplo 1. Las células en crecimiento exponencial procedentes del cultivo de siembra se inoculan a  $1 \times 10^6$  células/ml en biorreactores de producción que emplean el proceso HIPDOG. En ambas condiciones, el control de HIPDOG se aplica entre el día 2 y el día 7 del cultivo. La densidad de células viables, las concentraciones de lactato, de amoníaco y de aminoácidos se miden a diario hasta el día 12 (los aminoácidos se miden sólo durante los siete primeros días). Para ambas condiciones, la densidad de células viables del inóculo deseada ( $1 \times 10^6$  células/ml), y el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del proceso, incluidos la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la velocidad de agitación (267 rpm), fueron idénticos. Para ambas condiciones, el medio de base utilizado será el medio A y el medio de alimentación será el medio B. Las muestras de sobrenadantes de diferentes condiciones en ambos experimentos se analizan para determinar los niveles de los inhibidores recién identificados utilizando la tecnología de RMN descrita en la sección Materiales y procedimientos del ejemplo 1. Las concentraciones de aminoácidos se miden para las muestras utilizando el procedimiento de aminoácidos basado en UPLC que se describe detalladamente a continuación.

Análisis de aminoácidos

Se mezclan 10 µl de una solución de mezcla de aminoácidos estándar o una muestra de medio agotado (muestra diluida 10 veces) con 70 µl de tampón borato AccQ•Tag Ultra (kit de aplicaciones Waters UPLC AAA H-Class [176002983]) y se añaden 20 µl de reactivo AccQ•Tag previamente disuelto en 1,0 ml de diluyente de reactivo AccQ•Tag Ultra. Se deja que la reacción se desarrolle durante 10 min a 55 °C. El análisis cromatográfico líquido se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC, equipado con un gestor de disolventes binarios, un automuestreador, un calentador de columna y un detector PDA. La columna de separación es una columna Waters AccQ•Tag Ultra (2,1 mm d.i.  $\times$  100 mm, partículas de 1,7 µm). El calentador de la columna se ajusta a 55 °C, y el caudal de la fase móvil se mantiene a 0,7 ml/min. El eluyente A es el disolvente A concentrado de AccQ•Tag Ultra al 10 %, y el eluyente B es el disolvente B de AccQ•Tag Ultra al 100 %. El gradiente de separación no lineal es de 0-0,54 min (A al 99,9 %), 5,74 min (A al 90,0 %), 7,74 min (A al 78,8 %), 8,04-8,64 min (A al 40,4 %), 8,73-10 min (A al 99,9 %). Se inyecta un microlitro de muestra para el análisis. El detector PDA se ajusta a 260 nm. Los tiempos de elución previamente determinados para los aminoácidos se utilizan para identificar los picos de aminoácidos específicos en el cromatograma para cada muestra. Las concentraciones de aminoácidos se calculan utilizando el área bajo el pico y se genera la curva de calibración utilizando la solución patrón (Amino Acids Standard H, Thermo Scientific, PI-20088).

Resultados:

Las células que expresan el gen diana canalizan menos carbono (fenilalanina, tirosina y leucina) hacia la biosíntesis del inhibidor, lo que da como resultado menores acumulaciones de los compuestos en el medio de cultivo. Sin



embargo, las células que expresan la molécula GFP (control negativo) canalizan más carbono hacia la producción de inhibidores, lo que conduce a mayores acumulaciones de los mismos en los medios de cultivo. Tales diferencias en los niveles de producción y acumulación de inhibidores dan lugar a diferencias de crecimiento que conducen a mayores densidades celulares máximas en las células que expresan el conjunto de genes diana en comparación con las células que expresan GFP. Este aumento del número total de células también conduce a un mayor rendimiento de la proteína recombinante producida por las células.

Ejemplo 15: Experimento para determinar las dianas génicas de la modificación metabólica para suprimir la biosíntesis de los inhibidores relacionados con la vía de la fenilalanina/tirosina

Objetivo:

Este experimento fue realizado para determinar la causa de la producción de moléculas inhibitoras, que incluyen fenil-lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y 3-(4-hidroxifenil)lactato. La expresión génica de todas las enzimas de la vía de la fenilalanina/tirosina se sondeó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real ("Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction", RT-qPCR). Basándose en la expresión génica y en la bioquímica de la vía catabólica de la fenilalanina/tirosina, se identificaron dianas génicas para la modificación metabólica de las células CHO (línea celular A de CHO, línea celular CHO B y línea celular original) que suprimen la biosíntesis de los inhibidores mencionados.

Materiales y procedimientos:

Análisis de la expresión génica

Se utilizó el ensayo de RT-qPCR para evaluar los niveles relativos de expresión génica de las enzimas en las vías metabólicas de la fenilalanina/tirosina. La RT-qPCR mide la abundancia de transcritos y, por tanto, la expresión génica mediante la amplificación de una secuencia diana de ADNc utilizando la PCR en combinación con un reactivo de detección (concretamente, SYBR Green). El SYBR Green es una molécula que emite fluorescencia cuando se une al ADN bicatenario y la fluorescencia puede medirse en tiempo real durante el ensayo de RT-qPCR. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR bicatenario (también llamado amplicón) en la reacción. Los niveles relativos de expresión génica se determinan midiendo el número de ciclos de PCR necesarios para que la fluorescencia de SYBR Green supere la fluorescencia de fondo y aumente logarítmicamente. Este número de ciclo se denomina habitualmente  $C_T$  ("Threshold Cycle", ciclo umbral). Un transcrito de gran abundancia tendría un valor de  $C_T$  más bajo, ya que necesitaría menos ciclos de PCR para que la fluorescencia superase la fluorescencia de fondo, mientras que, por el contrario, un transcrito de menor abundancia tendría un valor de  $C_T$  más alto, ya que necesitaría más ciclos de PCR para que la fluorescencia superase el nivel de fondo.

El ensayo de RT-qPCR se realizó utilizando un sistema PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems) y el reactivo PowerUP SYBR Green Master Mix (Life Technologies). Los cebadores de la PCR se diseñaron utilizando el algoritmo Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) a partir de las secuencias de ADN genómico contenidas en el navegador del genoma del ovario de hámster chino (CHO) (chogenome.org). El ARN se preparó a partir de la línea celular A de CHO utilizando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen), que, a su vez, se utilizó como molde para la síntesis de ADNc cebada con oligo dT utilizando el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Life Technologies). Los valores de  $C_T$  de los genes metabólicos seleccionados se tabularon y compararon con el valor de  $C_T$  de un gen de mantenimiento bien caracterizado, la beta-actina (B-actina). La diferencia entre el  $C_T$  del gen diana y el  $C_T$  de la B-actina se notificó como  $\Delta C_T$ . Un valor de  $\Delta C_T$  elevado indica un nivel de expresión génica bajo.

Resultados:

Los valores de  $C_T$  y  $\Delta C_T$  para los genes en la vía de la fenilalanina/tirosina para la línea celular A de CHO y la línea celular original se muestran en la figura 26. La línea celular B de CHO tiene un nivel similar de expresión génica que la línea celular A de CHO (datos no mostrados). Los datos de expresión génica de la vía de la fenilalanina/tirosina indican que la línea celular A de CHO y la línea celular original tienen una baja expresión de los genes PAH, HPD y HGD. Los niveles de proteína (o enzima) se correlacionan con los niveles de transcritos, y unos bajos niveles de la enzima PAH pueden dar lugar a que la fenilalanina se convierta en fenilpiruvato y posteriormente en fenil-lactato por la acción catalítica de las enzimas GOT1/GOT2 y MIF (o reacciones enzimáticas no específicas), ambas expresadas en altos niveles en la línea celular A de CHO y en la línea celular original. Del mismo modo, debido a los bajos niveles de las enzimas HPD y HGD en la línea celular A de CHO y en la línea celular original, la tirosina se canaliza hacia la producción de 4-hidroxifenilpiruvato y 3-hidroxifenil-lactato por la acción catalítica de las enzimas GOT1/GOT2 y MIF (o reacciones enzimáticas no específicas). Una forma de reducir la canalización del flujo de fenilalanina y tirosina hacia la producción de inhibidores sería regular a la baja la expresión de los genes GOT1/GOT2 y MIF. Sin embargo, GOT1/GOT2 y MIF son cruciales para otras funciones metabólicas fisiológicamente importantes. Por lo tanto, la regulación a la baja o la eliminación de estas dos enzimas no produciría potencialmente una línea celular viable. Una forma alternativa de reducir la biosíntesis de inhibidores es mediante la sobreexpresión de los genes PAH, HPD y HGD, que canalizarían el flujo alejándolo de la producción de inhibidores hacia la producción de metabolitos del ciclo

de Krebs (que se utilizan para la síntesis de energía en las mitocondrias). Por lo tanto, las dianas metabólicas elegidas para la vía de la fenilalanina/tirosina son los genes PAH, HPD y HGD.

Además de las tres dianas en la vía fenilalanina/tirosina identificadas por RT-qPCR (PAH, HGD y HPD), se examinó una cuarta diana. La enzima PAH requiere un cofactor denominado tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) para su actividad catalítica. Las células de mamífero sintetizan BH<sub>4</sub> utilizando GTP como sustrato (figura 27A). Las enzimas implicadas en la biosíntesis de BH<sub>4</sub> incluyen GCH1, PTS y SPR. Además, la BH<sub>4</sub> se convierte en BH<sub>4</sub>-4a-carbinolamina durante la reacción catalizada por la actividad PAH, que se recicla de nuevo a BH<sub>4</sub> por la actividad de las enzimas PCBD1 y QDPR. Se ensayó de modo similar la expresión de los genes que codifican para la biosíntesis y las enzimas de reciclaje mediante RT-qPCR en células CHO (las células utilizadas para el análisis de la expresión génica fueron las que pasaron por la primera ronda de transfección con el gen PAH de ratón; véase el ejemplo 16) (figura 27B). Basándose en el alto valor de C<sub>T</sub>, el alto valor de  $\Delta C_T$  y, por lo tanto, el bajo nivel de expresión del gen, el gen PCBD1 también fue seleccionado para la sobreexpresión. Todos los demás genes de la vía de BH<sub>4</sub> se expresaron a niveles razonables (véase la figura 27B).

Ejemplo 16: Experimento de sobreexpresión de PAH, HPD, HGD y PCBD1 en líneas celulares CHO

Objetivo:

Basándose en los bajos niveles de expresión génica con relación a la B-actina, determinados por el ensayo de RT-qPCR, se seleccionaron cuatro dianas para su sobreexpresión en células CHO: HPD, HGD, PAH y PCBD1. El objetivo principal de este experimento era clonar secuencias de ARNm de estos genes en vectores de expresión de mamíferos disponibles en el mercado y transfectar la línea celular original de CHO, la línea celular A de CHO y la línea celular B de CHO con los vectores de expresión. Se esperaba que las células resultantes tuvieran un alto nivel de expresión de los genes HPD, HGD, PAH y PCBD1 y, por extensión, un mayor nivel de actividad enzimática HPD, HGD, PAH y PCBD1. El aumento de la actividad de estas enzimas clave ha mejorado el flujo metabólico y ha reducido la concentración celular de las sustancias inhibitorias identificadas.

Materiales y procedimientos:

Se construyeron vectores de expresión para los genes HPD, HGD, PAH y PCBD1 utilizando secuencias de ADNc de ratón de la colección MGC (<http://qenecollections.nci.nih.gov/MGC/>) (figura 28). GE Dharmacon proporcionó las secuencias en forma de soluciones madre en glicerol de *E. coli* que contenían vectores lanzadera con ADNc de los genes diana. Los cebadores de PCR se diseñaron utilizando el algoritmo Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) para amplificar las regiones codificantes de los ADNc en reacciones con una polimerasa de corrección de errores denominada Pfu Turbo HotStart 2X Master Mix (Agilent). Los productos de la PCR se clonaron en vectores de expresión constitutiva disponibles en el mercado con diferentes genes de resistencia a antibióticos para permitir la selección individual de los plásmidos de expresión que se muestran en la tabla 6. Además, el proveedor también proporcionó vectores de control para que sirvieran de control negativo (control de transfección). WyzerBiosciences (Cambridge, MA) confirmó la secuencia de los vectores. Los plásmidos de expresión y de control se transfectaron en células CHO originales, en la línea celular A de CHO y en la línea celular B de CHO utilizando el electroporador GenePulser XCell (BioRad) y se recuperaron en presencia de antibióticos para ejercer presión selectiva. Se adoptó un enfoque por etapas, según el cual las células se transfectaron primero con el vector de expresión PAH y se recuperaron. A continuación, los agrupamientos de células que expresaban PAH se transfectaron con HPD y HGD juntos, y el agrupamiento de células resultante se transfectó con PCBD1 hasta obtener el producto final, una línea celular transfectada 4 veces. Tras la selección con medio que contenía antibióticos, los agrupamientos celulares se crioconservaron para su posterior experimentación en biorreactores. La figura 28 muestra los genes de ratón expresados, los vectores de expresión creados en los laboratorios de Pfizer y el gen de selección de antibióticos. La tabla 6 muestra un resumen de los plásmidos utilizados para cada gen expresado, incluidos el vector de expresión comercial utilizado, el antibiótico utilizado como presión de selección y el vendedor del vector de expresión. También se enumeran los vectores nulos utilizados para generar líneas celulares de control de transfección negativa.

Tabla 6

Gen	Vector para la transfección	Selección con antibiótico	Vendedor del vector de expresión
<b>PAH</b>	pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO	G418 (Geneticina)	Invitrogen (Thermo Fisher)
<b>HPD</b>	pMONO-hygro-mcs	Higromicina	Invivogen
<b>HGD</b>	pcDNA6.2/V5/GW/D-TOPO	Blasticidina	Invitrogen (Thermo Fisher)
<b>PCBD1</b>	pSELECT-puro-mcs	Puromicina	Invivogen
<b>Control para PAH</b>	pcDNA3.2/V5/GW-CAT	G418 (Geneticina)	Invitrogen (Thermo Fisher)
<b>Control para HPD</b>	pMONO-hygro-mcs		Invivogen
<b>Control para HGD</b>	pcDNA6.2/V5/GW-CAT	Blasticidina	Invitrogen (Thermo Fisher)
<b>Control para PCBD1</b>	pSELECT-puro-mcs		Invivogen

#### Resultados:

Se generaron agrupamientos de células después de la transfección con vectores de expresión de PAH, HPD, HGD y PCBD1 (llamados agrupamientos de células 4x-tfxn) junto con los vectores de control negativo acompañantes (vector vacío o vector que contiene cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)) (denominados agrupamientos de células 4x-control-tfxn). Los agrupamientos de células 4x-tfxn obtenidos de la transfección se diseñaron para expresar los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón a altos niveles y tener una mayor actividad enzimática PAH, HPD, HGD y PCBD1. Se utilizaron análisis de RT-qPCR (véase el ejemplo 17) e hibridación Western (datos no mostrados) para determinar los cambios en la expresión de los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1 (tanto endógenos como transgénicos) en los agrupamientos de células transgénicas recién creados.

Ejemplo 17: Experimento para sondear la expresión de transgenes de ratón (PAH, HPD, HGD y PCBD1) en los agrupamientos de células generados a partir de las transfecciones cuádruples

#### Objetivo:

Se realizó un ensayo de RT-qPCR para evaluar los niveles relativos de expresión génica de los transgenes de ratón PAH, HPD, HGD y PCBD1 en agrupamientos de células 4x-tfxn derivados de la línea celular original o de la línea celular B de CHO.

#### Materiales y procedimientos:

El ensayo de RT-qPCR se realizó utilizando un sistema PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems) y el reactivo PowerUP SYBR Green Master Mix (Life Technologies). Los cebadores de PCR se diseñaron utilizando el algoritmo Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) a partir de las secuencias de ADNc de ratón de la colección MGC (<http://genecollections.nci.nih.gov/MGC/>) proporcionadas por GE Dharmacon. El ARN se preparó a partir de los agrupamientos de células 4x-tfxn y 4x-control-tfxn de la línea celular B de CHO o de la línea celular original utilizando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen), que, a su vez, se utilizó como molde para la síntesis de ADNc cebado con oligo dT utilizando el sistema SuperScript III First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Life Technologies). Se tabularon los valores de  $C_T$  de los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón y se compararon con el valor de  $C_T$  de un gen de mantenimiento bien caracterizado, la B-actina. El delta entre el  $C_T$  del gen diana y el  $C_T$  de la B-actina se denominó  $\Delta C_T$ . La expresión satisfactoria de los genes transgénicos de ratón PAH, HPD, HGD y PCBD1 en los agrupamientos de células 4x-tfxn se identificó por la reducción del valor de  $\Delta C_T$  (y, por tanto, el aumento del nivel de expresión génica) en comparación con el valor de  $\Delta C_T$  de los transgenes en los agrupamientos de células de control negativo (4x-control-tfxn), que carecen de expresión de PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón.

#### Resultados:

Los valores de  $C_T$  para los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón en los agrupamientos de células 4x-tfxn y los correspondientes agrupamientos de control negativo (4x-control-tfxn) se muestran en la tabla 7. Se observaron unos valores de  $\Delta C_T$  más bajos para los transgenes de ratón en los agrupamientos de células 4x-tfxn de la línea celular B de CHO y la línea celular original en comparación con los correspondientes agrupamientos de células de control negativo (4x-control-tfxn). Esto indica que la expresión génica de las dianas fue mayor en los agrupamientos 4x-tfxn y, por tanto, estimula la canalización del flujo de aminoácidos alejándola de la vía de biosíntesis de los inhibidores fenil-lactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato y 4-hidroxifenil-lactato (véase el ejemplo 19). La aparente presencia de expresión de PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón en los agrupamientos de células 4x-control-tfxn se debe en parte a los altos niveles de homología de secuencia entre los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1 transgénicos (ratón) y endógenos (hámster). Esto sugiere que los datos reflejan con exactitud el nivel total de expresión de los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1, incluidos tanto los genes transgénicos como los endógenos.

La tabla 7 muestra los niveles de expresión, ensayados por RT-qPCR, de los genes PAH, HPD, HGD y PCBD1 de ratón en agrupamientos de células con transfección cuádruple transfectados (4x-tfxn) o control con transfección cuádruple negativa (4x-control-tfxn) de la línea celular original de CHO y de la línea celular B de CHO.

Tabla 7

Gen	Promedio de $\Delta C_t$ en comparación con B-actina (valor bajo de $\Delta C_t$ = expresión alta)			
	Línea celular original de CHO	Línea celular original de CHO	Línea celular B de CHO	Línea celular B de CHO
	<u>4x-control-tfxn</u>	<u>4x-tfxn</u>	<u>4x-control-tfxn</u>	<u>4x-tfxn</u>
HAP	11,53	8,2	11,96	7,86
HPD	18,13	5,02	18,01	3,11
HGD	20,21	16,34	19,23	15,25
PCBD1	12,7	6,24	14,66	3,97

5

Ejemplo 18: Comprobación de la capacidad de los agrupamientos de células que expresan los cuatro genes de ratón transfectados, incluidos PAH, HPD, HGD y PCBD1 (4x-tfxn), para crecer en medio sin tirosina

Objetivo:

10 La expresión de la actividad enzimática PAH y PCBD1 confirió a las células la capacidad de catalizar la síntesis de tirosina a partir de fenilalanina y, por lo tanto, de favorecer la canalización del flujo de aminoácidos alejándola de la vía de biosíntesis de los inhibidores fenil-lactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato y 4-hidroxifenil-lactato (véase el ejemplo 19). El objetivo de este experimento fue comprobar si los agrupamientos de células 4x-tfxn que expresan los cuatro genes de ratón, incluidos PAH, HPD, HGD y PCBD1, derivados de la línea celular B de CHO o de la línea celular hospedadora original, tienen la capacidad de proliferar en condiciones de medio sin tirosina.

15 Materiales y procedimientos:

Células, medio y configuración del experimento

20 Se centrifugaron los agrupamientos de células 4x-tfxn o 4x-control-tfxn de la línea celular B de CHO o de la línea celular original y se inocularon los sedimentos celulares en el medio D (medio C sin tirosina, pero con suplemento de una cantidad adicional (2 mM) de fenilalanina). El medio C tiene aproximadamente un tercio de las concentraciones de diferentes aminoácidos con respecto a los niveles en el medio A. El medio A es una versión enriquecida del medio 9 sin insulina como se divulga en el documento US7294484, tabla 14, con ligeras diferencias en las concentraciones de bicarbonato de sodio y cloruro de potasio, y que contiene Pluronic F68 en lugar de poli(alcohol vinílico). Se enriqueció añadiendo medio 5 sin glutamina al 10 % (documento US7294484, tabla 7) y aumentando aún más las concentraciones de ocho aminoácidos (Glu, Tyr, Gly, Phe, Pro, Thr, Trp y Val). Las concentraciones de aminoácidos figuran en la tabla 8.

25

Tabla 8: Concentración de aminoácidos en el medio A

Aminoácidos	Concentración en el medio A ( mM)
alanina	0,4
arginina	5,3
asparagina•H <sub>2</sub> O	21,1
ácido aspártico	2,3
cisteína•HCl•H <sub>2</sub> O	0,4

Aminoácidos	Concentración en el medio A ( mM)
cistina•2HCl	1,5
ácido glutámico	0
glutamato monosódico	2,0
glutamina	0
glicina	3,6
histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	2,7
isoleucina	5,4
leucina	9,4
lisina•HCl	8,9
metionina	3,1
fenilalanina	4,5
prolina	9,1
serina	11,8
treonina	10,8
triptófano	2,3
tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	5,1
valina	10,3

Las células se inocularon a 0,3E6 células/ml en 25 ml de volumen de trabajo en matraces de agitación de 125 ml. Los matraces se incubaron en una plataforma de agitación (125 rpm) a 36,5 °C y en un ambiente con un 5 % de dióxido de carbono. El crecimiento celular se controló durante 3 días. El día 3, las células se centrifugaron y los sedimentos celulares se reinocularon en medio D fresco a 0,3E6 células/ml y se controló el crecimiento celular durante los 5 días siguientes.

#### Resultados:

En el primer pase, en el transcurso de los tres días, tanto la línea celular B como los agrupamientos de células 4x-tfxn derivadas de la línea celular original crecieron bien en condiciones de medios sin tirosina, mientras que los agrupamientos de células 4x-control-tfxn no mostraron ninguna proliferación (figura 29). En el segundo pase, de forma similar a la primera ronda, los agrupamientos de células 4x-tfxn crecieron bien, mientras que los agrupamientos de células 4x-control-tfxn no mostraron ninguna proliferación. Estos datos sugerían que los agrupamientos de células 4x-tfxn eran capaces de sintetizar tirosina a partir de fenilalanina y, por tanto, favorecer la canalización del flujo de aminoácidos alejándola de la vía de biosíntesis de los inhibidores fenil-lactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato y 4-hidroxifenil-lactato (véase el ejemplo 19).

Además, también se observó que los agrupamientos de células 3x-tfxn derivados tanto de la línea celular B como de la línea celular original (con sobreexpresión de PAH, HPD y HGD) eran incapaces de proliferar en medio sin tirosina (datos no mostrados). Esto sugería que la expresión de PCBD1 era crucial para la capacidad celular de biosintetizar tirosina. Se ha notificado previamente que la actividad de la enzima PAH aumenta a pH alto (Parniak *et al.*, 1988). El cultivo de los agrupamientos de células 4x-tfxn en condiciones sin tirosina a un pH más alto (>7,0) aumentó aún más la tasa de crecimiento celular y la viabilidad (datos no mostrados).

Ejemplo 19: Demostración de (i) un crecimiento/productividad similar o mejor de los agrupamientos de células 4x-tfxn en cultivos de alimentación discontinua sin tirosina en comparación con los agrupamientos de células 4x-control-tfxn en cultivos suplementados con tirosina y (ii) una menor acumulación de 3-(4-hidroxifenil)lactato, un subproducto de la vía de la tirosina, en cultivos 4x-tfxn

## 5 Objetivo:

El objetivo de este experimento era demostrar que los agrupamientos de células 4x-tfxn pueden crecer en cultivos HiPDOG sin tirosina en tasas de crecimiento similares o superiores y alcanzar densidades celulares máximas similares o superiores y producir valoraciones similares o superiores, en comparación con los agrupamientos de células 4x-control-tfxn en cultivos HiPDOG típicos (suplementados con tirosina). Otro objetivo era establecer que la combinación de la expresión de PAH, HPD, HGD y PCBD1 junto con el cultivo en medios sin tirosina suprime la producción del metabolito subproducto de la vía de la tirosina, 3-(4-hidroxifenil)lactato.

Materiales y procedimientos:

Células y configuración del biorreactor

En este ejemplo se utilizaron agrupamientos de células 4x-tfxn y 4x-control-tfxn derivadas de la línea celular B de CHO, que expresan un anticuerpo recombinante. Los agrupamientos de células 4x-tfxn expresaron las cuatro enzimas del ratón (PAH, HPD, HGD y PCBD1), mientras que los agrupamientos de células 4x-control-tfxn son las células de control que expresaron únicamente el marcador de resistencia a la presión de selección.

Se inocularon agrupamientos de células 4x-tfxn derivadas de la línea celular B o los agrupamientos de células 4x-control-tfxn a  $1.2 \times 10^6$  células/ml en cultivos de alimentación discontinua HiPDOG usando medio A sin tirosina o la formulación original del medio A (que contiene tirosina), respectivamente (para más información sobre el medio A, véase el ejemplo 18). Para complementar los nutrientes durante el cultivo, se utilizó el medio de alimentación B sin tirosina para el cultivo de alimentación discontinua del agrupamiento de células 4x-tfxn, mientras que, para los cultivos de alimentación discontinua de células 4x-control-tfxn, se utilizó la composición original del medio de alimentación B (que contiene tirosina) (para más información sobre el medio B, véase a continuación). Para ambas condiciones, el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del proceso, incluida la temperatura (36,5 °C), el pH (hasta el día 2: 7,15-7,20, a partir del segundo día: 7,10-7,15) y la velocidad de agitación (259 rpm) fueron idénticas. Se empleó la estrategia HiPDOG durante todo el experimento. Se midieron a diario la densidad de células viables y las concentraciones de glucosa, lactato, amoníaco y aminoácidos hasta el día 12. Las muestras de los sobrenadantes de ambas condiciones se analizaron para determinar los niveles de 3-(4-hidroxifenil)lactato utilizando la tecnología de RMN que se describe a continuación. Los niveles de aminoácidos de los cultivos se midieron mediante el procedimiento de análisis de aminoácidos descrito a continuación.

El medio B tiene la misma composición que el medio 5 (documento US7294484, tabla 7), pero con niveles más altos de aminoácidos (en un factor de 2,5). Las concentraciones de aminoácidos en el medio B se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Concentración de aminoácidos en el medio B

Aminoácidos	Concentración en el medio B ( mM)
alanina	6,0
arginina	32,9
asparagina•H <sub>2</sub> O	54,0
ácido aspártico	15,0
cisteína•HCl•H <sub>2</sub> O	0,0
cistina•2HCl	4,7
ácido glutámico	6,0
glutamato monosódico	0,0
glutamina	0,0

Aminoácidos	Concentración en el medio B ( mM)
glicina	6,0
histidina•HCl•H <sub>2</sub> O	10,5
isoleucina	27,0
leucina	38,9
lisina•HCl	30,0
metionina	12,0
fenilalanina	15,0
prolina	18,0
serina	45,2
treonina	24,0
triptófano	4,8
tirosina•2Na•2H <sub>2</sub> O	12,0
valina	24,0

#### Preparación de muestras de RMN, adquisición y tratamiento de datos

5 Se filtraron 1000 µl de cada muestra utilizando tubos de filtro de microcentrífuga Nanosep 3K Omega durante 60 minutos y se utilizaron 630 µl de la muestra filtrada para el análisis de RMN. Estos filtros se conservan con glicerol, por lo que pueden aparecer trazas de glicerol en el análisis. Se añadió solución de patrón interno a cada solución de muestra, y la mezcla resultante se agitó en vórtice durante 30 s. Se transfirieron 700 µl de la solución centrifugada a un tubo de RMN para la adquisición de datos.

10 Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro de RMN VNMRs 700 MHz de cuatro canales de Varian equipado con una sonda biomolecular de triple resonancia <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C refrigerada criogénicamente con sintonización automática. La secuencia de pulsos utilizada fue una 1D-t<sub>2</sub>noesy con una presaturación de 990 ms en agua y un tiempo de adquisición de 4 s. Los espectros se recogieron con 32 transitorios y 4 barridos de estado estacionario a 298 K.

15 Los espectros fueron procesados y los archivos .cnx fueron generados usando el módulo Processor en Chenomx NMR Suite 8.0. Los compuestos se identificaron y cuantificaron utilizando el módulo Profiler de Chenomx NMR Suite 8.0 con la Chenomx Compound Library versión 9, que contiene 332 compuestos. A efectos de información, las concentraciones perfiladas se han corregido para reflejar la composición de la muestra original, en lugar del contenido del tubo de RMN. Durante la preparación de las muestras, cada una de ellas se diluye introduciendo un patrón interno y, en caso necesario, para aumentar el volumen analizado de una muestra pequeña.

#### Análisis de aminoácidos

20 Se mezclaron 10 µl de una solución patrón de mezcla de aminoácidos o de una muestra de medio agotado (muestra diluida 10 veces) con 70 µl de tampón borato AccQ•Tag Ultra (kit de aplicaciones Waters UPLC AAA H-Class [176002983]) y se añadieron 20 µl de reactivo AccQ•Tag previamente disuelto en 1,0 ml de diluyente de reactivo AccQ•Tag Ultra. Se dejó que la reacción se desarrollase durante 10 min a 55 °C. El análisis cromatográfico líquido se realizó en un sistema Waters Acquity UPLC, equipado con un gestor de disolventes binarios, un automuestreador, un calentador de columna y un detector PDA. La columna de separación fue una columna Waters AccQ•Tag Ultra (2,1 mm d.i. × 100 mm, partículas de 1,7 µm). El calentador de la columna se ajustó a 55 °C y el caudal de la fase móvil se mantuvo a 0,7 ml/min. El eluyente A fue disolvente A concentrado de AccQ•Tag Ultra al 10 %, y el eluyente B fue disolvente B de AccQ•Tag Ultra al 100 %. El gradiente de separación no lineal fue 0-0,54 min (A al 99,9 %), 5,74 min

25

(A al 90,0 %), 7,74 min (A al 78,8 %), 8,04-8,64 min (A al 40,4 %), 8,73-10 min (A al 99,9 %). Se inyectó un microlitro de muestra para el análisis. El detector PDA se ajustó a 260 nm. Los tiempos de elución previamente determinados para los aminoácidos se utilizan para identificar los picos de aminoácidos específicos en el cromatograma para cada muestra. Las concentraciones de aminoácidos se calcularon utilizando el área bajo el pico y se generó la curva de calibración utilizando la solución patrón (Amino Acids Standard H, Thermo Scientific, PI-20088).

#### Resultados:

Los agrupamientos celulares en ambos cultivos crecieron de manera exponencial con un crecimiento ligeramente mejor observado en el cultivo de alimentación discontinua de células 4x-tfxn sin tirosina en comparación con el cultivo 4x-control-tfxn (figura 30A). Ambos cultivos alcanzaron densidades celulares máximas de 35E6 células/ml entre los días 7 y 9 de los cultivos. En ambos cultivos, la viabilidad celular fue superior al 97 % hasta el día 12 de cultivo (figura 30B). El perfil de valoración de ambos cultivos fue muy similar, con una valoración en el día 11 de 2,5 g/l (figura 30C). Además, se observó que las células 4x-tfxn consumían fenilalanina a un ritmo más rápido que las células 4x-control-tfxn (datos no mostrados). Se observó acumulación de tirosina en los cultivos 4x-tfxn (datos no mostrados). Esto sugería que las células 4x-tfxn convertían la fenilalanina en tirosina para suplir sus necesidades fisiológicas (biomasa y síntesis de proteínas). El exceso de tirosina se segregó hacia el cultivo. El cultivo 4x-control-tfxn se suplementó con tirosina exógena en los medios de inoculación y alimentación. Los niveles de tirosina disminuyeron en el transcurso del cultivo 4x-control-tfxn, lo que indica el consumo de tirosina por estas células (datos no mostrados). Además, los niveles de un subproducto del metabolismo de la tirosina, el 3-(4-hidroxifenil)lactato, fueron significativamente inferiores en el cultivo 4x-tfxn en comparación con el cultivo 4x-control-tfxn, lo que indica una menor canalización de fenilalanina y/o tirosina hacia la síntesis de subproductos (figura 30D).

#### Ejemplo 20: Comprobación del efecto del 2-metilbutirato y el isobutirato sobre el crecimiento de células CHO

##### Objetivo:

El 2-metilbutirato y el isobutirato son subproductos de las vías de la isoleucina y la valina, que se observó que se acumulaban en los cultivos de alimentación discontinua HiPDOG de la línea celular A de CHO. El nivel de acumulación en el día 7 era de aproximadamente 9 mM para el 2-metilbutirato y 2 mM para el isobutirato (datos no mostrados); la acumulación para la línea celular C de CHO está en el mismo orden (véase el ejemplo 21)). Este experimento se estableció para sondear el efecto de estos dos compuestos individualmente sobre el crecimiento de la línea celular A de CHO en el intervalo de concentración observado en los cultivos de alimentación discontinua HiPDOG.

##### Materiales y procedimientos:

La línea celular A de CHO que produce un anticuerpo recombinante se inoculó a bajas densidades celulares (0,1E6 células/ml) en diferentes condiciones por triplicado en cultivos en placas de 6 pocillos. El volumen de trabajo para cada pocillo el día 0 fue de 4 ml. Las condiciones ensayadas incluyen medio A fresco o medio A fresco suplementado individualmente con 2-metilbutirato o isobutirato a diferentes concentraciones. Las concentraciones ensayadas para el 2-metilbutirato son [0, 5, 10 y 20 mM] y para el isobutirato son [0, 1, 2 y 4 mM]. Las placas de 6 pocillos se incubaron en una plataforma de agitación a 36,5 °C y 5 % de dióxido de carbono. El crecimiento celular en todas las condiciones se controló durante 5 días.

##### Resultados:

La figura 31 muestra el efecto independiente del 2-metilbutirato o isobutirato sobre el crecimiento de la línea celular A de CHO. Las células cultivadas en medio fresco crecieron muy bien. El crecimiento celular se suprimió cuando las células se cultivaron en medios frescos suplementados con 2-metilbutirato (figura 31A) o isobutirato (figura 31B) a concentraciones superiores a 5 mM o 1 mM, respectivamente. Esto demuestra que el 2-metilbutirato y el isobutirato inhiben el crecimiento celular. El 2-metilbutirato es un subproducto metabólico del metabolismo de la isoleucina y el isobutirato es un subproducto metabólico del metabolismo de la valina.

Ejemplo 21: Demostración de la reducción de la acumulación de 2-metilbutirato o isobutirato mediante la limitación de isoleucina o valina, respectivamente, en cultivos de alimentación discontinua de células CHO (línea celular C de CHO).

##### Objetivo:

El objetivo principal de este ejemplo fue demostrar la reducción de la acumulación de 2-metilbutirato o isobutirato en cultivos de alimentación discontinua de células CHO limitando el suministro de isoleucina o valina, respectivamente.

##### Materiales y procedimientos:

Células y configuración del biorreactor

En este ejemplo se utilizó la línea celular GS-CHO (línea celular C) que expresa un anticuerpo recombinante. Como parte de este ejemplo se ensayaron dos condiciones: A) cultivo de alimentación discontinua con niveles bajos de



isoleucina y valina (bajo en AA), B) cultivos de alimentación discontinua con concentraciones normales de aminoácidos (control). El experimento se llevó a cabo durante 12 días.

Se inocularon células en crecimiento exponencial de cultivos de siembra a aproximadamente 4E6 células/ml en biorreactores de producción que empleaban un proceso típico de alimentación discontinua (con niveles típicos de aminoácidos) o el proceso de alimentación discontinua con bajo contenido en aminoácidos. En las condiciones de contenido bajo en aminoácidos, las concentraciones de isoleucina y valina se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los siete primeros días del cultivo, tras lo cual se permitió que aumentaran por encima de 1 mM. Se midieron a diario la densidad de células viables y las concentraciones de glucosa, lactato, amoníaco y aminoácidos hasta el día 12. Para ambas condiciones, el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del proceso, incluidos la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la velocidad de agitación (259 rpm), fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición de control fue el medio A y el utilizado en condiciones de bajo contenido en aminoácidos fue la versión modificada del medio A con bajas concentraciones de aminoácidos, que incluyen tirosina, fenilalanina, metionina, triptófano, serina, glicina, treonina, leucina, isoleucina y valina. El medio de alimentación utilizado para ambas condiciones fue el medio B. Los niveles de aminoácidos en el medio B se ajustaron de tal forma que la cantidad de aminoácidos suministrada a través de la alimentación con medio B, de forma semicontinua, fuera aproximadamente igual a la cantidad de aminoácidos captada por el cultivo. La velocidad de alimentación utilizada fue proporcional a las células viables integrales del cultivo. Se analizaron muestras de sobrenadantes de ambas condiciones para determinar los niveles de 2-metilbutirato e isobutirato utilizando la tecnología de RMN descrita en el ejemplo 19. Los niveles de aminoácidos del cultivo se midieron utilizando el procedimiento de análisis de aminoácidos descrito en el ejemplo 19.

Resultados:

Las concentraciones de los aminoácidos isoleucina y valina se mantuvieron satisfactoriamente entre 0,5 mM-1 mM en la condición de contenido bajo en AA (figura 32A y 32C). Tal limitación de los niveles de aminoácidos en la condición de contenido bajo AA en dio como resultado una menor acumulación de 2-metilbutirato (figura 32B) e isobutirato (figura 32D).

Ejemplo 22: Experimento para determinar las dianas génicas de modificación metabólica para suprimir la biosíntesis de los inhibidores (isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato) producidos a partir de la vía de los aminoácidos de cadena ramificada

Objetivo:

Este experimento se realizó para determinar la causa de la biosíntesis de isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato, que son subproductos del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada que se acumularon en niveles muy altos en cultivos de alimentación discontinua de células CHO. Se sondeó la expresión génica de todas las enzimas de la vía de los aminoácidos de cadena ramificada ("branched chain amino acid", BCAA). A partir del análisis de la expresión génica en la vía del catabolismo de los BCAA, se identificaron dianas génicas para la modificación metabólica de las células CHO (línea celular B de CHO y línea celular original) que suprimen la biosíntesis de isovalerato, isobutirato y 2-metilbutirato.

Resultados:

Se realizó un análisis de RT-qPCR de los genes de la vía catabólica de la leucina. Los valores de expresión logarítmica de los genes de la vía de la leucina se muestran en la figura 33A. Los datos de expresión génica de la vía de la leucina indican que todas las enzimas de la vía se expresaron a niveles similares. También se observó que la expresión génica de las enzimas de las vías de la isoleucina y la valina era relativamente alta en la línea celular original (datos no mostrados). Los datos no apuntaban hacia una diana clara en la vía de los BCAA que pudiera explicar las elevadas tasas de biosíntesis y secreción de isovalerato, isobutirato y 2-metilbutirato. Sin embargo, las enzimas posteriores a los nodos de isovalerato, isobutirato o 2-metilbutirato podrían portar mutaciones de pérdida de función, lo que puede explicar la canalización del flujo hacia el isovalerato, el isobutirato o el 2-metilbutirato. Dado que las enzimas BCAT1 (o BCAT2) y BCKDHA/BCKDHB catalizan las dos primeras etapas en las tres vías de aminoácidos de cadena ramificada, se procedió a atenuar o inactivar la actividad de cualquiera de dichas enzimas con el objetivo de reducir la biosíntesis de isovalerato, isobutirato y 2-metilbutirato (figura 33B).

Ejemplo 23: Generación de agrupamientos de células CHO con atenuación de BCAT1 transitorios para suprimir la producción de la biosíntesis de inhibidores de la vía de los BCAA (isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato)

Objetivo:

Este experimento se realizó para reducir la expresión del gen BCAT1 en la línea celular B de CHO y en la línea celular original de CHO con el fin de limitar la producción de isovalerato, isobutirato y 2-metilbutirato en los respectivos cultivos celulares.

Materiales y procedimientos:

La atenuación del miARN actúa expresando pequeñas secuencias de ARN (aproximadamente 20-25 bases) que son complementarias a una secuencia del gen diana (por ejemplo, BCAT1). El miARN se une al ARN mensajero (ARNm) del gen diana formando una región de ARN bicatenario. Este ARN bicatenario es objeto de escisión y degradación por parte de la célula, lo que se traduce en una disminución neta del ARNm que se traduce y, por tanto, de la proteína que se produce. La atenuación del microARN de BCAT1 se realizó utilizando el kit de vectores de expresión BLOCK-iT Inducible Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen). Se diseñaron cinco pares de oligonucleótidos de miARN (hebra superior e inferior complementarias de BCAT1) utilizando una herramienta en línea denominada Block-iT RNAi Designer (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/>) y los oligonucleótidos de ADN fueron preparados por Integrated DNA Technologies ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Los pares de oligonucleótidos se reasociaron y ligaron en el vector pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR. La secuencia de los vectores (cinco de ellos) fue confirmada por WyzerBiosciences (Cambridge, MA). Los cinco vectores de miARN o un vector de control negativo denominado pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR-neg (proporcionado por Invitrogen con el kit) se transfectaron a la línea celular original de CHO o a la línea celular B de CHO utilizando el electroporador GenePulser XCell (BioRad) y se dejaron recuperar durante dos días. Transcurridos dos días, las células se sometieron a presión de selección con un antibiótico (blastidina, 10 ug/ml) para la generación de agrupamientos de células estables (véase el ejemplo 24), o bien se prepararon lisados celulares de las células transfectadas (o de las células no transfectadas) en reactivo de extracción de proteínas M-PER (Thermo Fisher) suplementado con cOmplete, Mini, cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche). Las muestras se analizaron mediante transferencia Western utilizando el sistema Novex NuPage (Thermo Fisher). El sistema proporciona geles de poliacrilamida, tampón de carga de la muestra, reductor de la muestra, tampón de ejecución del gel, patrón de masa de proteínas, membrana de nitrocelulosa y reactivo de detección por quimioluminiscencia. Las transferencias fueron sondeadas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-BCAT1 (AbCam, n.º de catálogo ab110761) o un anticuerpo contra B-actina (AbCam, n.º de catálogo ab8227). Las transferencias Western se visualizaron con un sistema BioRad ChemiDoc y se analizaron para determinar los niveles de B-actina y BCAT1.

Secuencias de miARN de BCAT1 utilizadas:

miARN seq1.1a: TGGGAGAAGCCTCACATTAA

miARN seq2.1a: TCTGCTGTGAGGACCACTTTG

miARN seq3.1a: AGTGGGCACGATGAATCTGTT

miARN seq4.1a: CACGATGAATCTGTTCTCTA

miARN seq5.1a: CTTGGGCAAAGTACTGATAT

Resultados:

La figura 34 muestra la transferencia Western para los niveles de proteínas de BCAT1 y B-actina en células transfectadas transitoriamente. La B-actina se incluyó como gen (o proteína) de mantenimiento y se utilizó como comparador interno de la expresión de proteínas. Los niveles de B-actina fueron similares en las cinco transfecciones (transitorias) de miARN, en la transfección de control de miARN negativo y en las células no transfectadas (tanto para la línea celular B de CHO como para la línea celular original). Esto indica una carga uniforme de proteínas en todas las condiciones (figura 34A y 34C). En las transfecciones transitorias de la línea celular original de CHO, se observó un menor nivel de proteína BCAT1 en caso de la atenuación que utiliza miARN Seq 2.1a, miARN Seq 3.1a, miARN Seq 4.1a y miARN Seq 5.1a. En las transfecciones transitorias de la línea celular original, se observó un menor nivel de proteína BCAT1 en las cinco condiciones de atenuación ensayadas. El control no transfectado y el control negativo mostraron un patrón de bandas más intenso que indicaba niveles más altos de las proteínas BCAT1.

Ejemplo 24: Generación de agrupamientos de células CHO con atenuación de BCAT1 estables para suprimir la producción de inhibidores de la biosíntesis de la vía de los BCAA (isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato)

Objetivo:

El objetivo principal de este experimento fue desarrollar agrupamientos estables de células CHO con niveles reducidos de BCAT1. El objetivo era demostrar además que estos agrupamientos estables tenían una capacidad reducida para producir los metabolitos inhibidores de la vía de los BCAA (isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato), cuya reducción se traducía en un mejor crecimiento y productividad.

Resultados:

Las células de la línea celular original y de la línea celular B de CHO transfectadas con los cinco vectores de atenuación de miARN de BCAT1 se seleccionaron para llevar a cabo agrupamientos de células estables. A continuación, se analizaron los niveles de proteína BCAT1 en los agrupamientos estables. Todos los agrupamientos estables de la línea celular original, generados a partir de transfecciones con los cinco miARN, presentaron niveles reducidos de proteína BCAT1, en mayor o menor medida, en comparación con los agrupamientos estables generados a partir de la transfección con el control de secuencia de miARN negativo (figura 35A y 35B). Esto indicaba que se habían generado

con éxito agrupamientos estables de células con atenuación de BCAT1. Se seleccionaron los agrupamientos con niveles de proteínas BCAT1 más bajos y se comprobó la producción de inhibidores, que incluyen isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato, en cultivos de alimentación discontinua (con y sin emplear la estrategia HiPDOG). Los cultivos que producen niveles más bajos de estos metabolitos inhibidores crecieron hasta alcanzar densidades celulares más altas y produjeron valoraciones más elevadas. También se llevó a cabo una atenuación equivalente de la isoenzima BCAT2 para demostrar la reducción de los niveles de producción de BCAT2 para probar la reducción de la producción de inhibidores, que incluyen isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato. BCAT2 es una forma de isoenzima de BCAT1, que es catalítica y funcionalmente equivalente a BCAT1 y realiza la misma función en las vías de la leucina, isoleucina y valina representadas en la figura 33B.

Tabla 10: Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
B-actina	Actina, beta
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
GOT1	Glutámico-oxaloacético transaminasa 1, soluble
GOT2	Glutámico-oxaloacético transaminasa 2, mitocondrial
TAT	Tirosina aminotransferasa
FAH	Fumarilacetoacetato hidrolasa
GSTZ1	Glutación transferasa zeta 1 (maleilacetoacetato isomerasa)
HAP	Fenilalanina hidroxilasa
HPD	Ácido 4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa
HGD	Homogentisato 1,2-dioxigenasa
DLD	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
IVD	Isovaleril coenzima A deshidrogenasa
MCCC1	Metilcrotonoil-coenzima A carboxilasa 1 (alfa)
MCCC2	Metilcrotonoil-coenzima A carboxilasa 2 (beta)
BCKDHA	Cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada E1, polipéptido alfa
BCKDHB	Cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada E1, polipéptido beta
DBT	Dihidrolipoamida transacilasa de cadena ramificada E2
BCAT1	Aminotransferasa de cadena ramificada 1, citosólica
BCAT2	Aminotransferasa de cadena ramificada 2, mitocondrial
AUH	Proteína de unión al ARN AU/enoil-coenzima A hidratasa
HMGCL	3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A liasa
ACADM	Acil-coenzima A deshidrogenasa, cadena de longitud intermedia

Abreviatura	Descripción
GCH1	GTP ciclohidrolasa 1
PTS	6-Piruvoil-tetrahidropterina sintasa
SPR	Sepiapterina reductasa
PCBD1	Pterina 4 alfa carbinolamina deshidratasa/cofactor de dimerización del factor nuclear de hepatocitos 1 alfa (TCF1) 1
QDPR	Quinoide de dihidropteridina reductasa
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BH <sub>4</sub> -4a-carbinolamina	Tetrahidrobiopterina-4 alfa-carbinolamina
q-BH <sub>2</sub>	Quinoide de dihidrobiopterina
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
4x-tfxn	Agrupamientos de células transfectadas con cuatro vectores que contienen un gen de interés y un marcador de resistencia (PAH y geneticina o HGD y blasticidina o HPD e higromicina o PCBD1 y puromicina)
4x-control-tfxn	Agrupamientos de células transfectadas con cuatro vectores nulos que contienen sólo un marcador de resistencia (geneticina o blasticidina o higromicina o puromicina)
CoA	Coenzima A

### Referencias bibliográficas

Altamirano C., Illanes A., Becerra S., Cairo J.J., Godia F. (2006), Considerations on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose, *Journal of biotechnology*, 125: 547-556

- 5 Bertoni J.M. (1981), Competitive inhibition of rat brain hexokinase by 2-deoxyglucose, glucosamine, and metrizamide, *Journal of neurochemistry*, 37: 1523-1528

Clem B., Telang S., Clem A., Yalcin A., Meier J., Simmons A., Rasku M.A., Arumugam S., Dean W.L., Eaton J., Lane A., Trent J.O., Chesney J. (2008), Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth, *Molecular cancer therapeutics*, 7: 110-120

- 10 Duvel K., Yecies J.L., Menon S., Raman P., Lipovsky A.I., Souza A.L., Triantafellow E., Ma Q., Gorski R., Cleaver S., Vander Heiden M.G., MacKeigan J.P., Finan P.M., Clish C.B., Murphy L.O., Manning B.D. (2010), Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1, *Molecular cell*, 39: 171-183

- 15 Gagnon M., Hiller G., Luan Y.T., Kittredge A., DeFelice J., Drapeau D. (2011), High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures, *Biotechnology and bioengineering*, 108: 1328-1337

Kim S.H., Lee G.M. (2007a), Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin, *Applied microbiology and biotechnology*, 74: 152-159

Kim S.H., Lee G.M. (2007b), Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44), *Applied microbiology and biotechnology*, 76: 659-665

- Lee H.L.T., Boccazzi P., Gorret N., Ram R.J., Sinskey A.J. (2004), In situ bioprocess monitoring of Escherichia coli bioreactions using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 35: 131-137
- Lee J.S., Lee G.M. (2012), Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction, *Biotechnology and bioengineering*, 109: 3093-3102
- 5 Li B., Ryan P.W., Ray B.H., Leister K.J., Sirimuthu N.M., Ryder A.G. (2010), Rapid characterization and quality control of complex cell culture media solutions using raman spectroscopy and chemometrics, *Biotechnology and bioengineering*, 107: 290-301
- Morgan H.P., O'Reilly F.J., Wear M.A., O'Neill J.R., Fothergill-Gilmore L.A., Hupp T., Walkinshaw M.D. (2013), M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 5881-5886
- 10 Mulukutla B.C., Gramer M., Hu W.S. (2012), On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells, *Metabolic engineering*, 14: 138-149
- Whelan J., Craven S., Glennon B. (2012), In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors, *Biotechnology progress*, 28: 1355-1362
- 15 Whitehouse S., Cooper R.H., Randle P.J. (1974), Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids, *The Biochemical journal*, 141: 761-774
- Wlaschin K.F., Hu W.S. (2007), Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport, *Journal of biotechnology*, 131: 168-176
- 20 Yi W., Clark P.M., Mason D.E., Keenan M.C., Hill C., Goddard W.A., 3<sup>o</sup>, Peters E.C., Driggers E.M., Hsieh-Wilson L.C. (2012), Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism, *Science*, 337: 975-980
- Zhou M., Crawford Y., Ng D., Tung J., Pynn A.F., Meier A., Yuk I.H., Vijayasankaran N., Leach K., Joly J., Snedecor B., Shen A. (2011), Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases, *Journal of biotechnology*, 153: 27-34
- 25 Zhu G., Zhu X., Fan Q., Wan X. (2011), Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica acta, Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 78: 1187-1195
- Parniak, M.A., Davis, M.D., y Kaufman, S. (1988), Effect of alkaline pH on the activity of rat liver phenylalanine hydroxylase, *The Journal of biological chemistry*, 263, 1223-1230.

# REIVINDICACIONES

1. Una célula que comprende un gen modificado que reduce el nivel de síntesis de inhibidores del crecimiento y/o de la productividad por la célula, en la que el gen modificado es Bcat1, en la que la modificación reduce la expresión génica de Bcat1, y en la que la célula expresa una proteína recombinante o una proteína recombinante heteróloga, en la que la célula es una célula CHO, en la que la célula comprende una atenuación o una inactivación del gen Bcat1 y en la que la atenuación de Bcat1 es menor o igual a cualquiera del 10, 5, 2,5 por ciento del nivel de expresión o actividad de Bcat1 en comparación con células no modificadas.
2. La célula de la reivindicación 1, en la que la atenuación se consigue mediante una o más de las siguientes acciones: delección de genes, alteración, sustitución, mutación puntual, mutación puntual múltiple, mutación por inserción o mutación por desplazamiento de marco aplicadas a Bcat1.
3. Un procedimiento de cultivo celular que comprende proporcionar células de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en un medio de cultivo celular para iniciar un proceso de cultivo celular.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además obtener y purificar la proteína recombinante producida por las células.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que el crecimiento y/o la productividad celular aumentan en comparación con un cultivo de control, siendo dicho cultivo de control idéntico, excepto que comprende células no modificadas.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el crecimiento celular se determina por la densidad de células viables máxima y aumenta al menos un 5 % en comparación con el cultivo de control.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la productividad se determina por la valoración de proteínas recombinantes expresadas y aumenta en al menos un 5 % en comparación con el cultivo de control.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que la densidad de células viables máxima del cultivo celular es superior a  $1 \times 10^6$  células/ml,  $5 \times 10^6$  células/ml,  $1 \times 10^7$  células/ml,  $5 \times 10^7$  células/ml,  $1 \times 10^8$  células/ml o  $5 \times 10^8$  células/ml.

Figura 1A, 1B

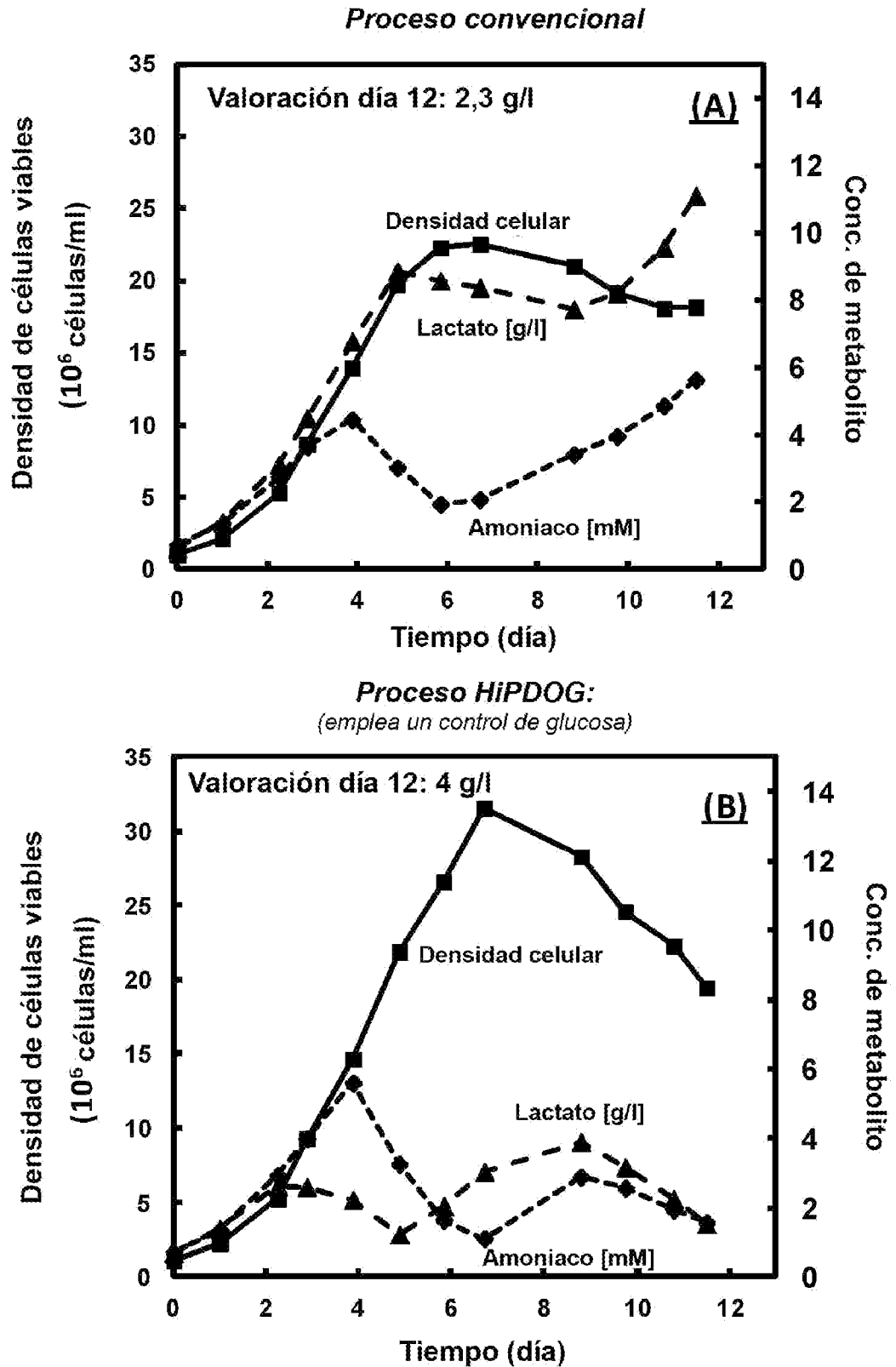


Figura 2A, 2B, 2C

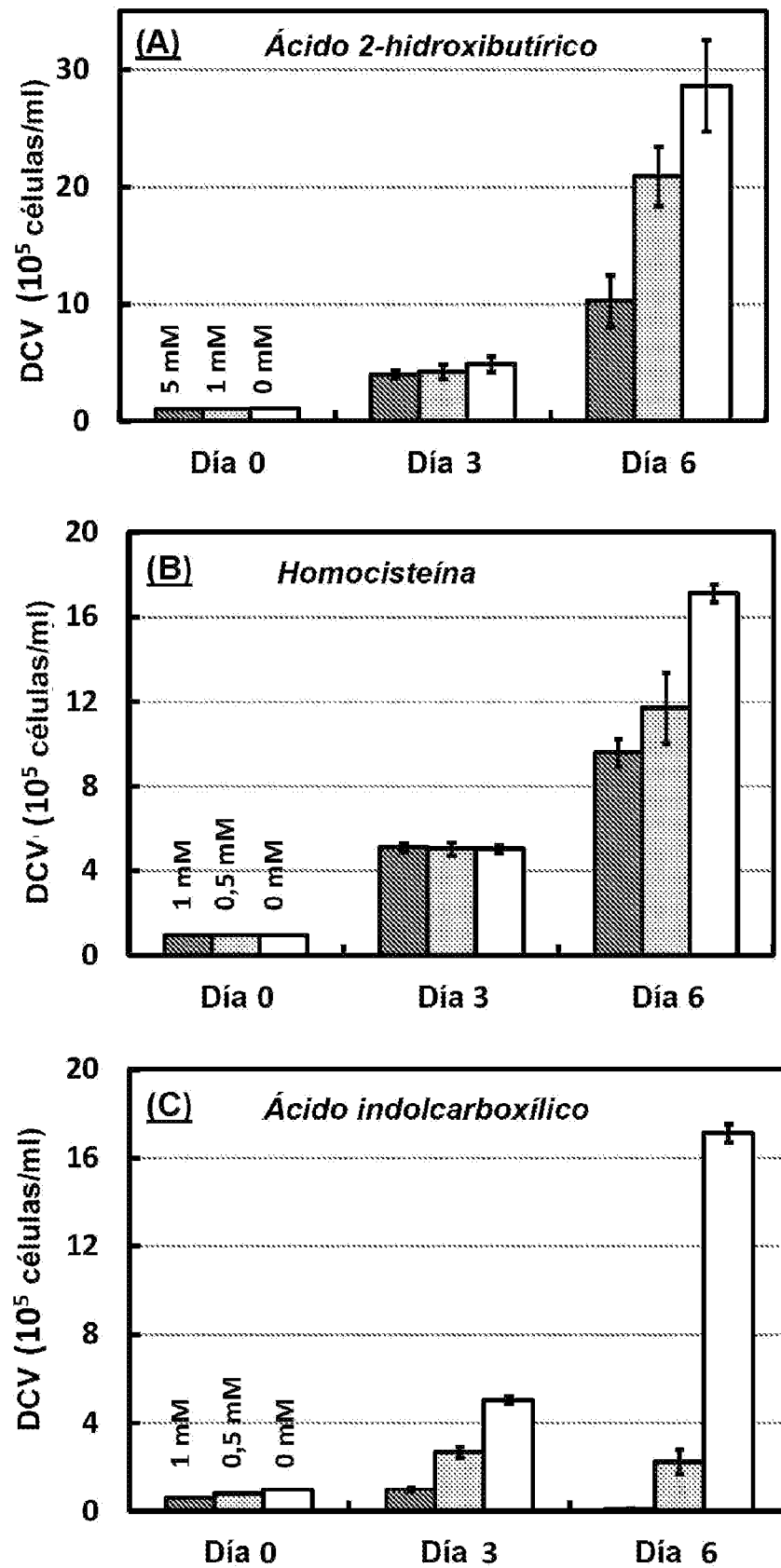




Figura 3A, 3B

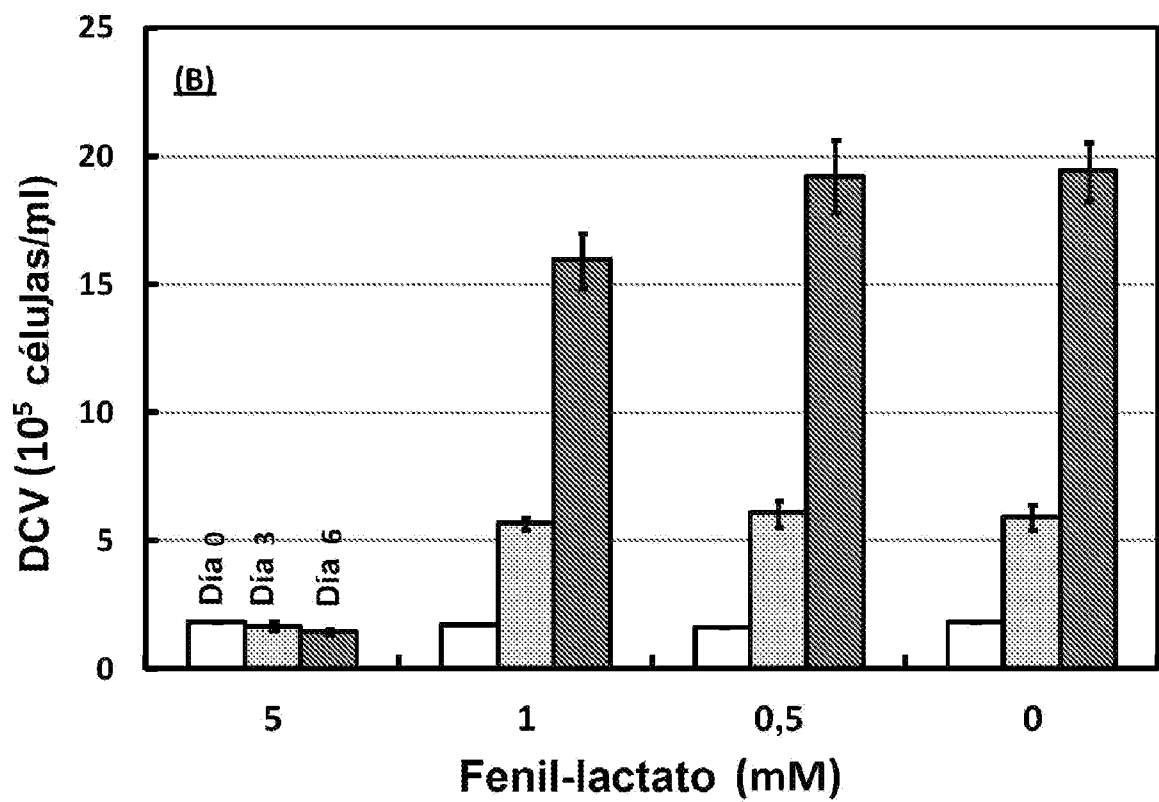
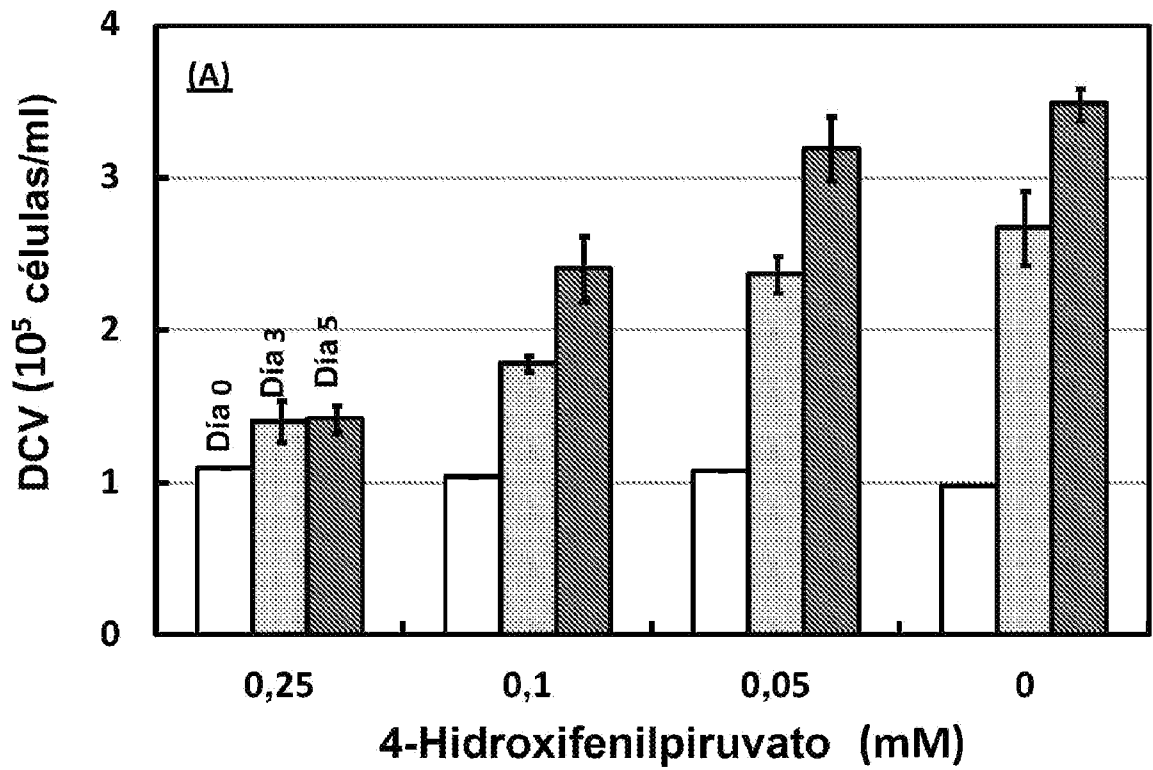


Figura 4A, 4B

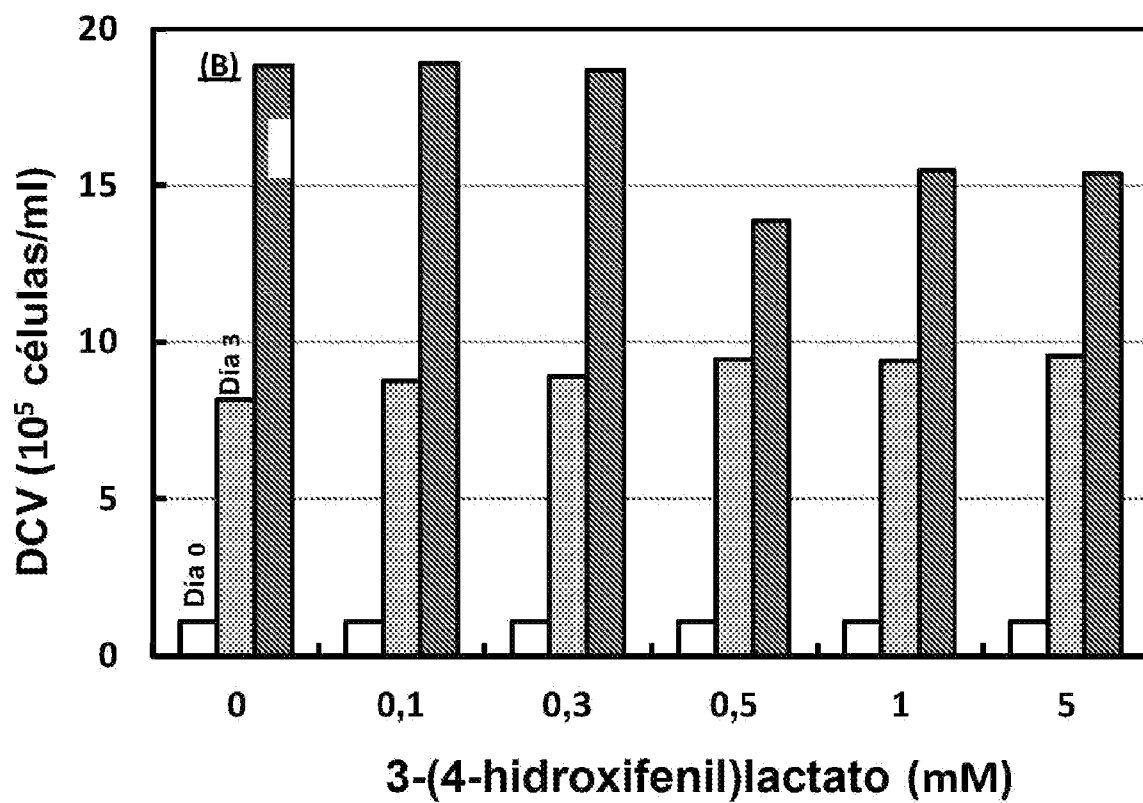
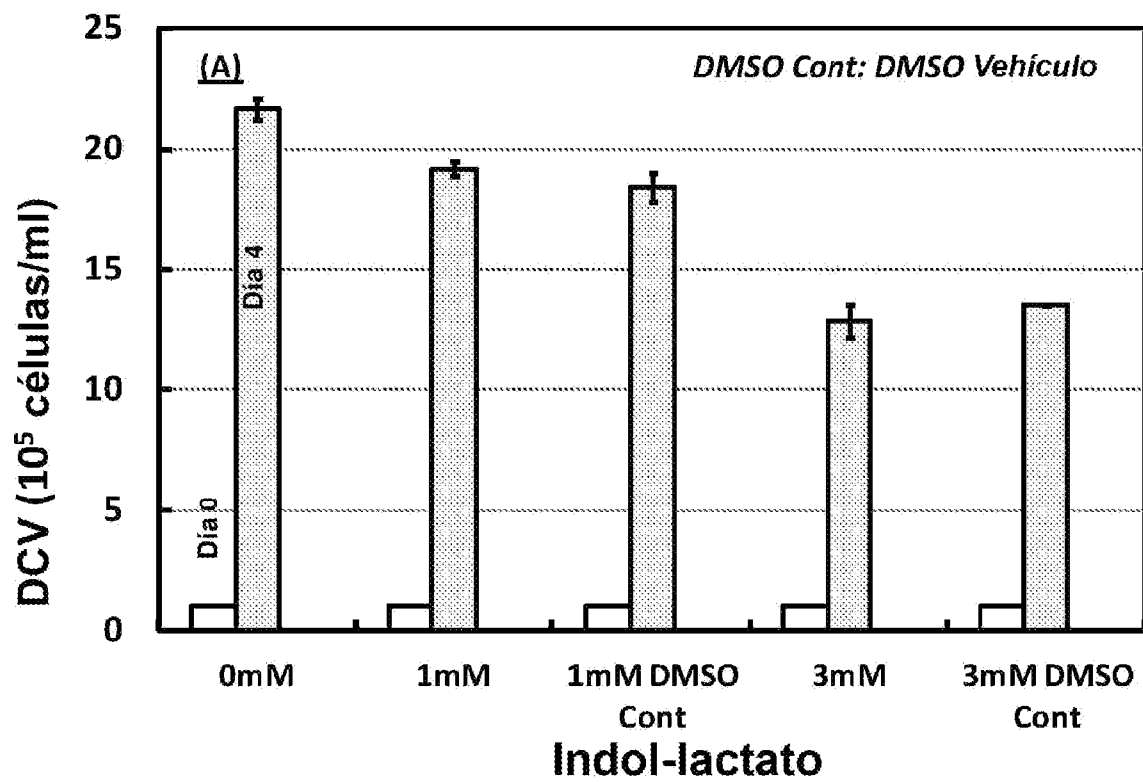


Figura 5A, 5B

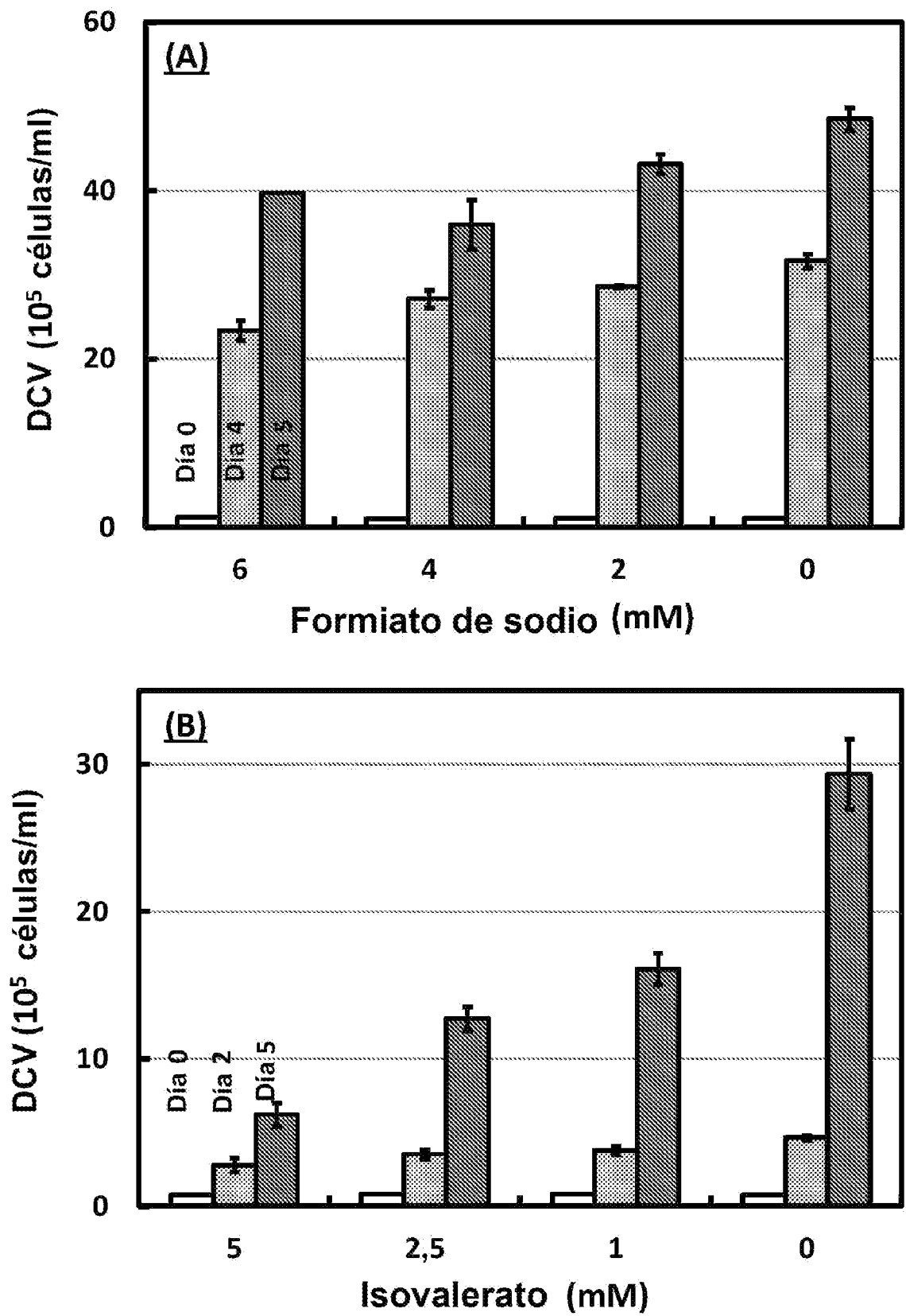


Figura 6

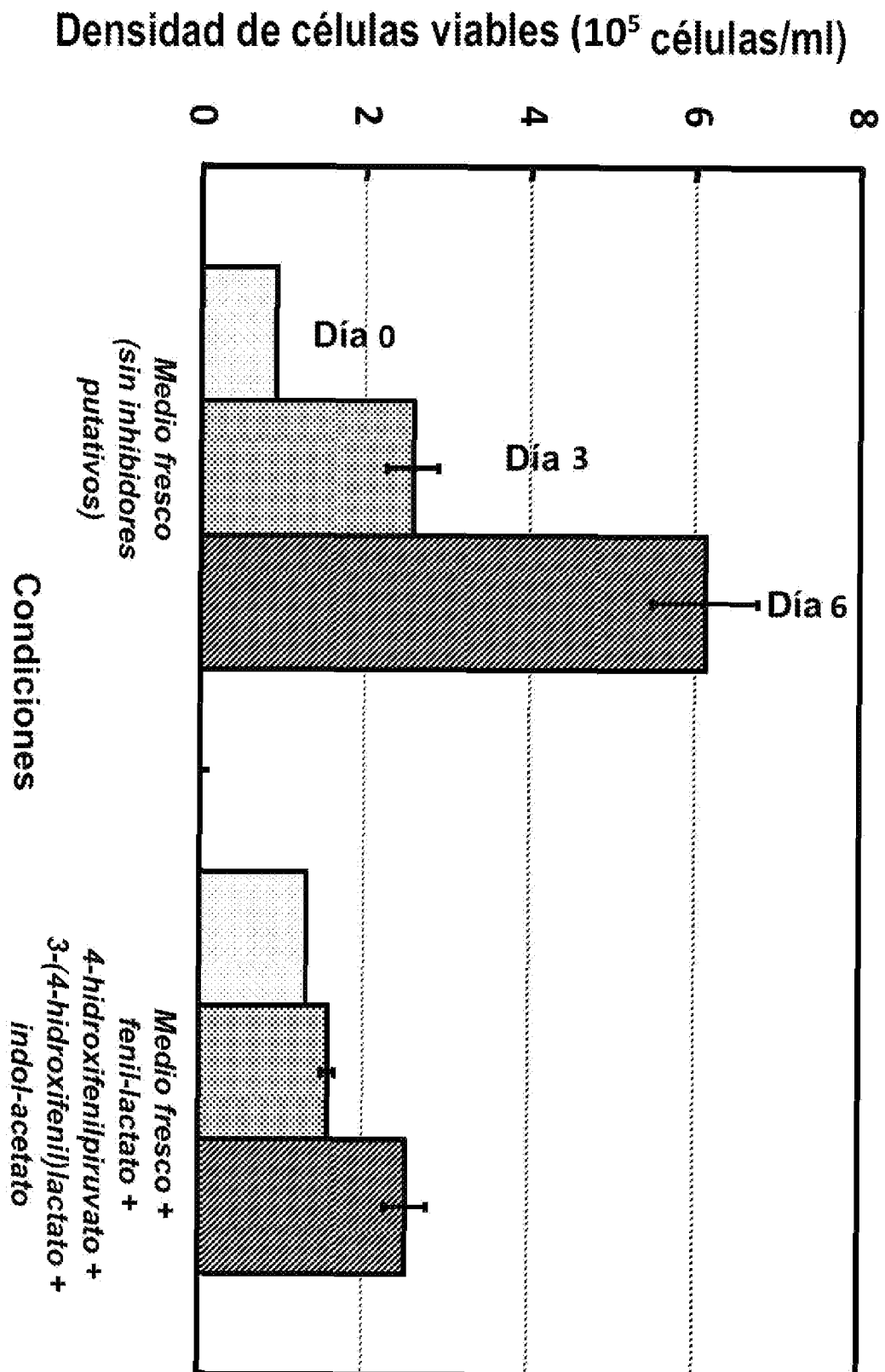


Figura 7A, 7B

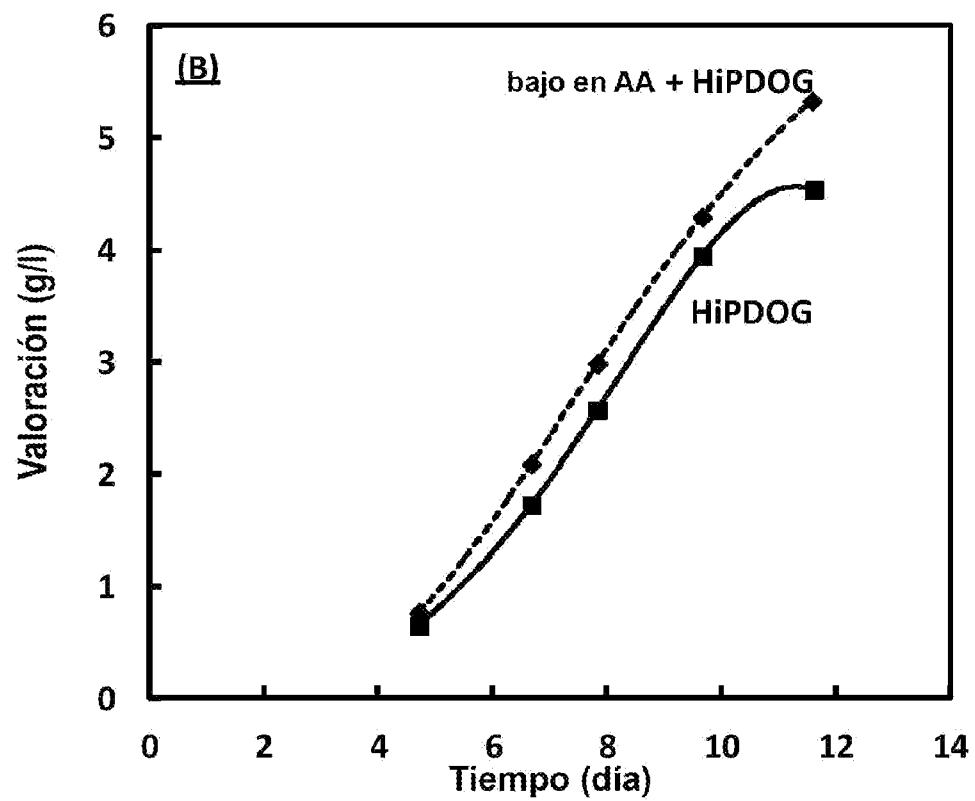
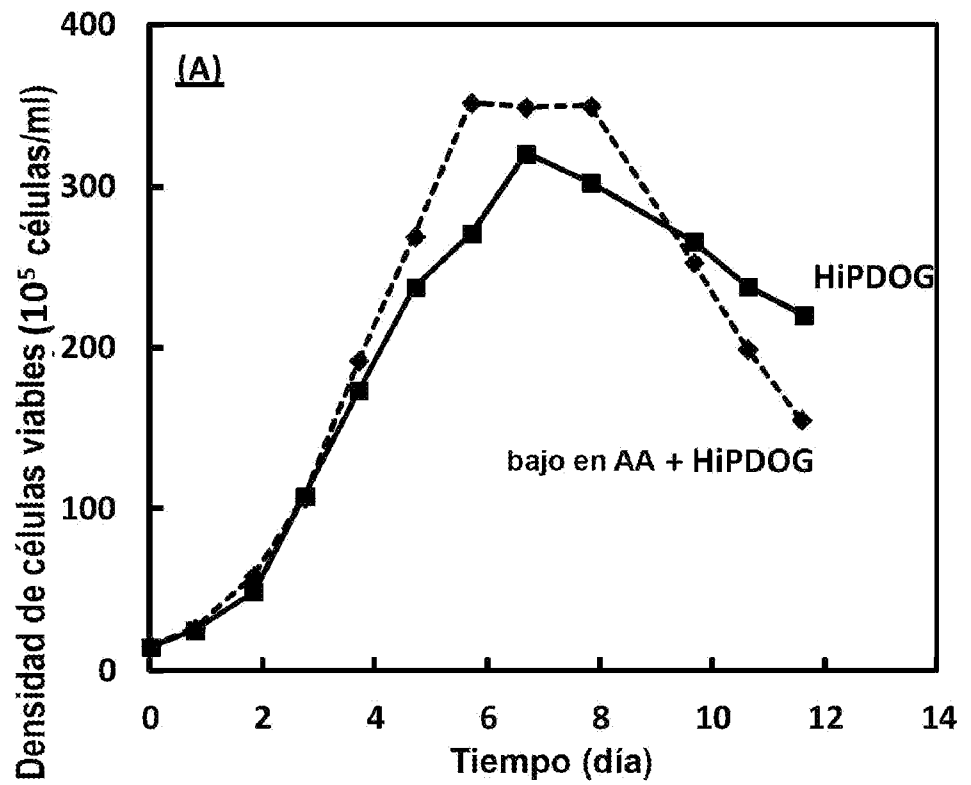


Figura 8A, 8B

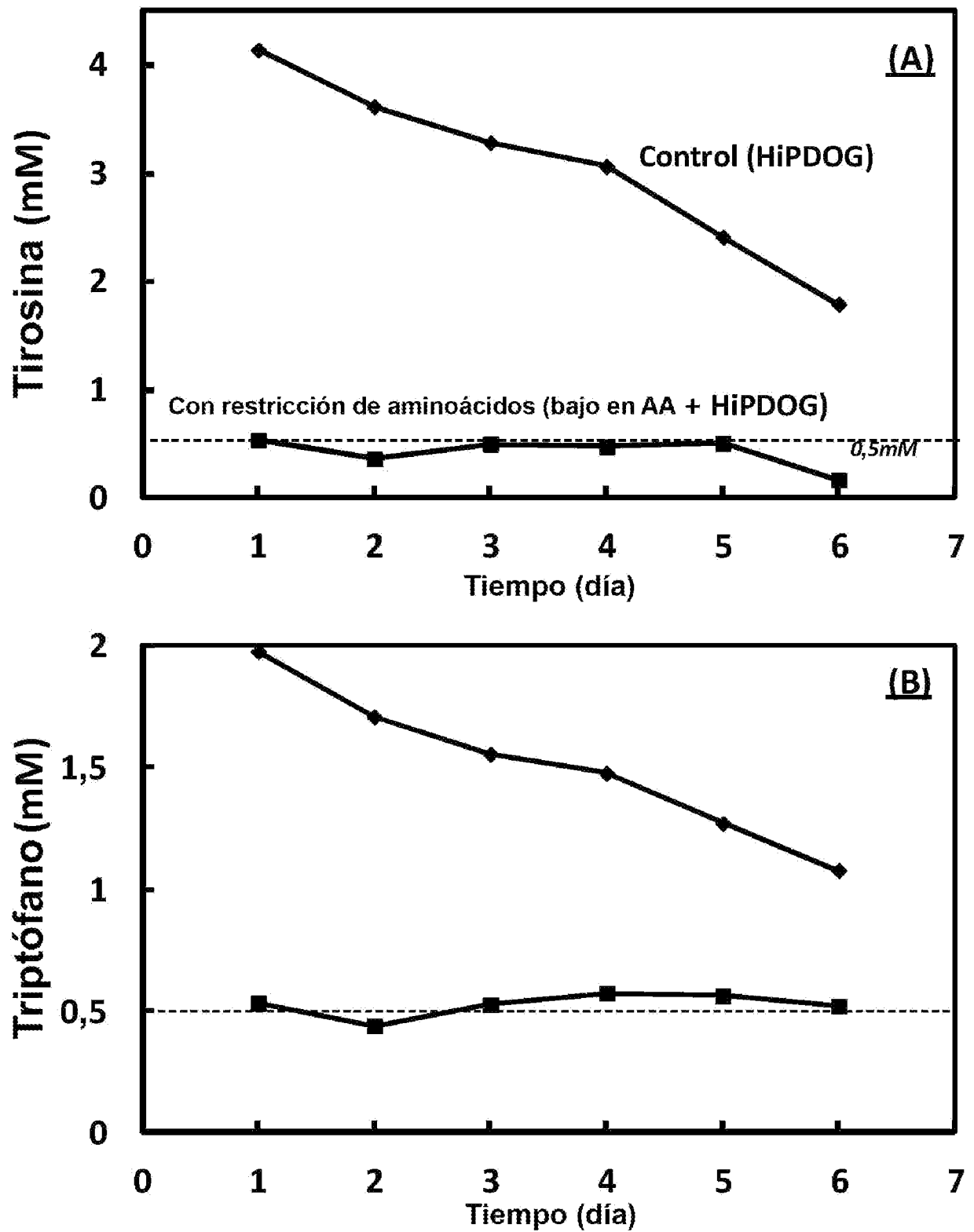


Figura 9A, 9B

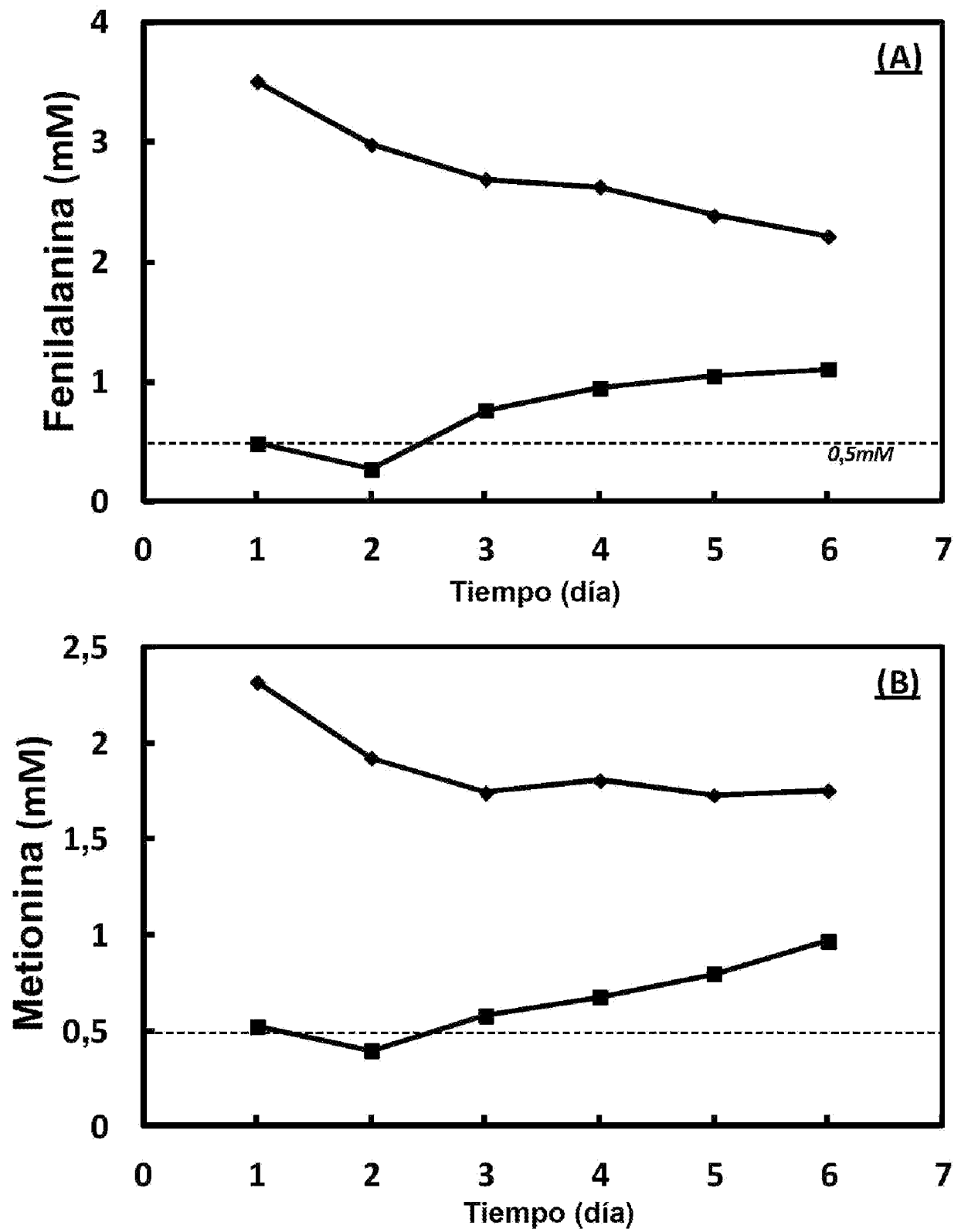


Figura 10A, 10B

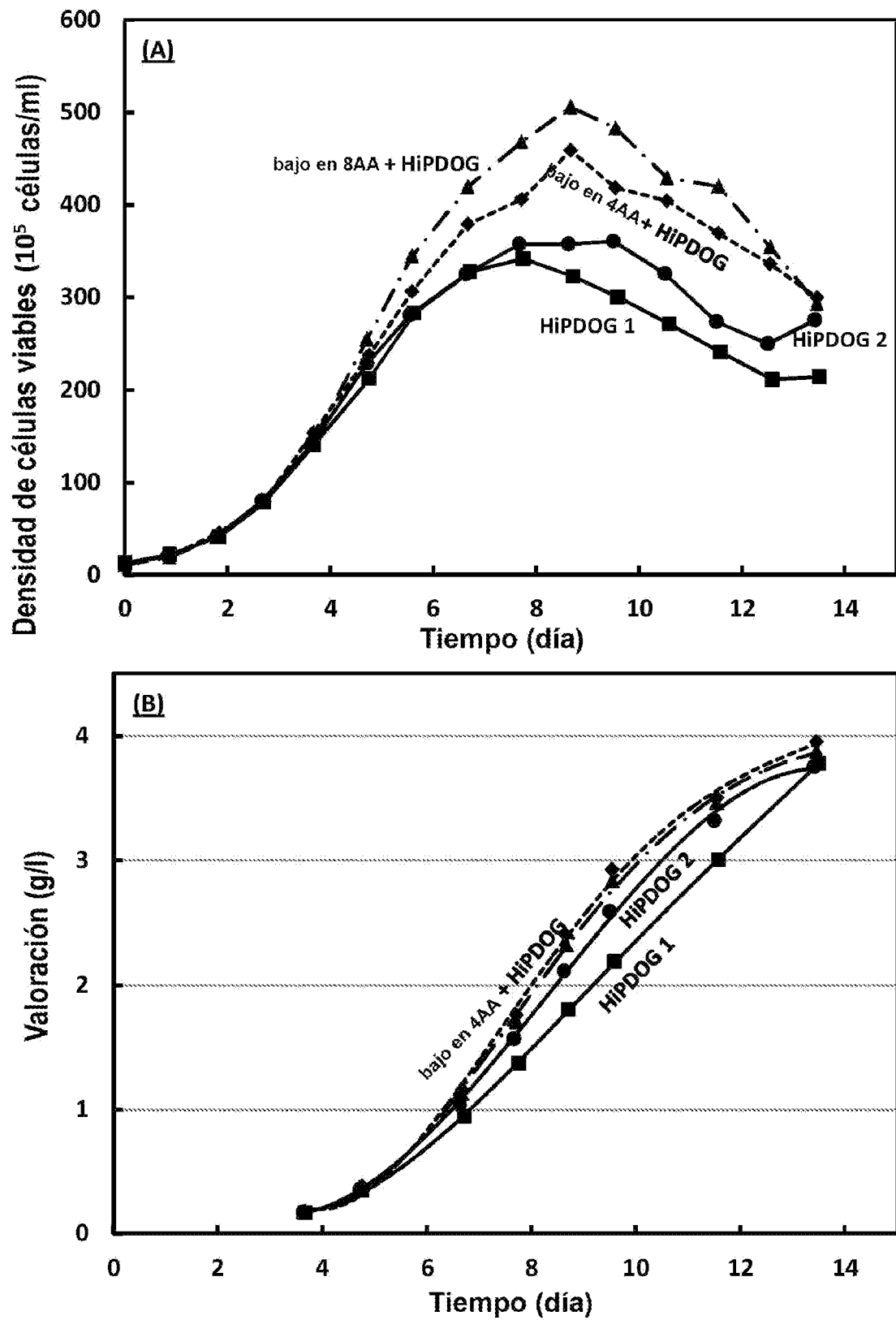




Figura 11A, 11B

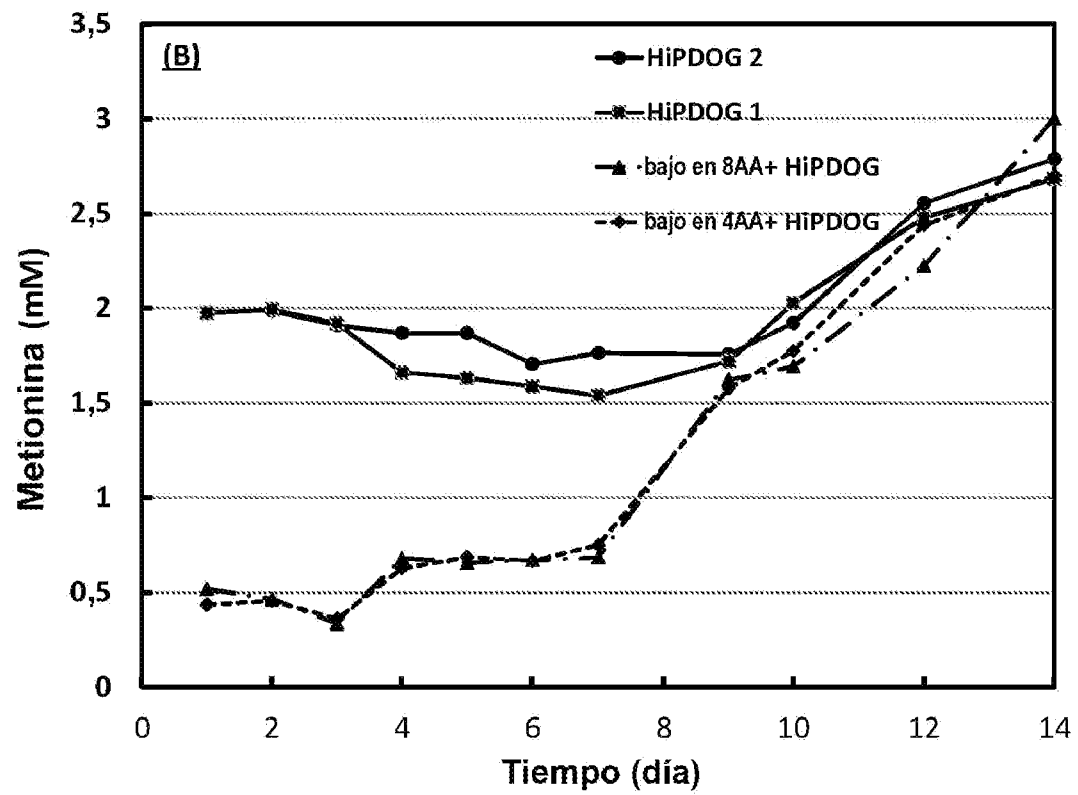
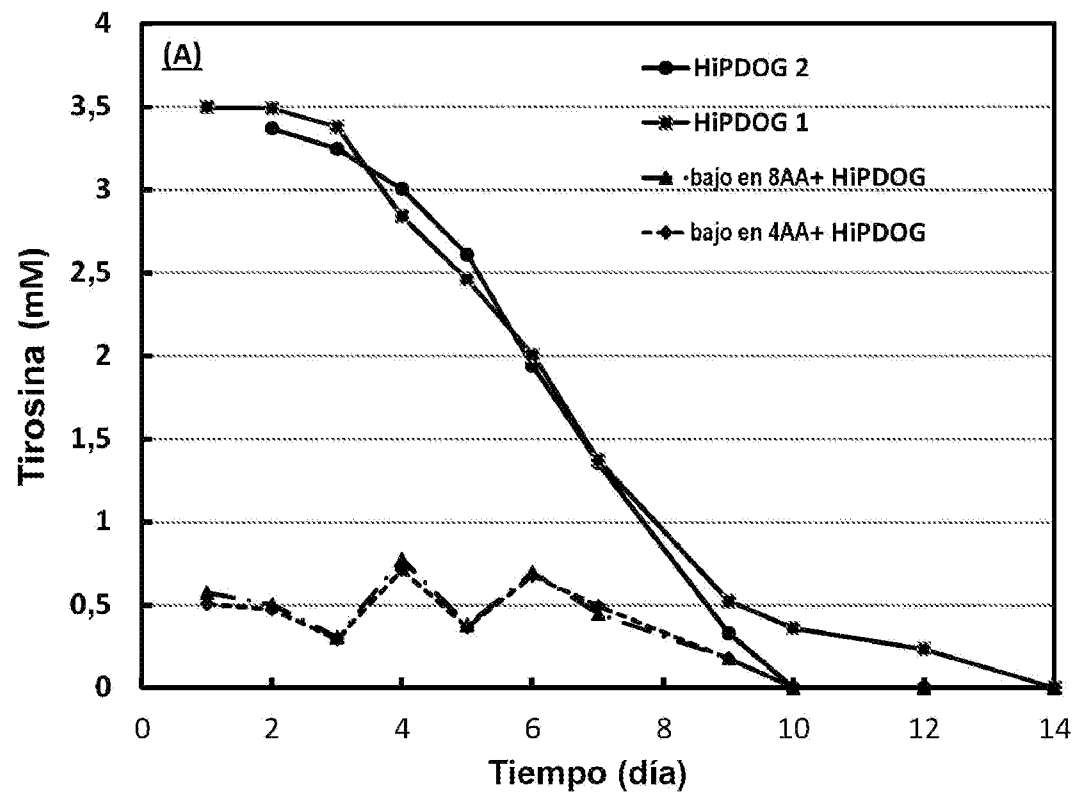


Figura 12A, 12B

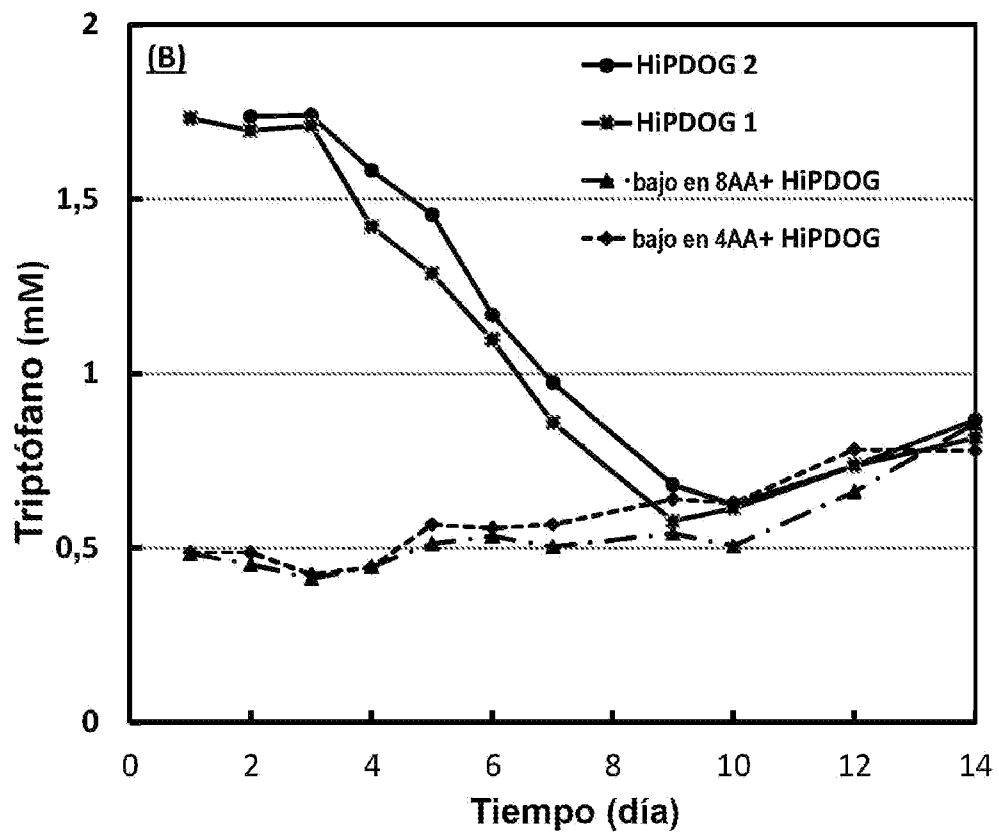
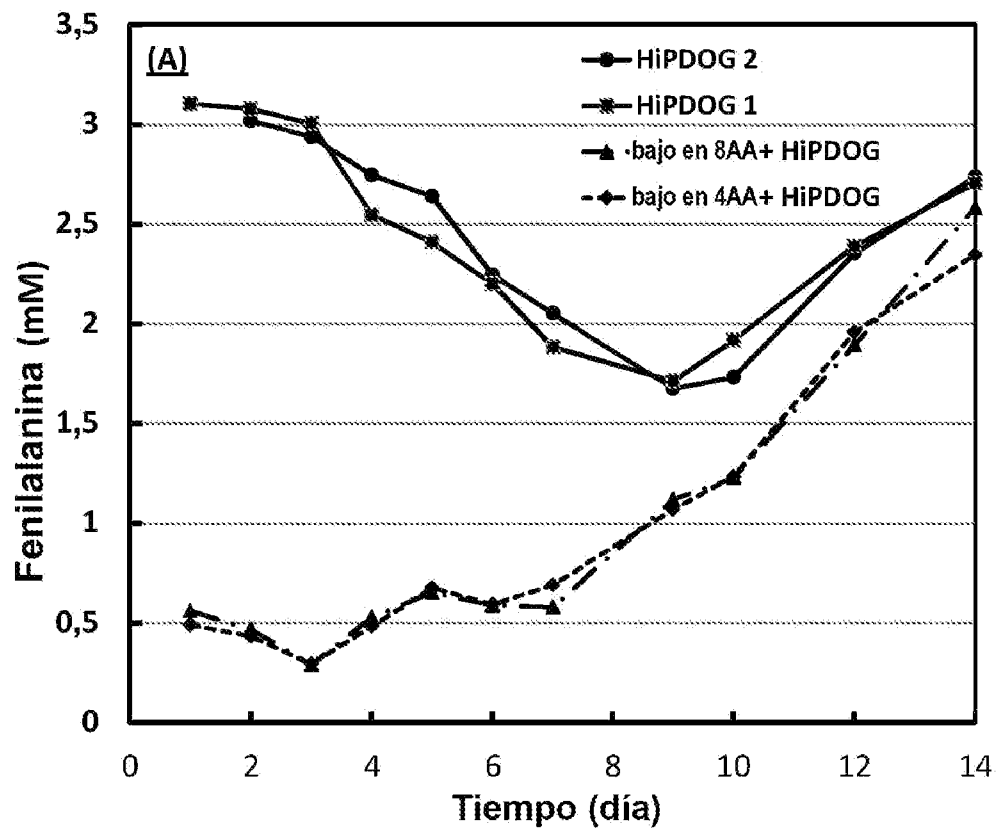


Figura 13A, 13B

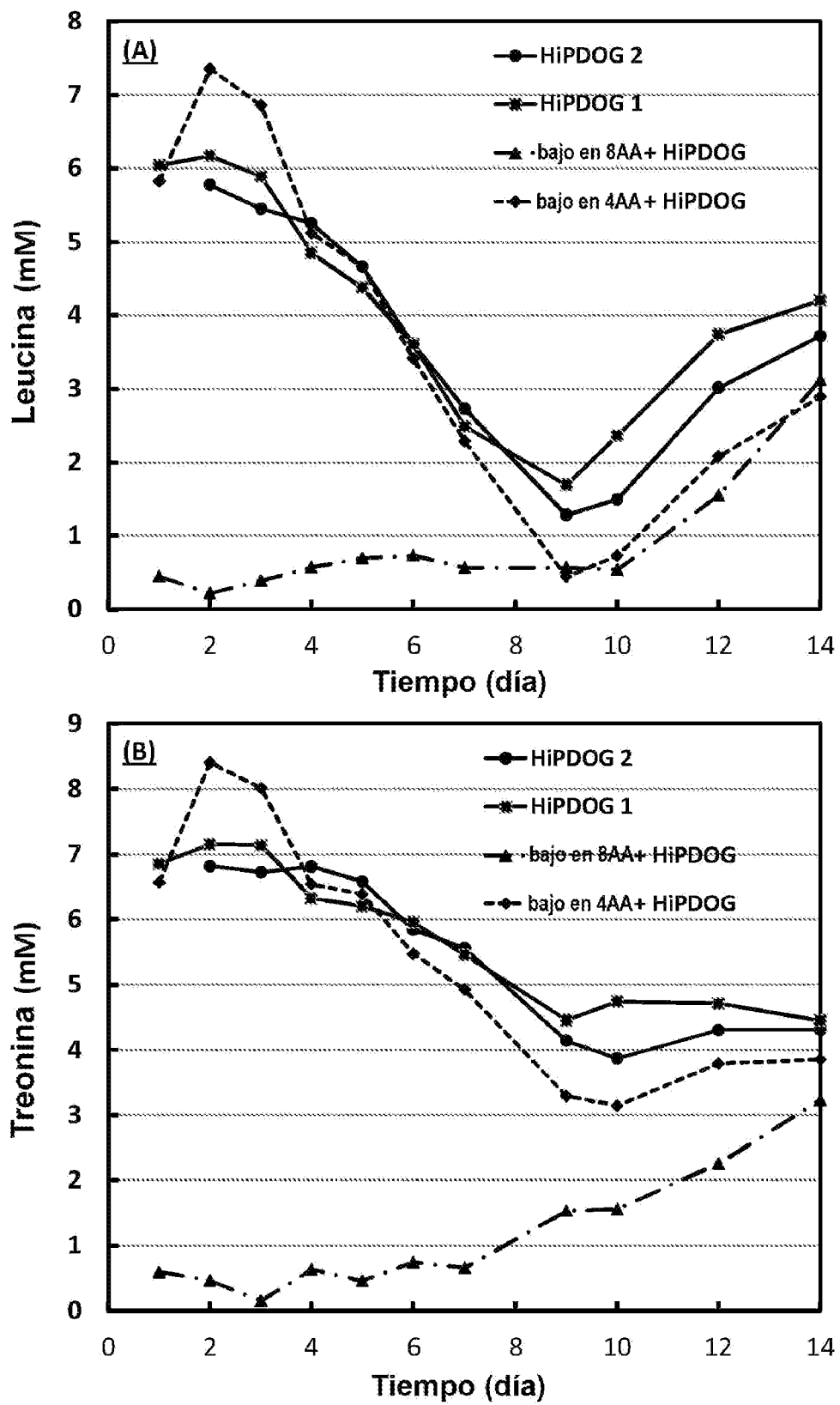


Figura 14A, 14B

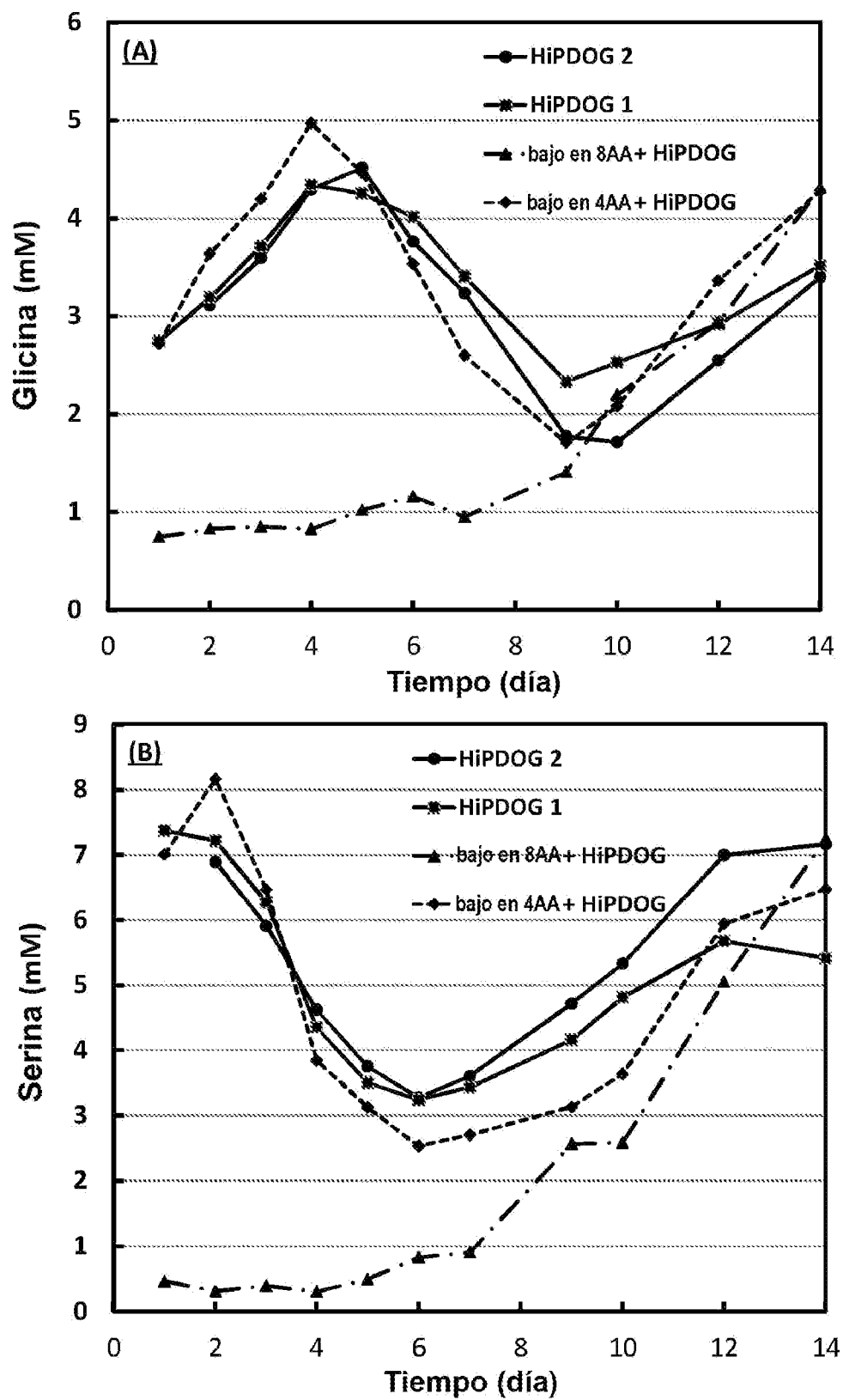


Figura 15A, 15B

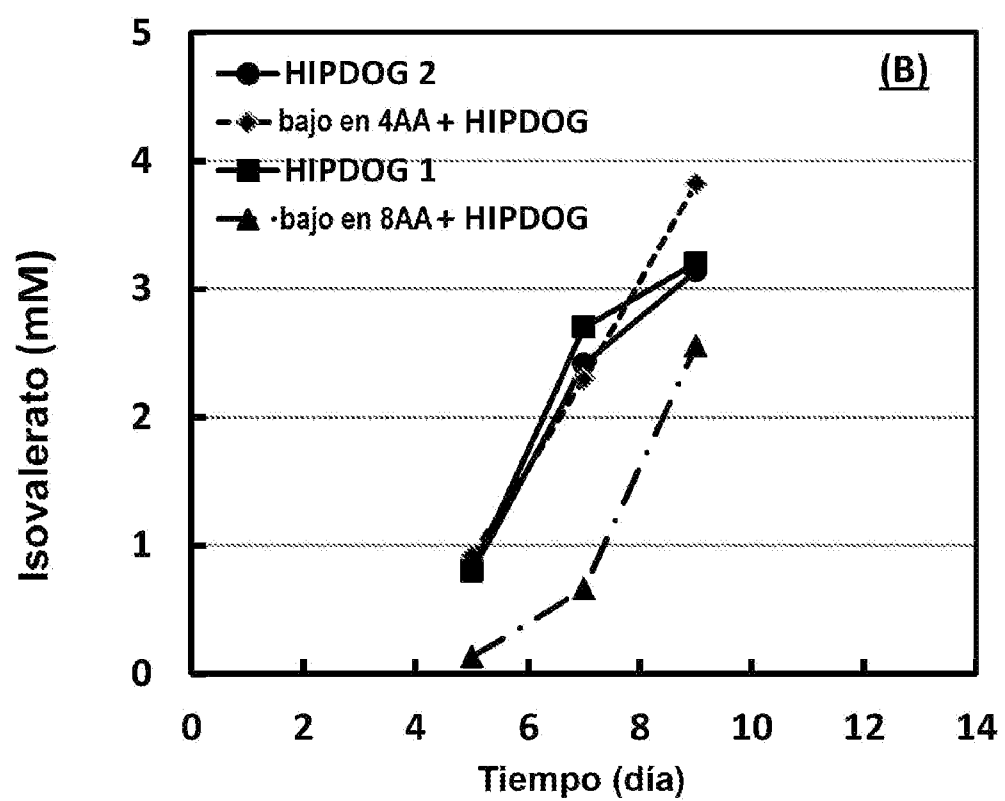
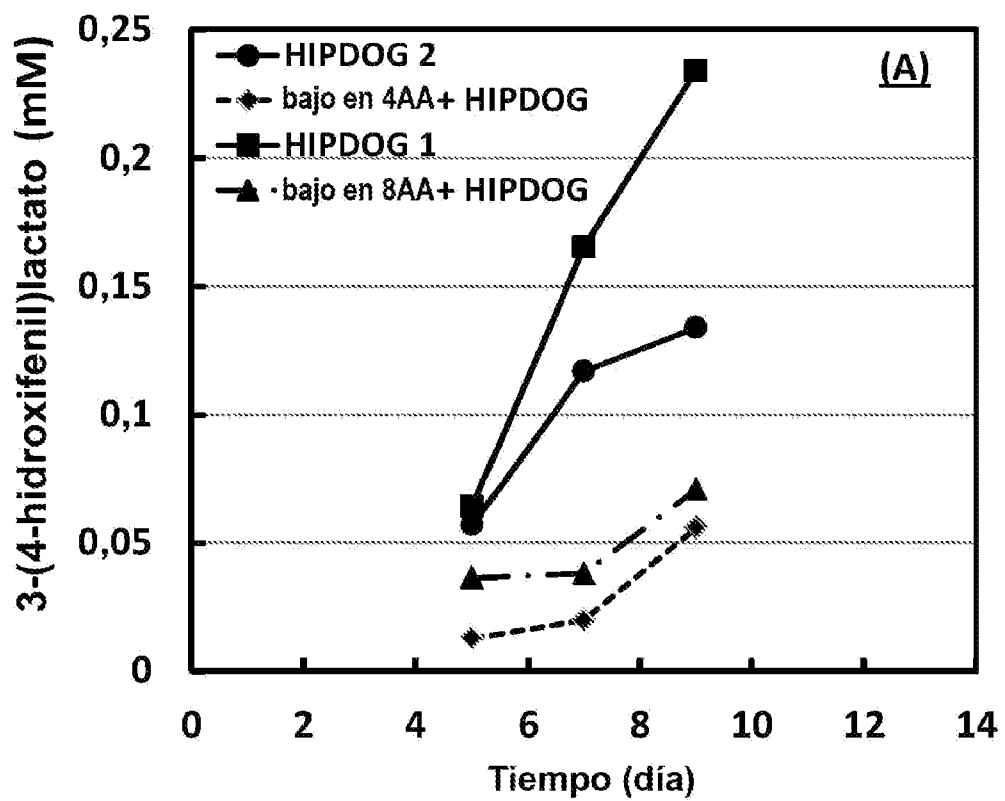


Figura 16

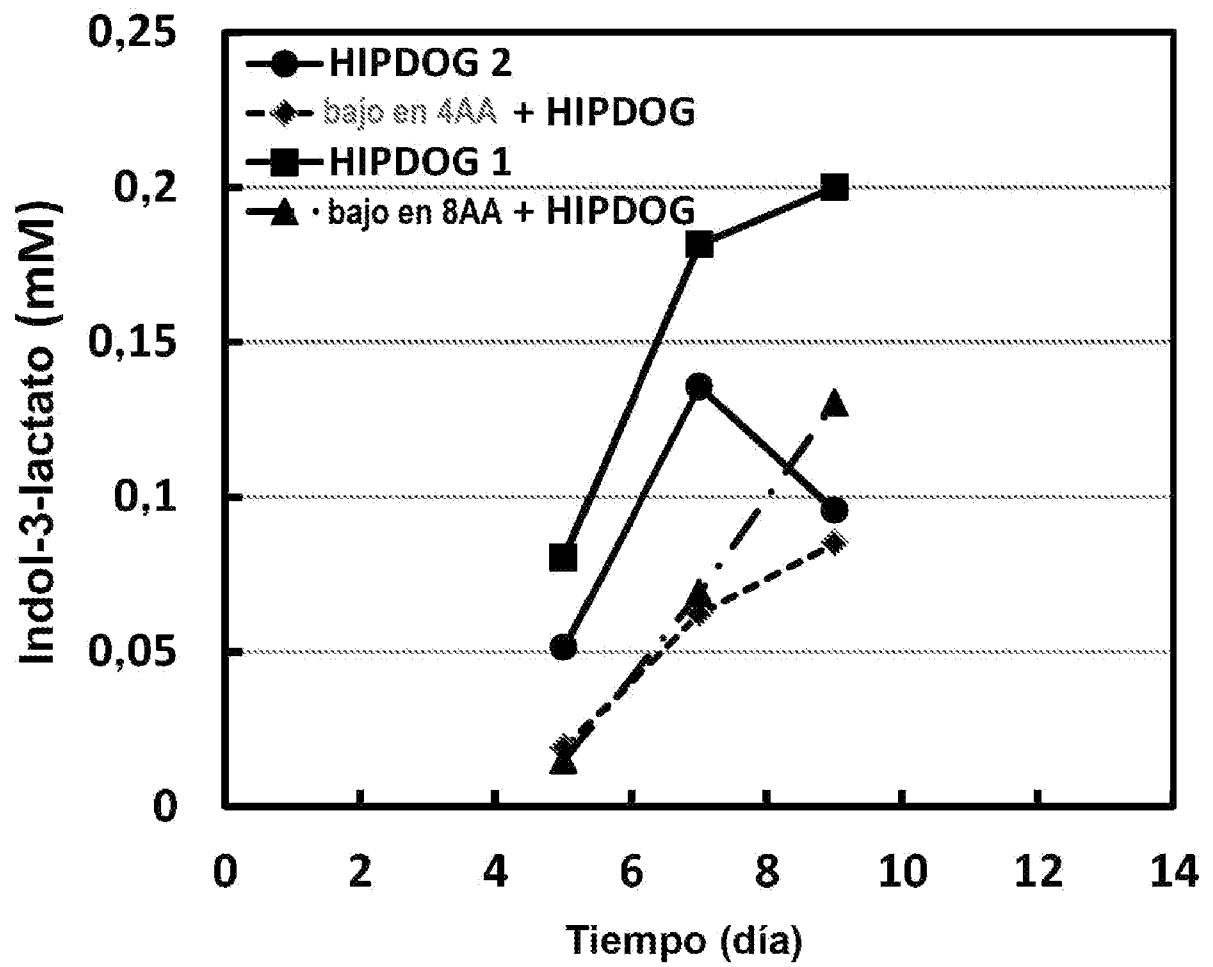


Figura 17A, 17B

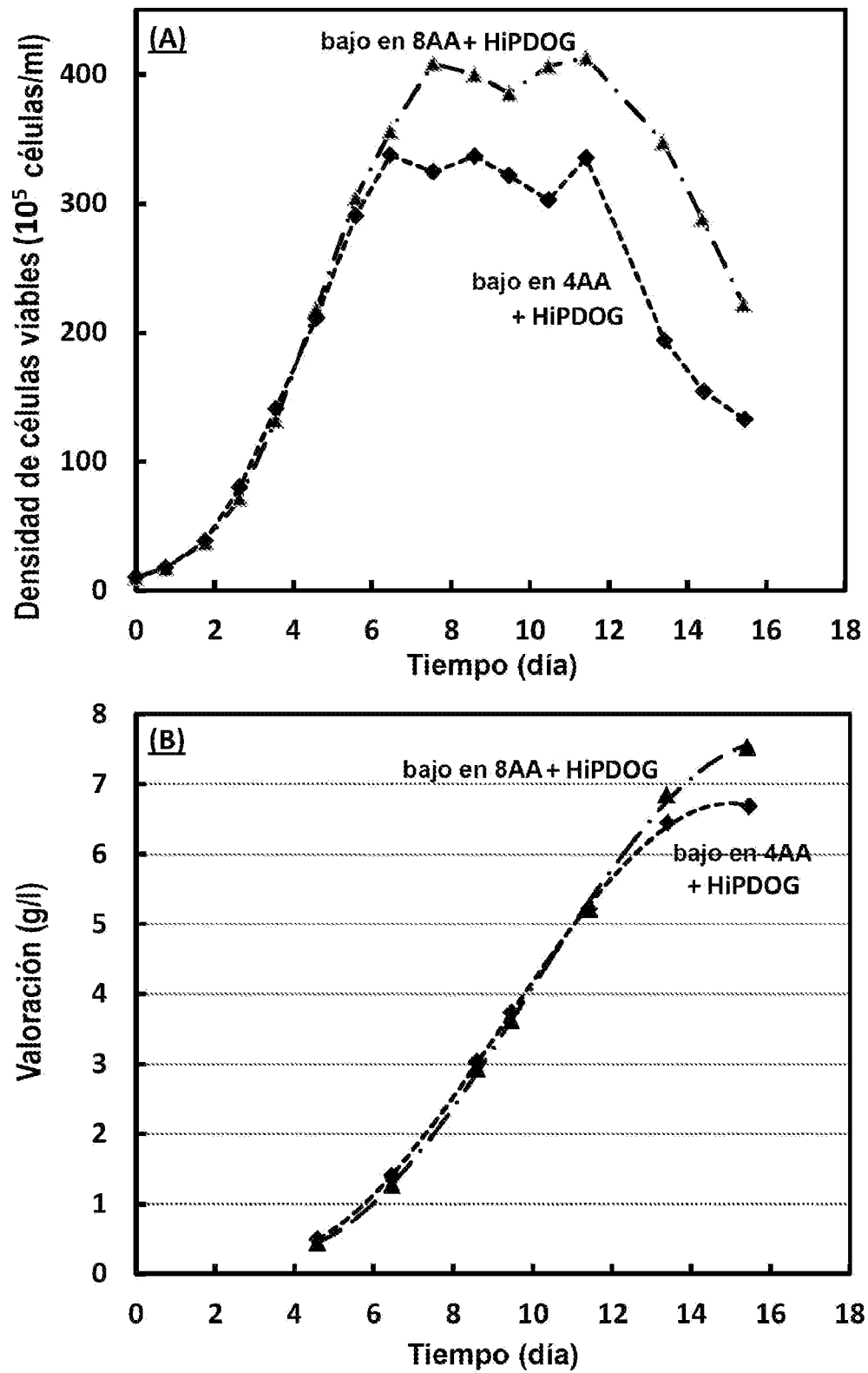


Figura 18A, 18B

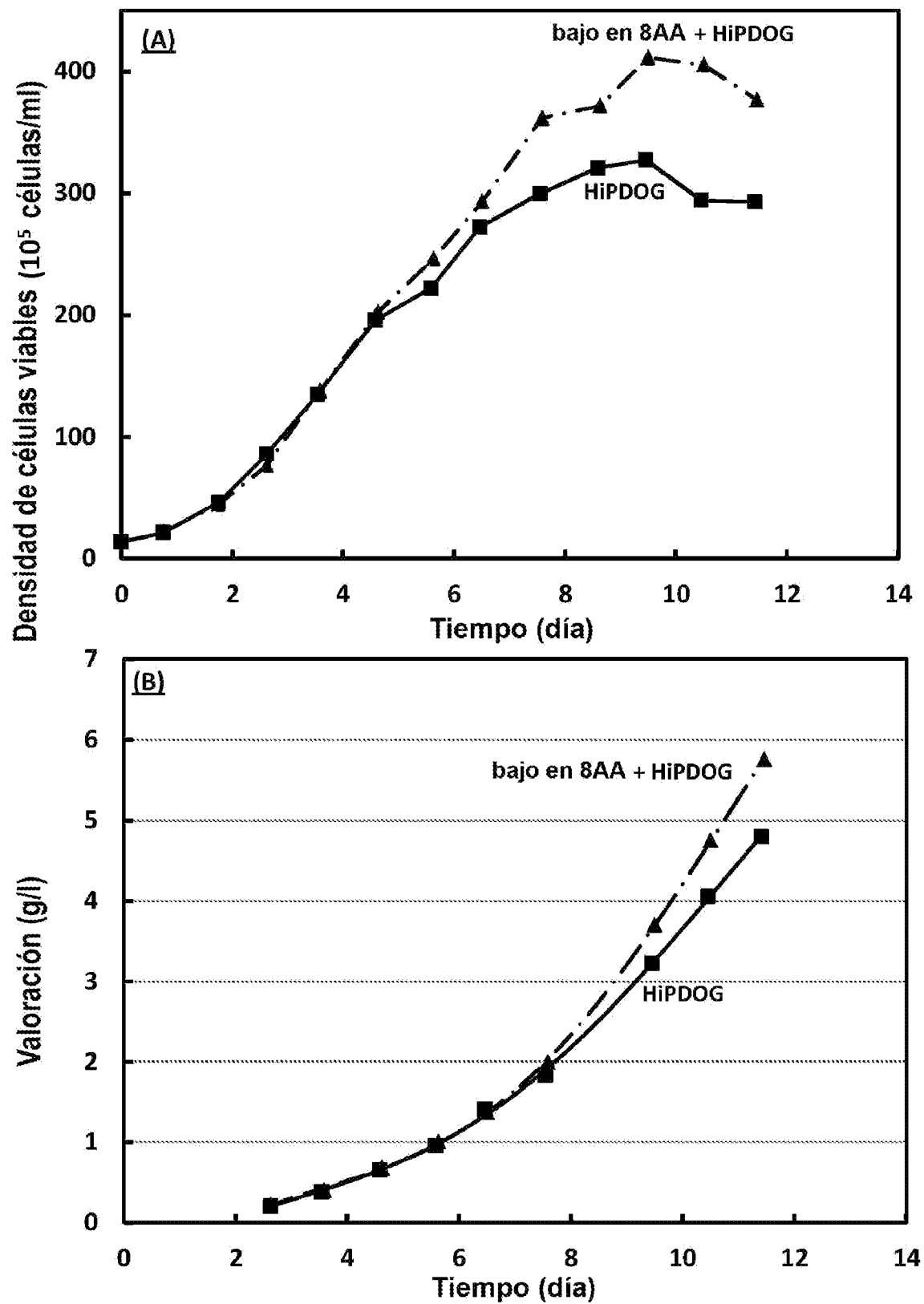




Figura 19A, 19B

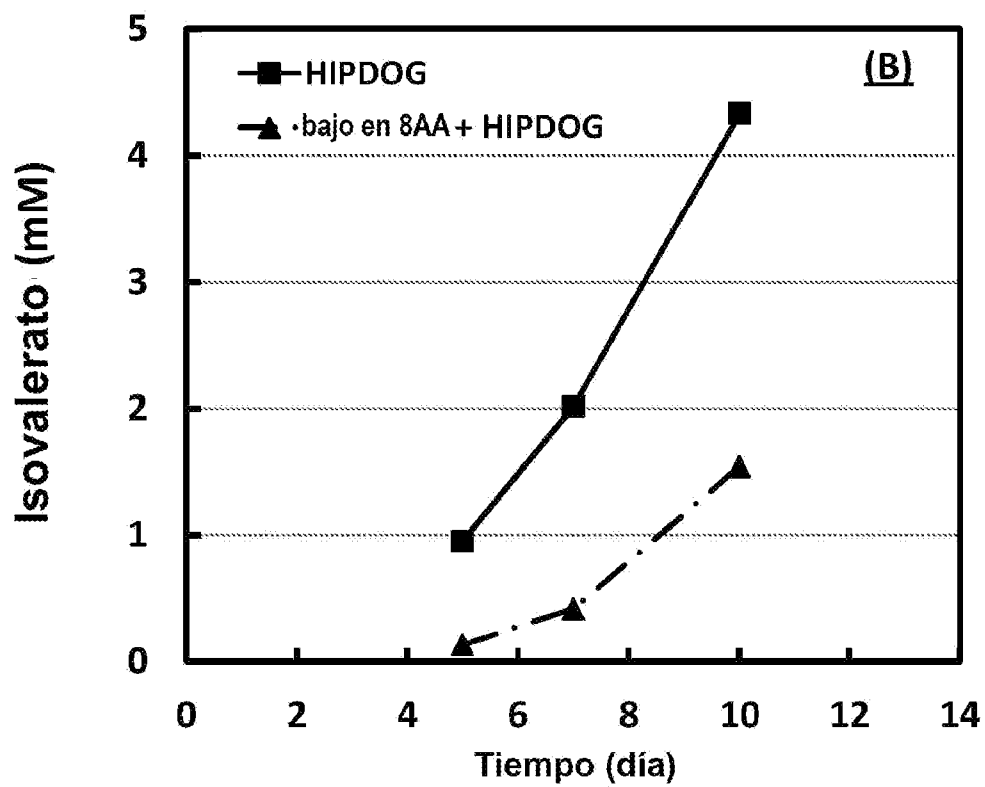
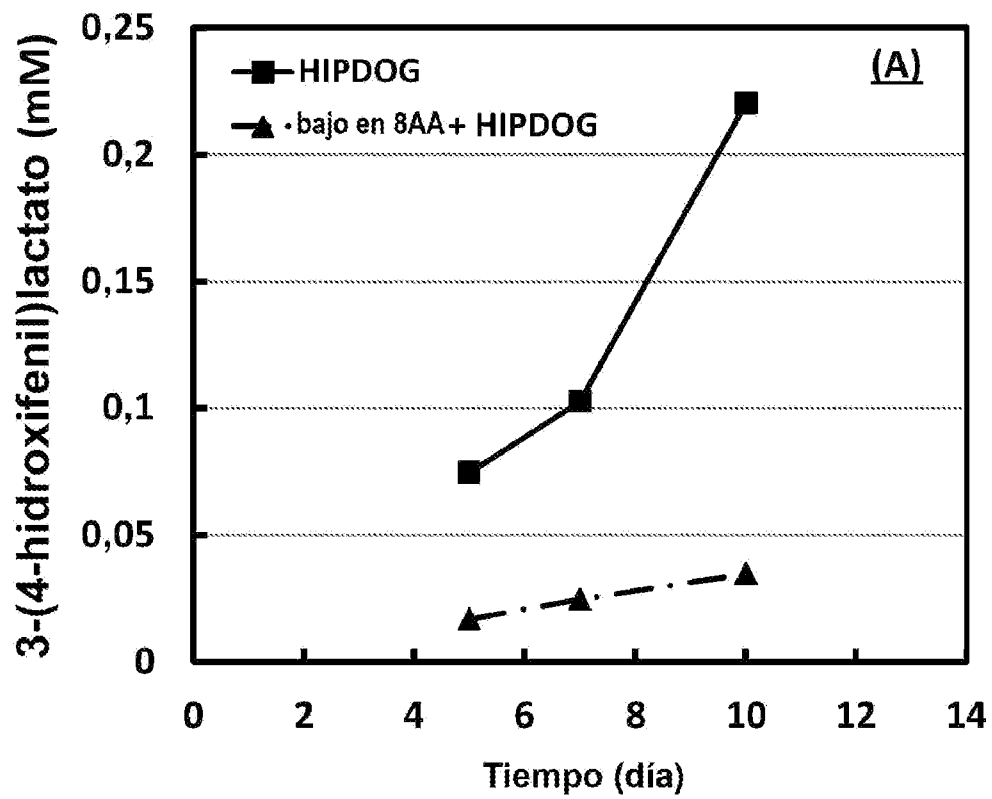


Figura 20

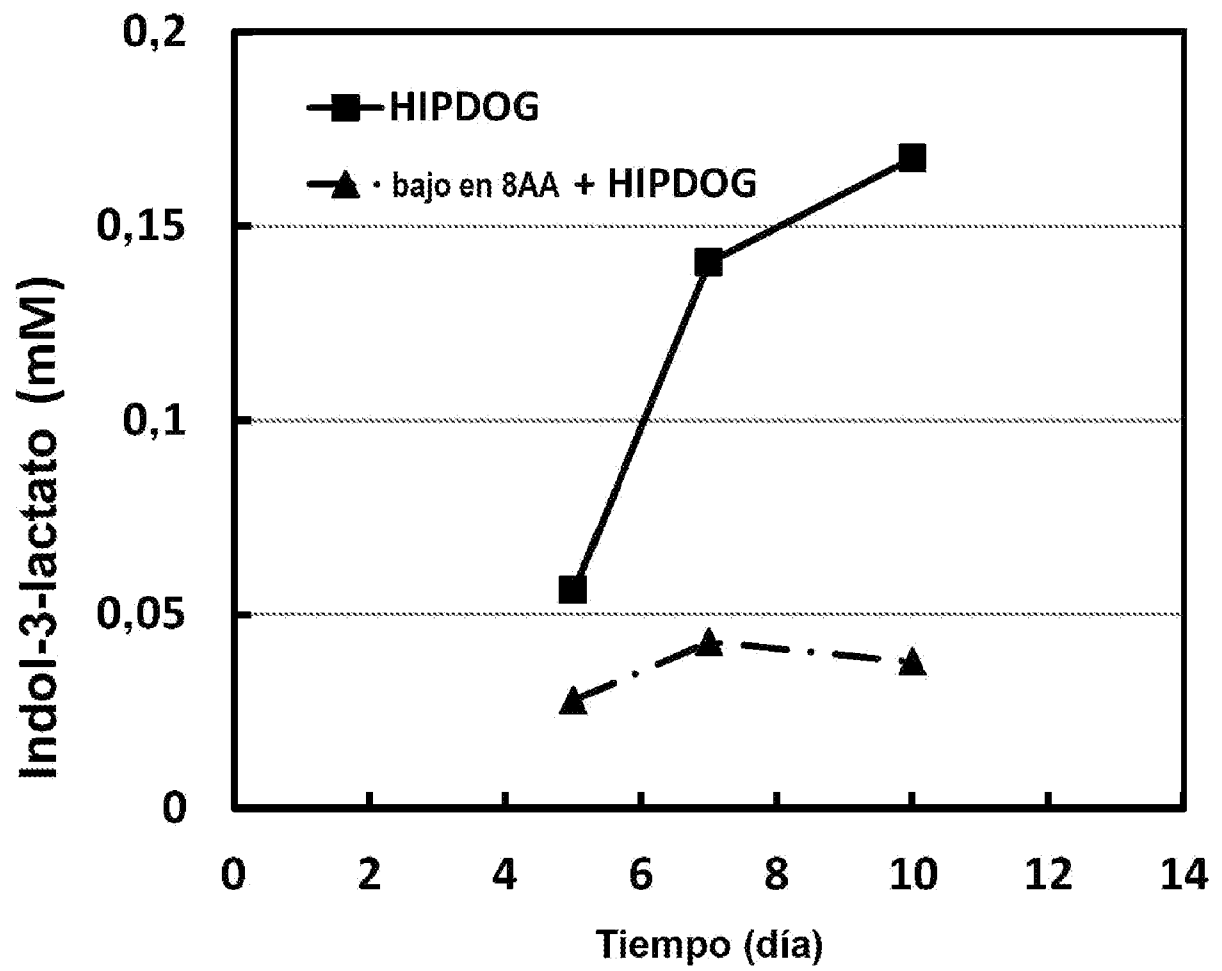


Figura 21A, 21B

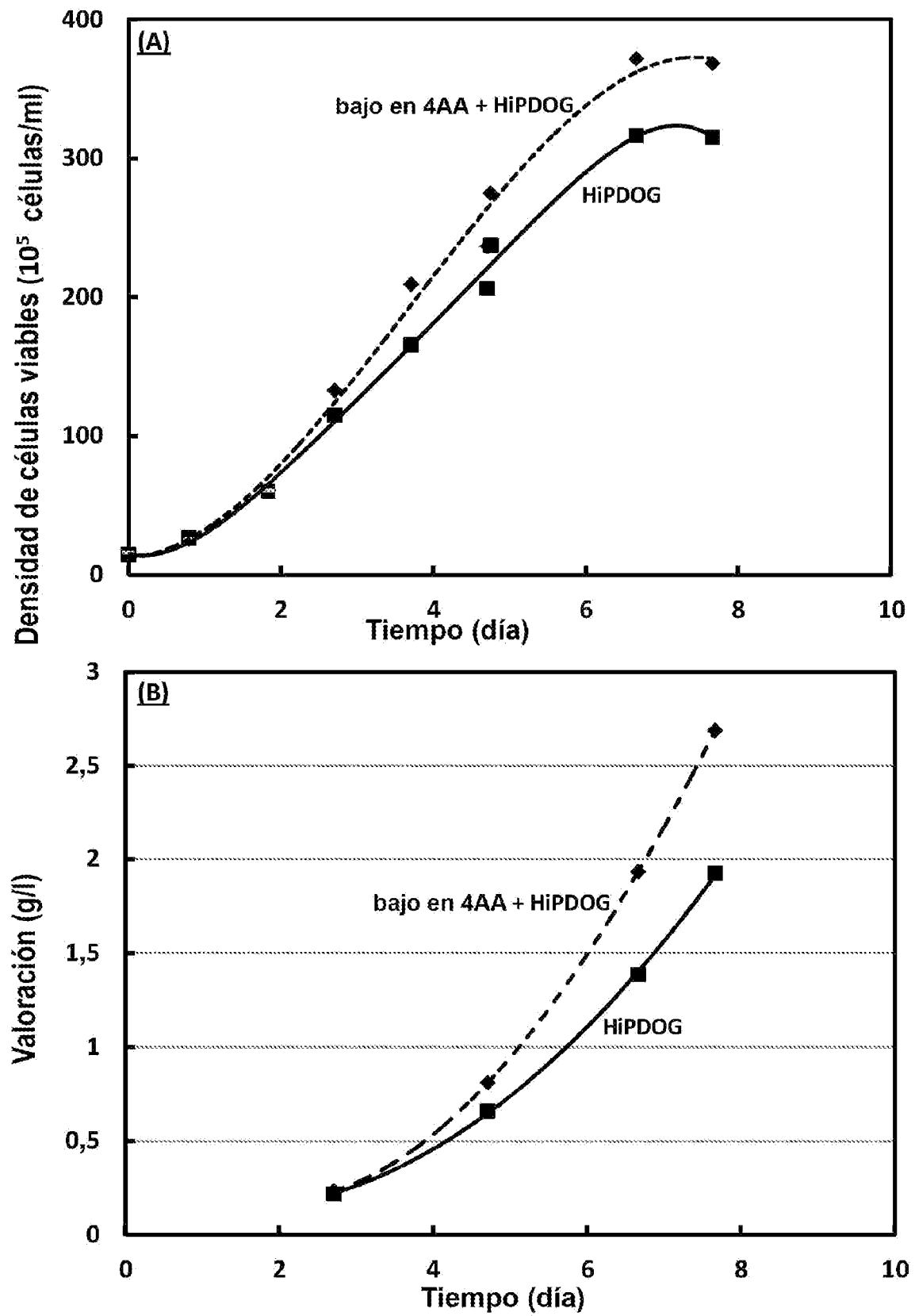


Figura 22A, 22B

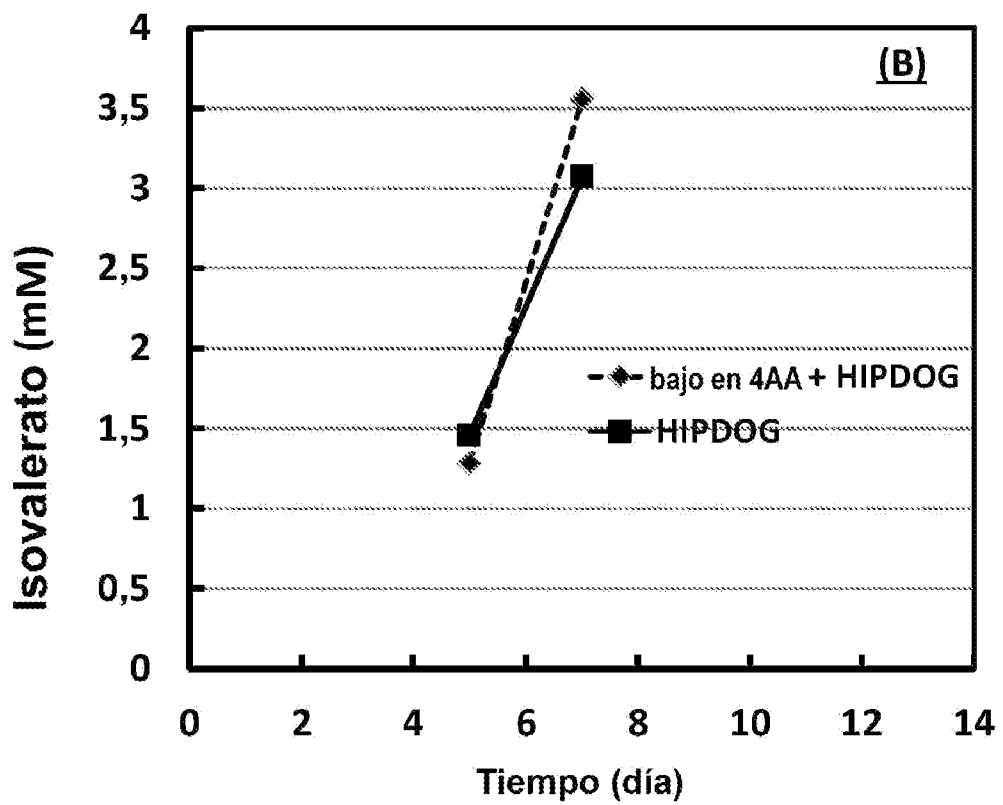
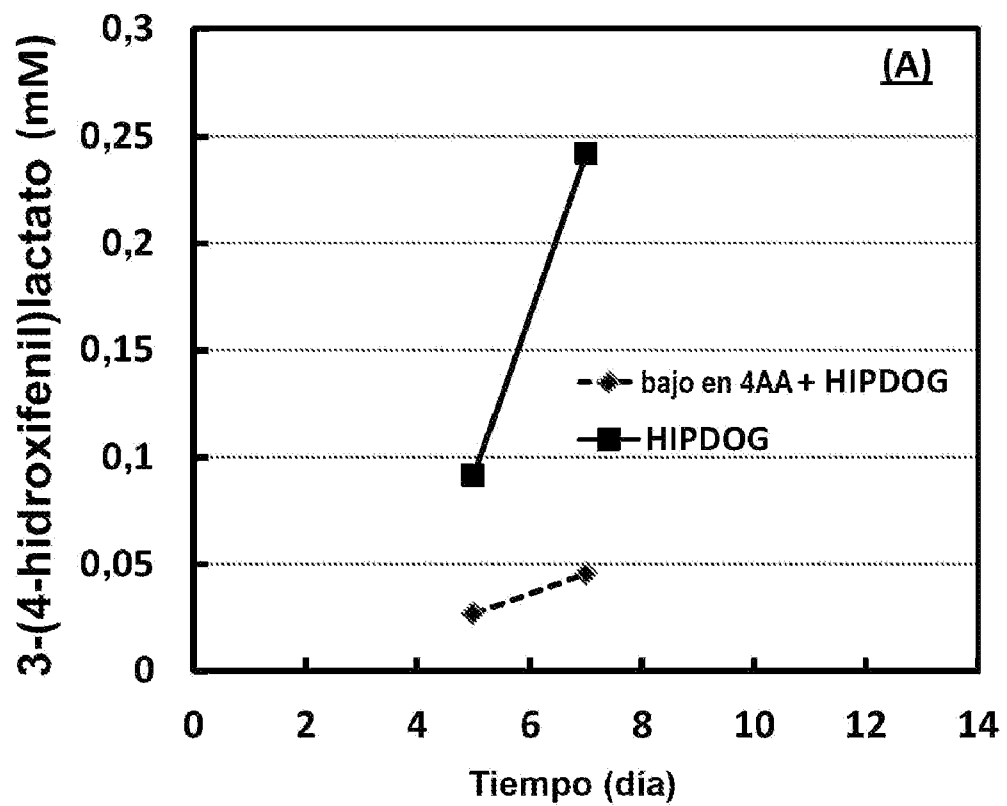


Figura 23

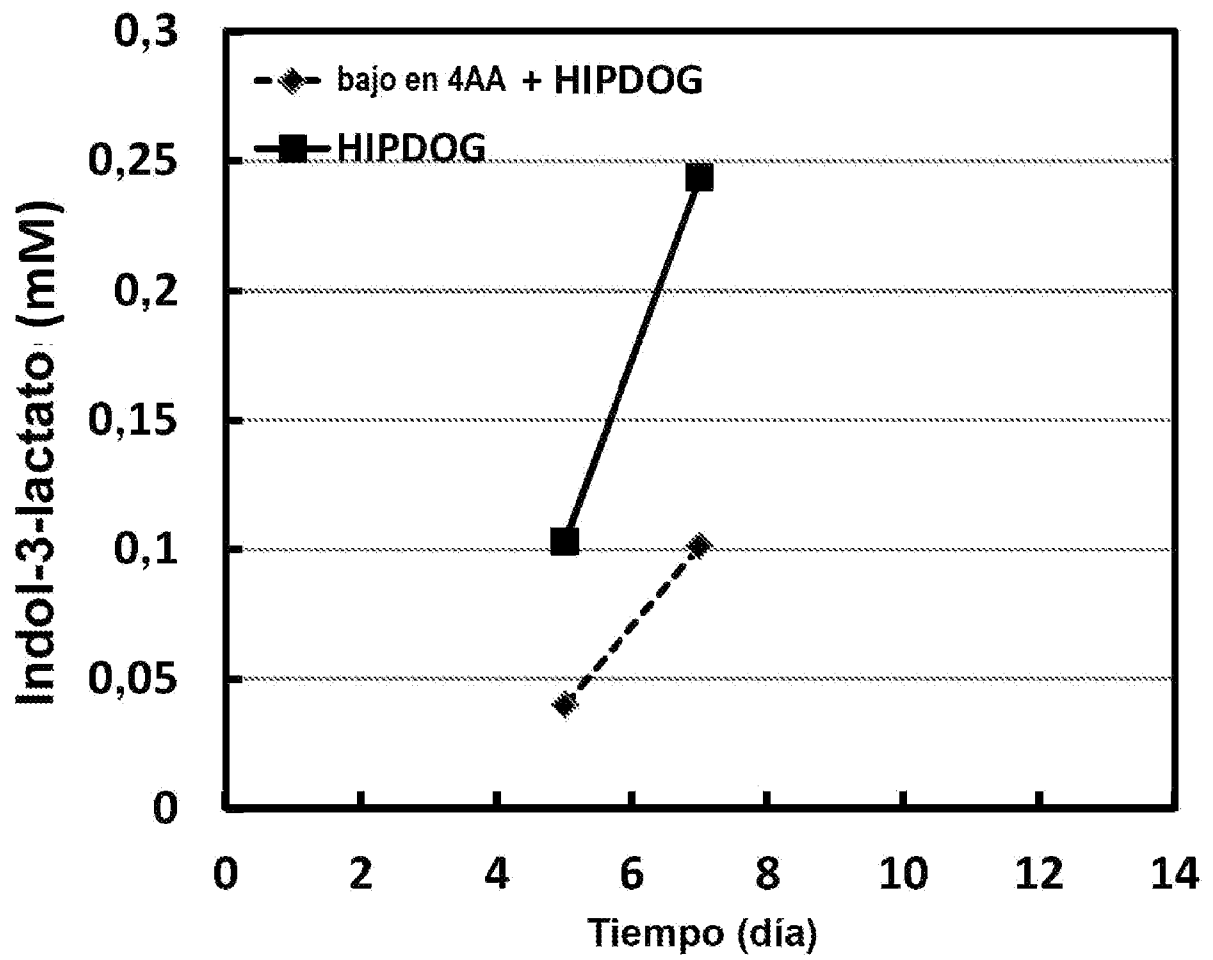
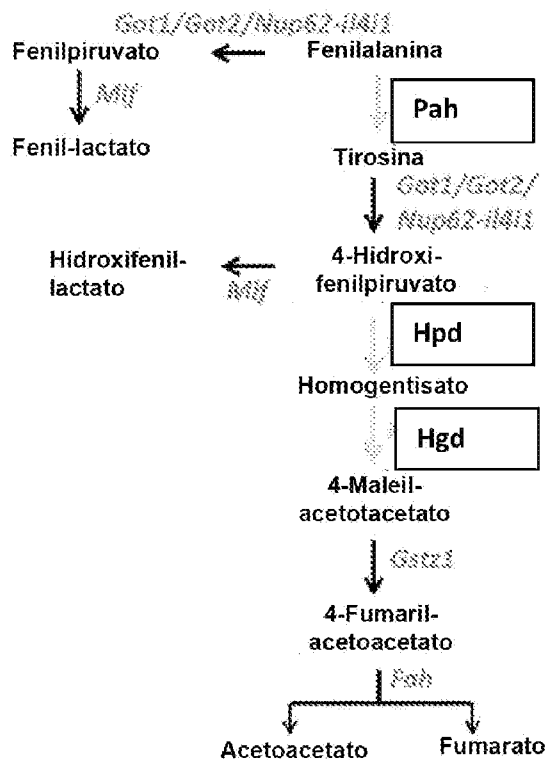


Figura 24



Gen		
	Valor de Ct	$\Delta$ Ct
B-actina (CHO)	15,9	
Slc2a1	21,8	5,9
Mif	16,9	1,0
Got2	17,7	1,8
Dld	19,2	3,3
Got1	21,0	5,1
Fah	24,3	8,4
Gstz1	24,6	8,7
Pah	27,7	11,8
Hgd	35,3	19,4
Hpd	37,0	21,1

La sobreexpresión de **Pah**, **Hpd** y **Hgd** puede desviar potencialmente el flujo de la producción de inhibidores

Figura 25

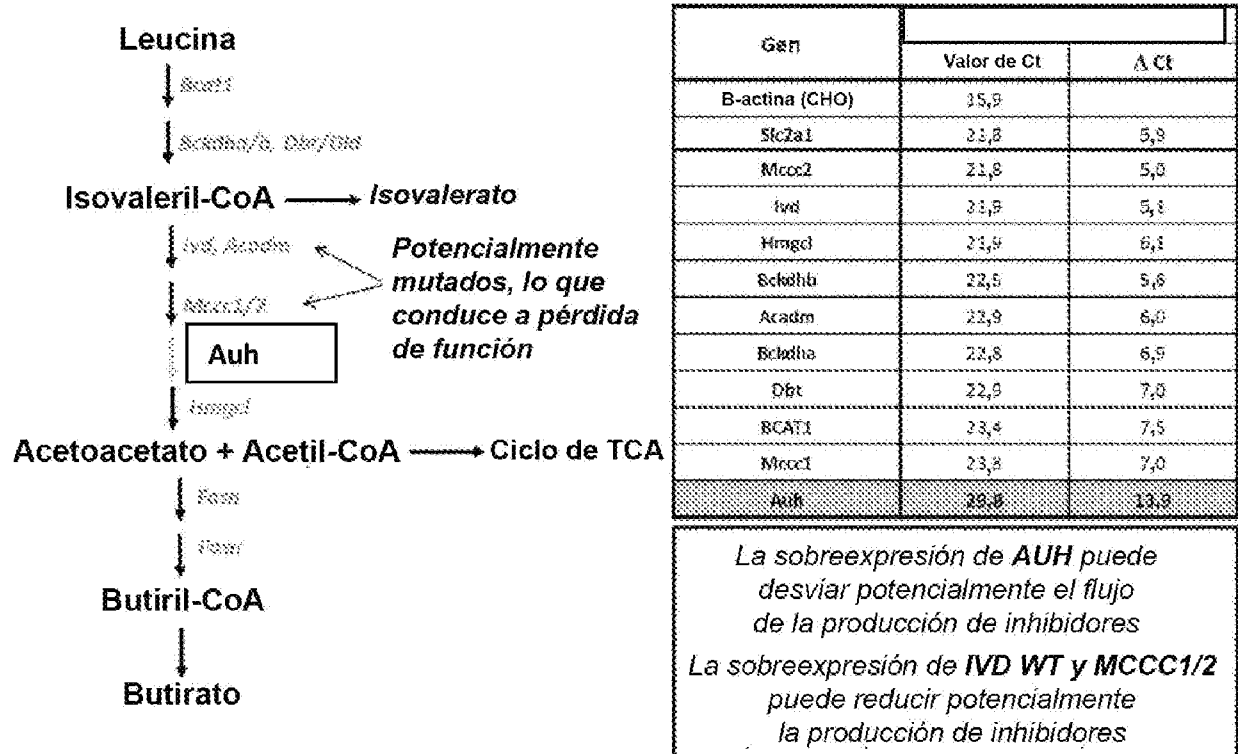


Figura 26

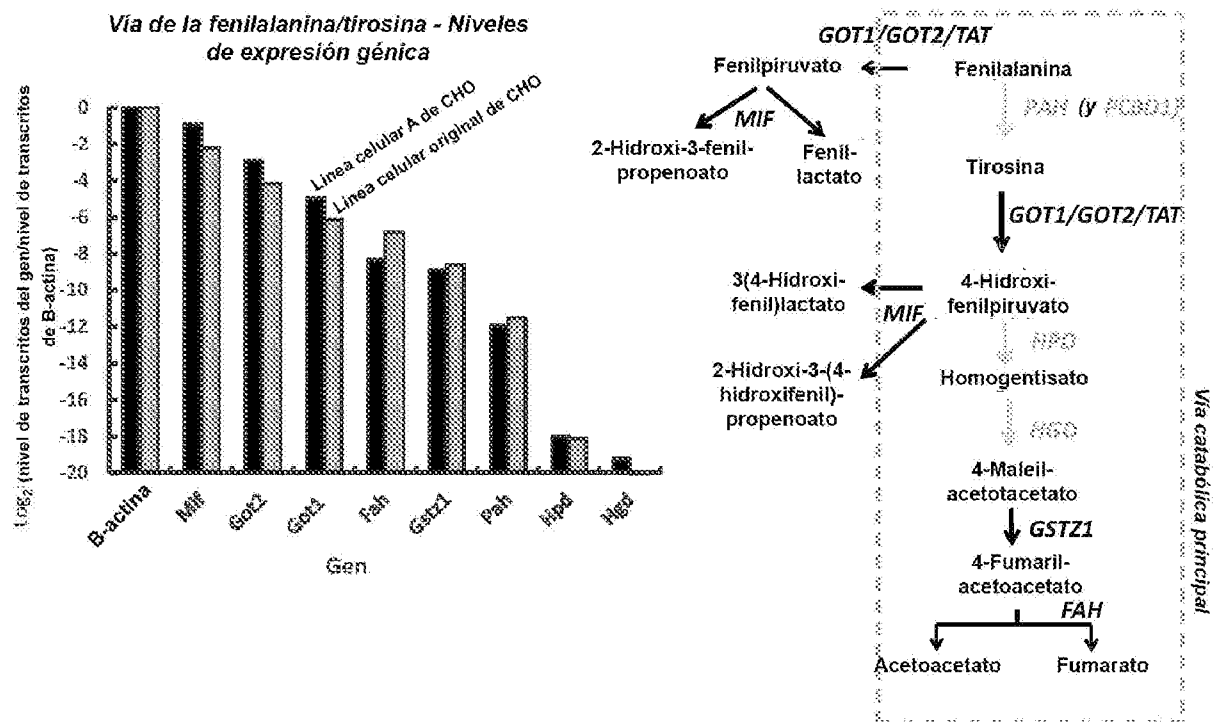
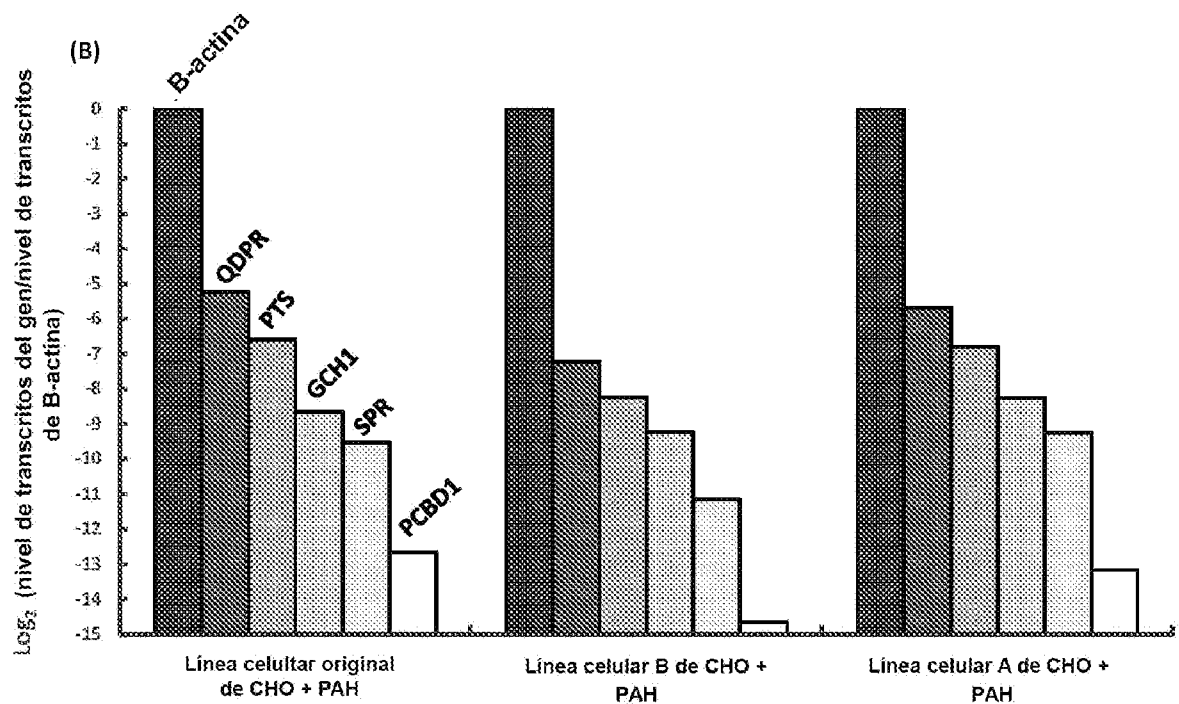
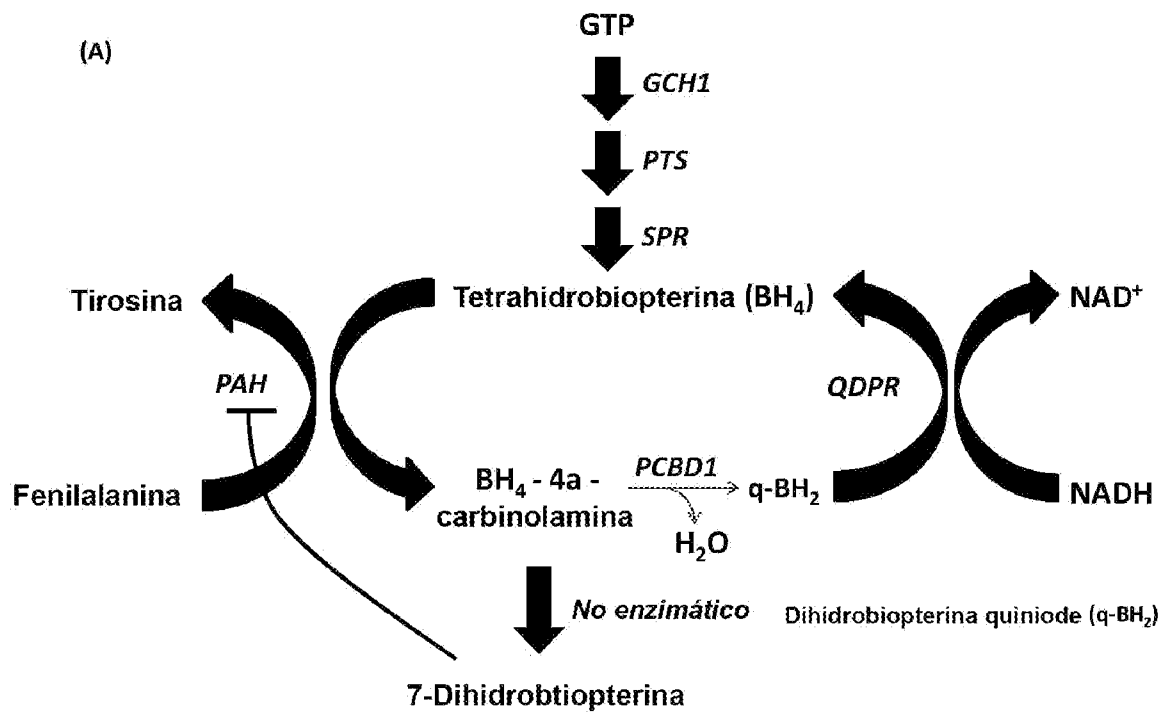




Figura 27A, 27B



**Figura 28A y 28B**

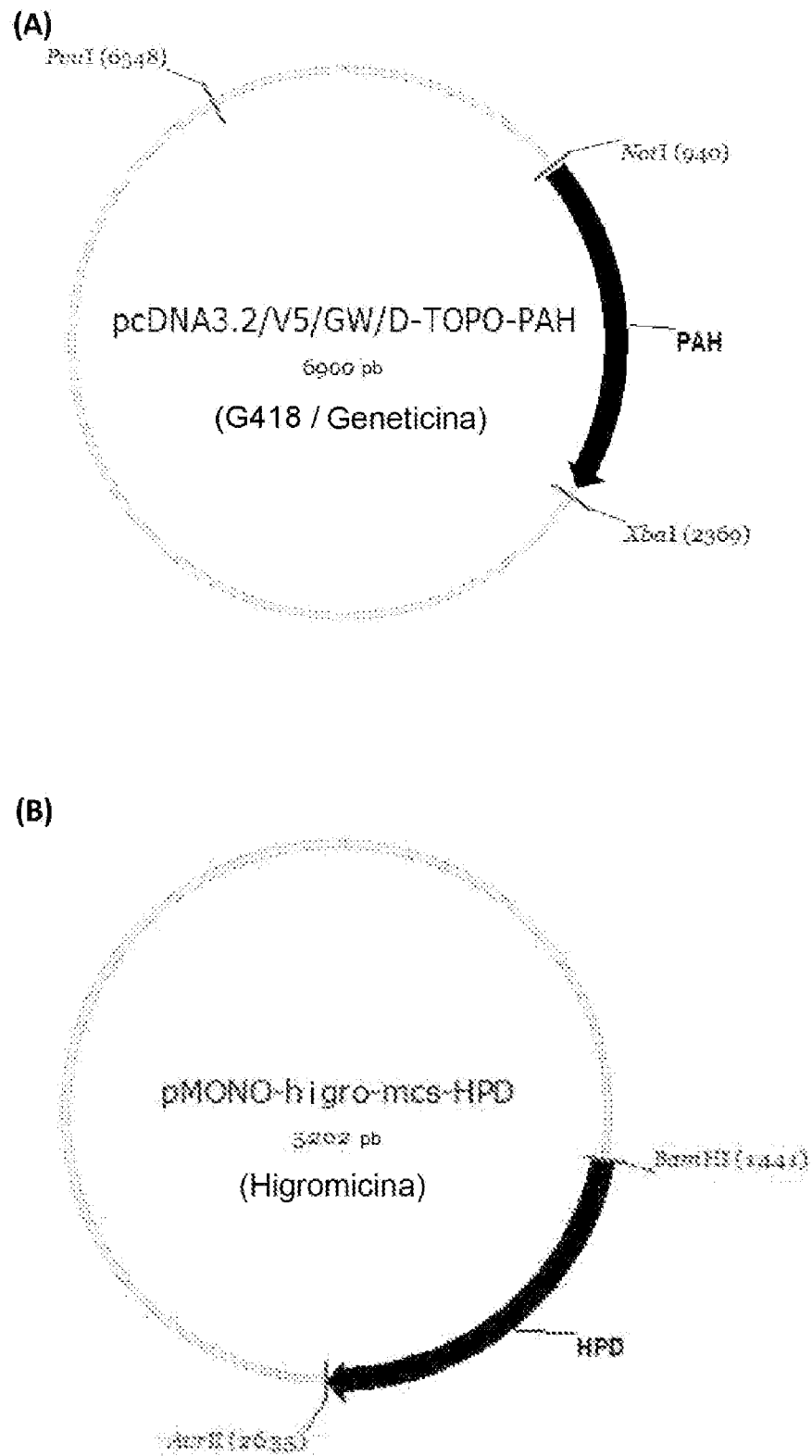
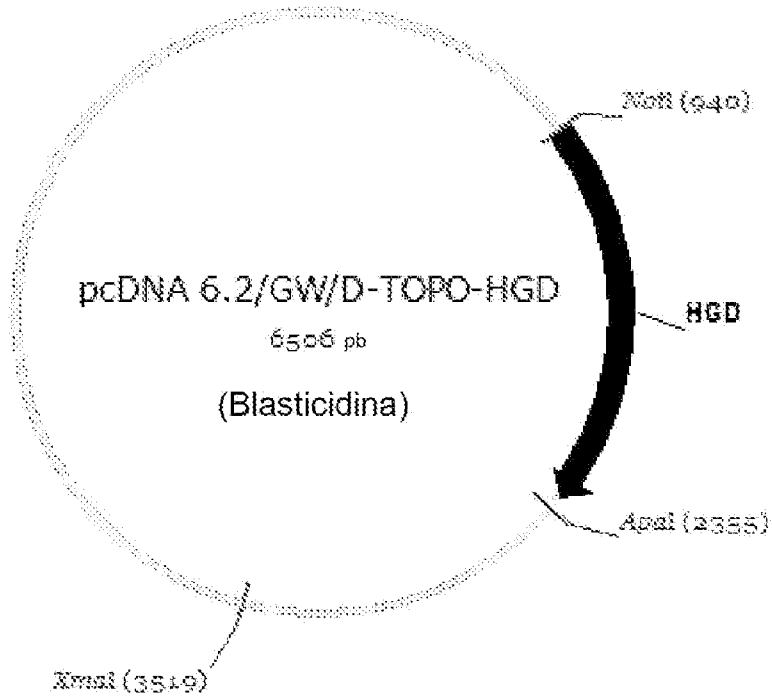


Figura 28C y 28D

(C)



(D)

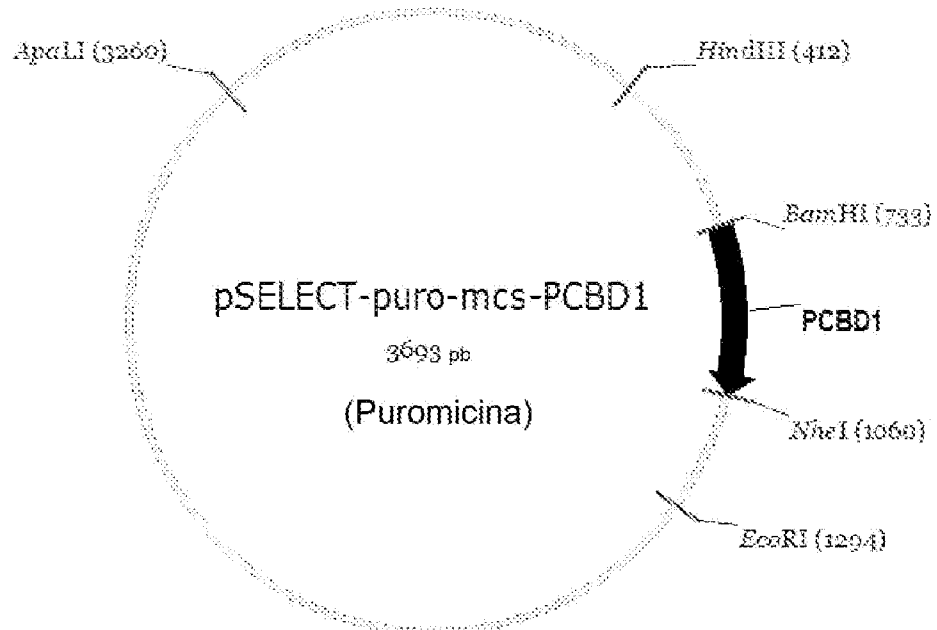


Figura 29A, 29B

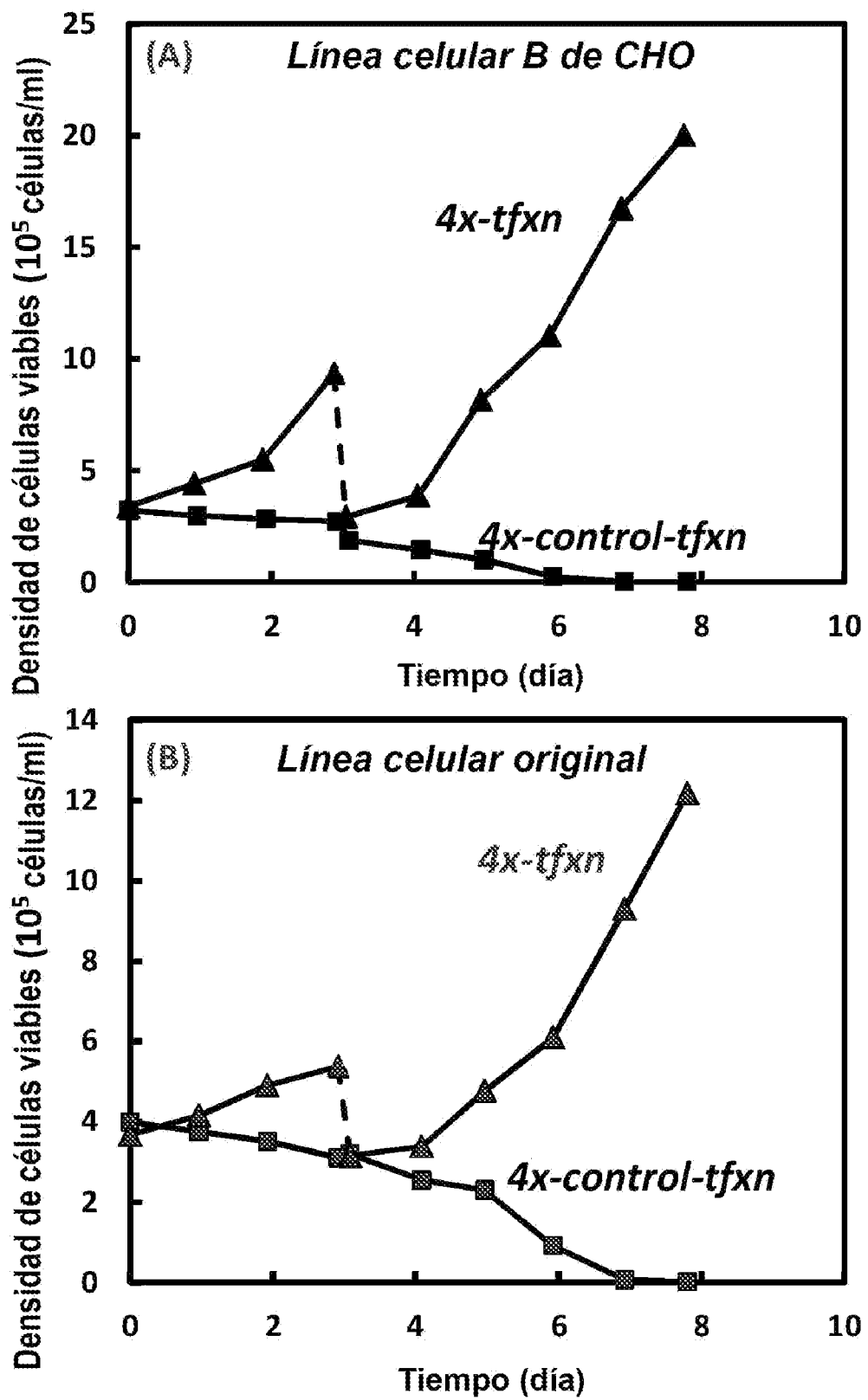


Figura 30A y 30B

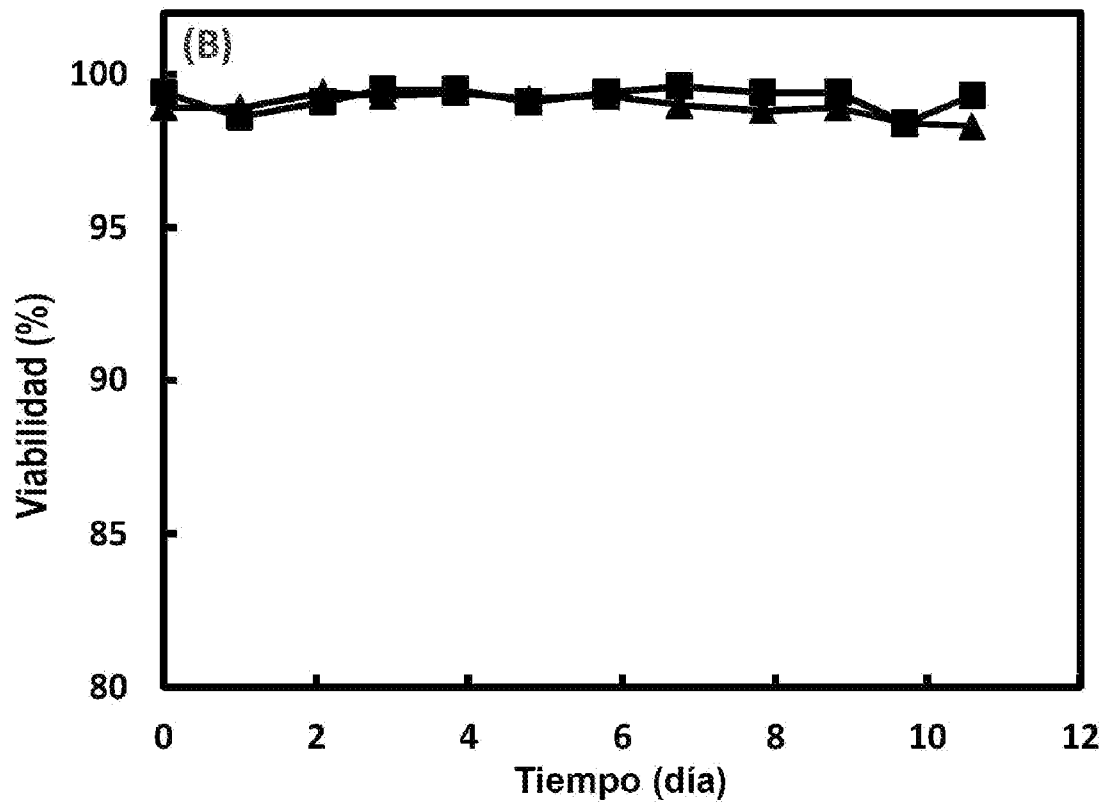
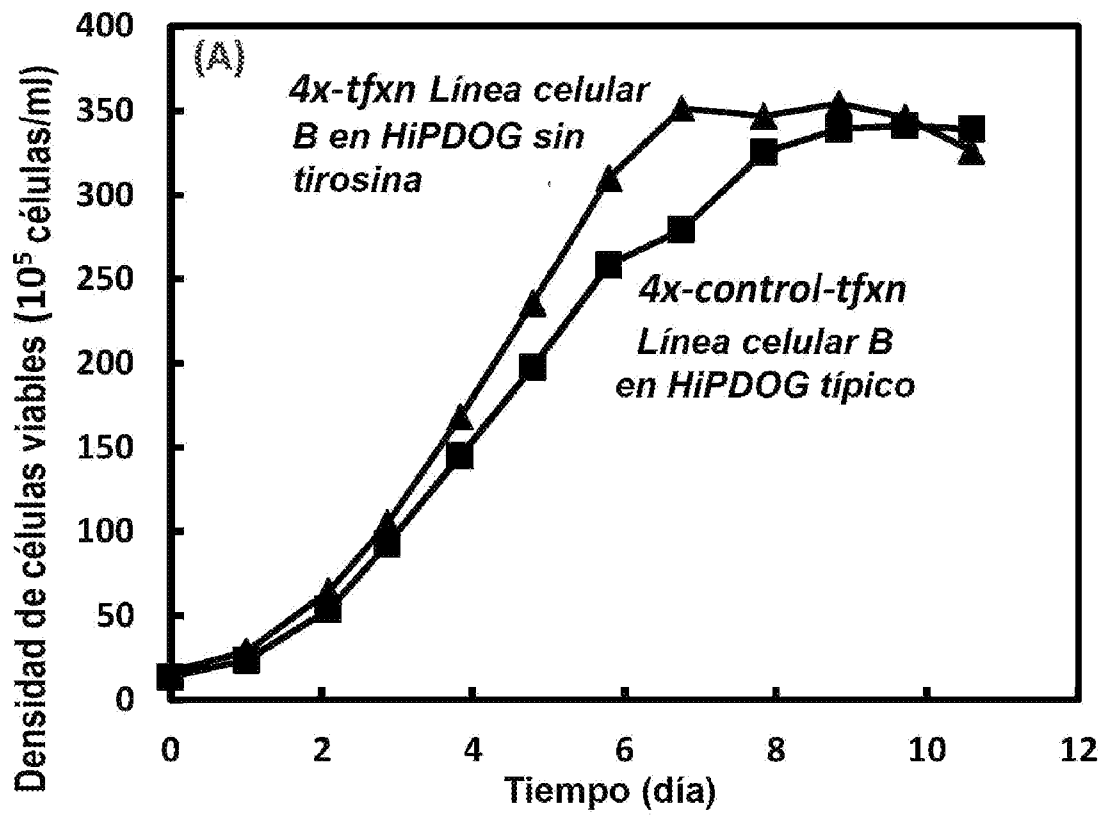


Figura 30C y 30D

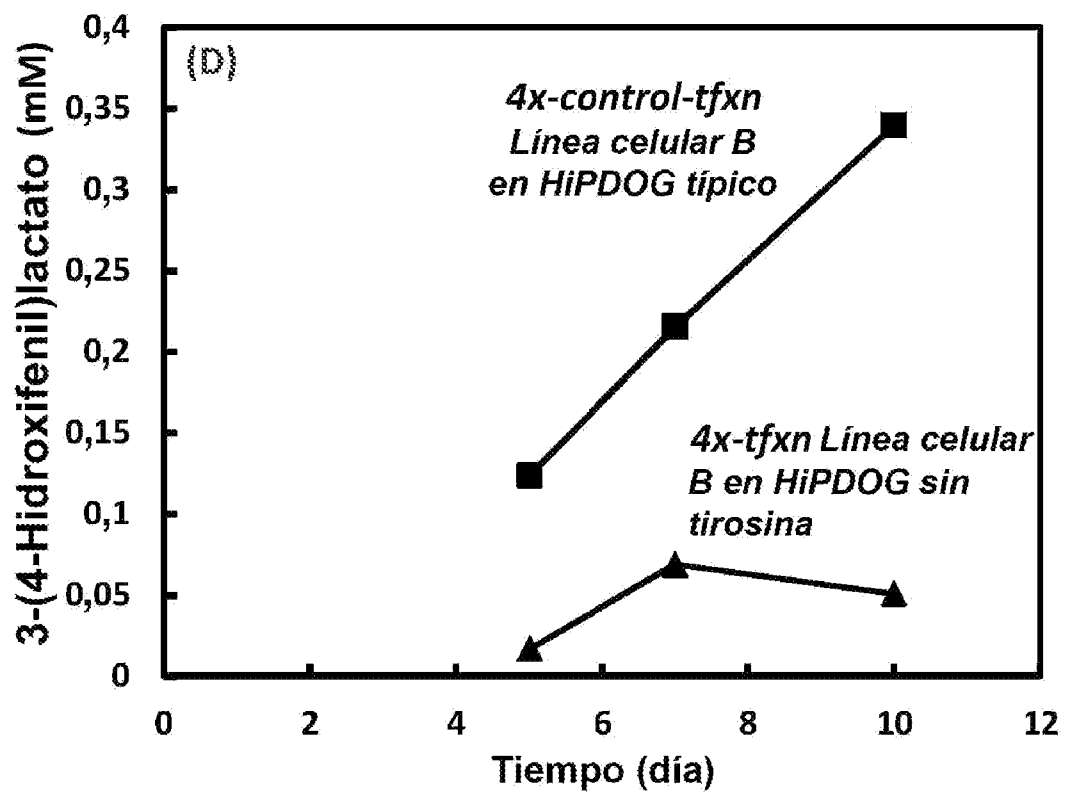
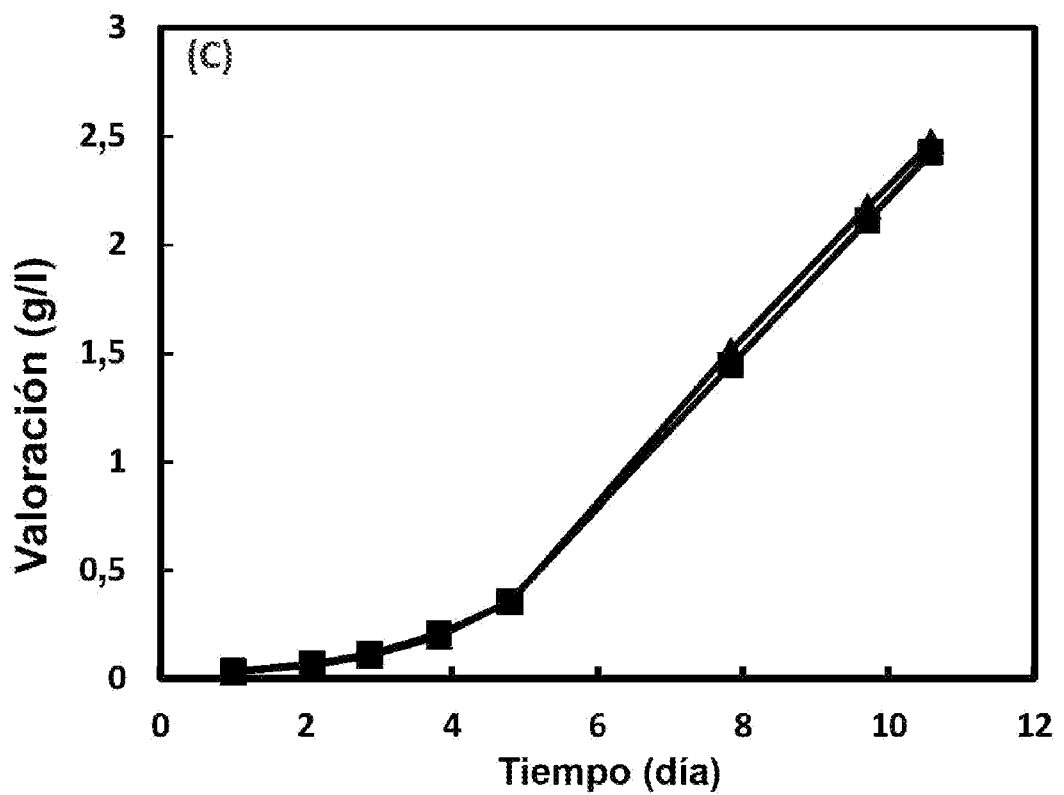


Figura 31A, 31B

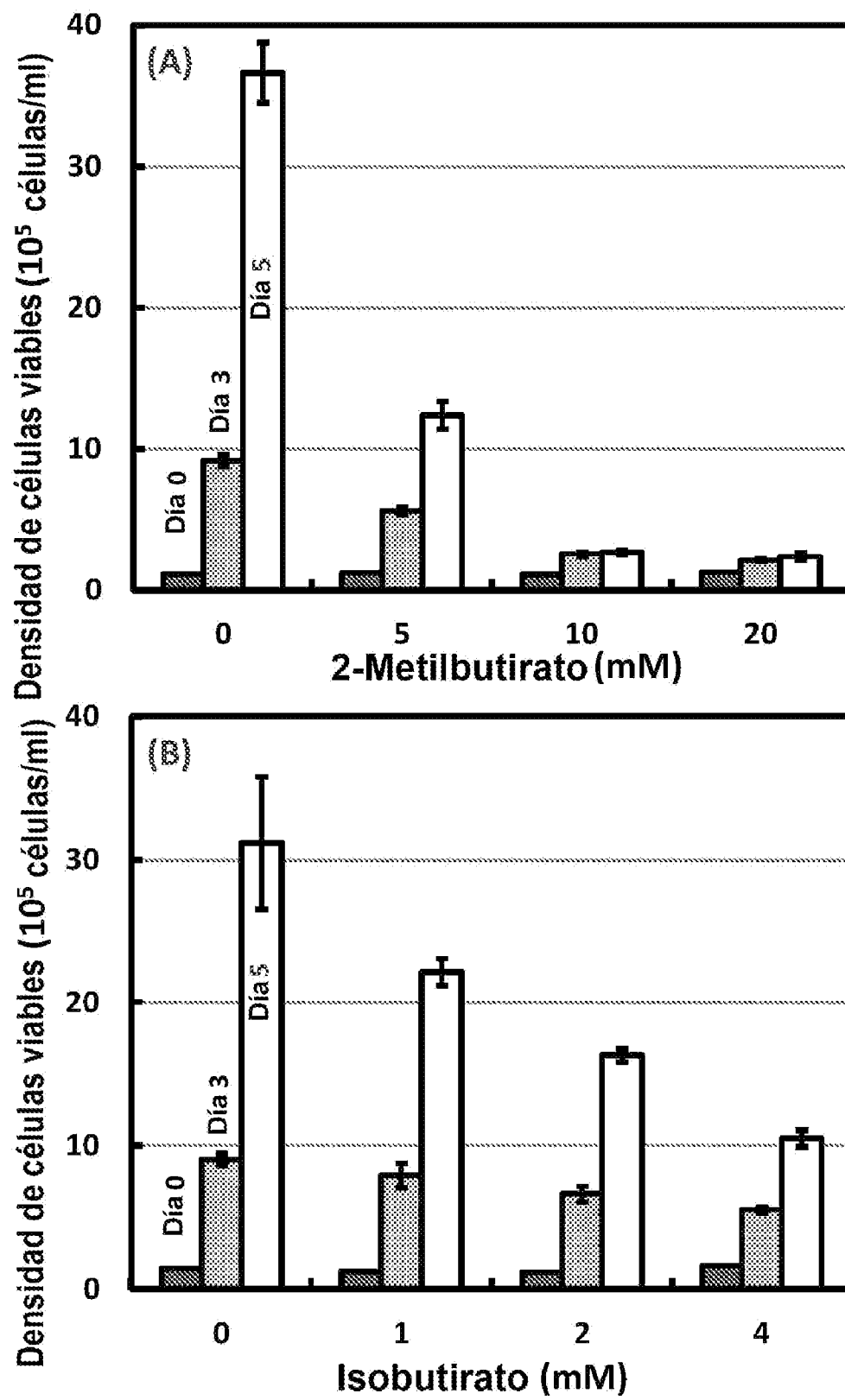


Figura 32A, 32B, 32C, 32D

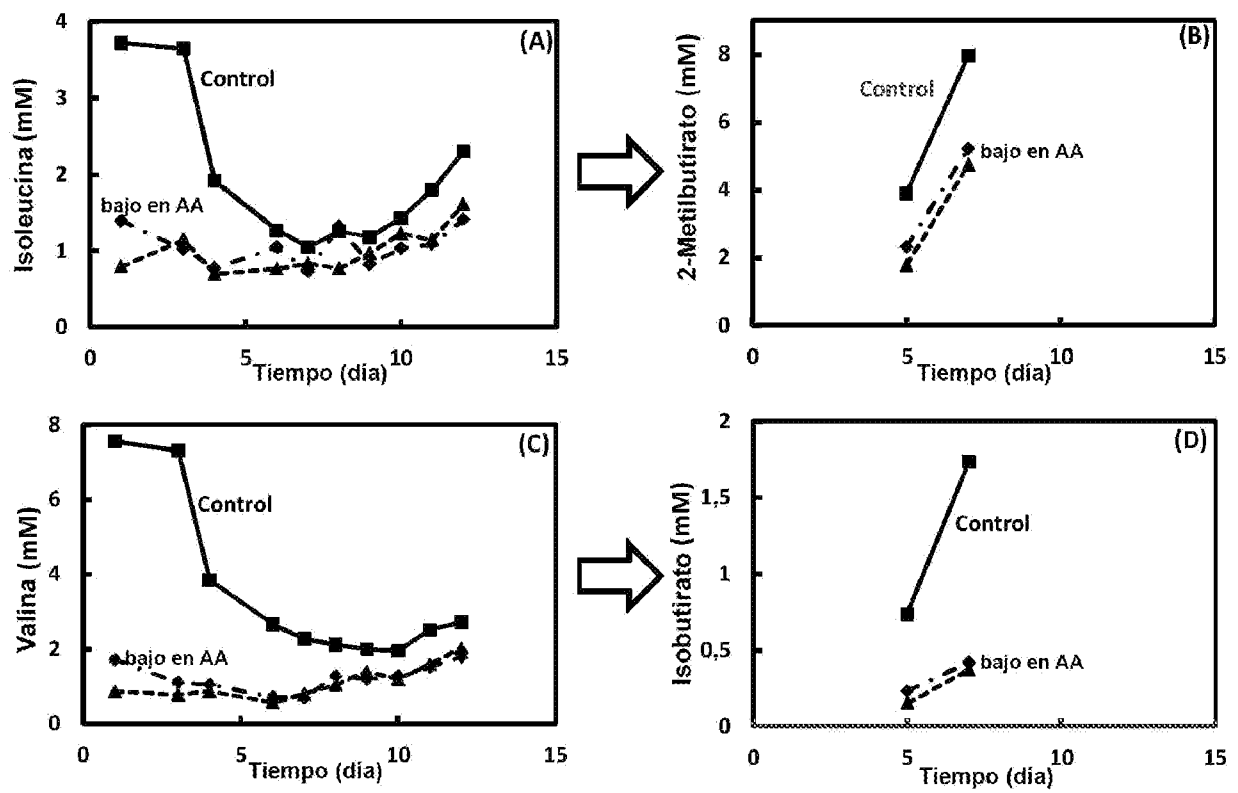
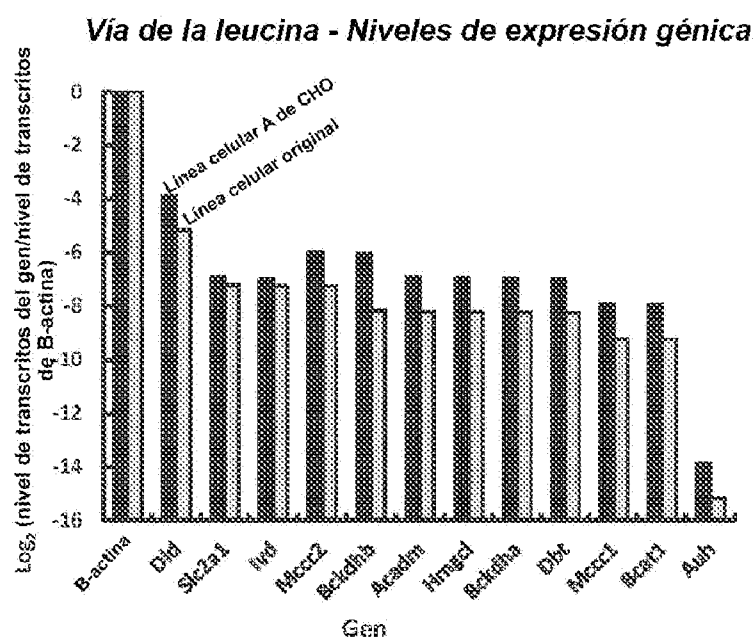


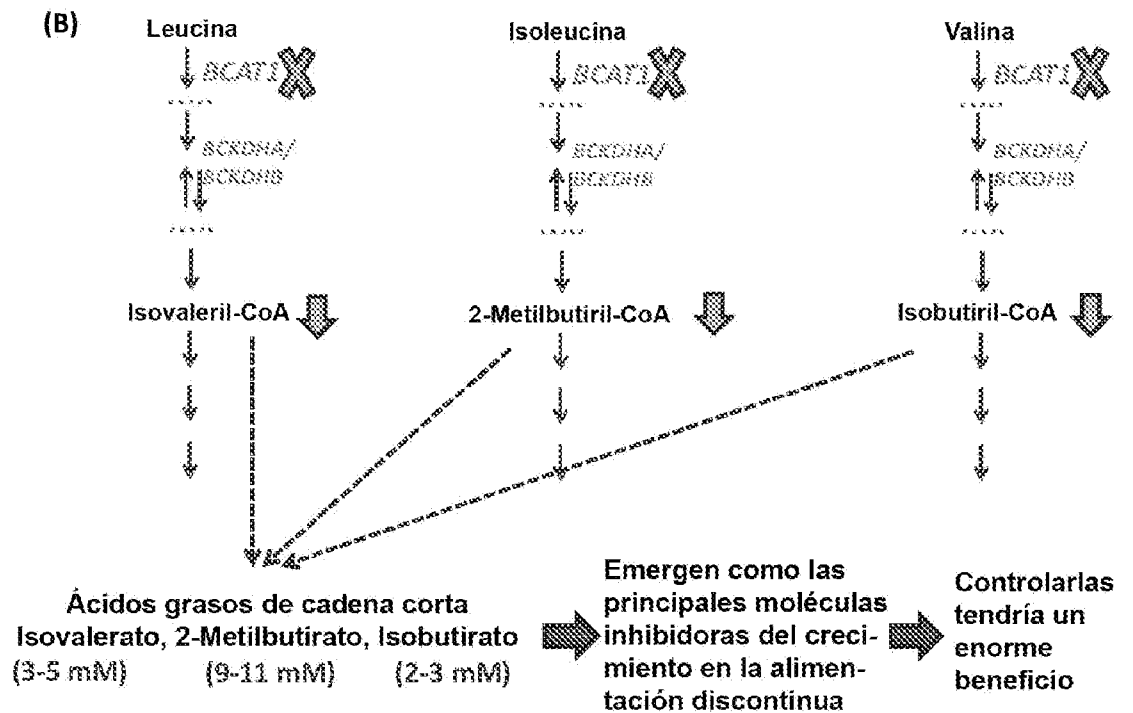


Figura 33A, 33B

(A)



(B)

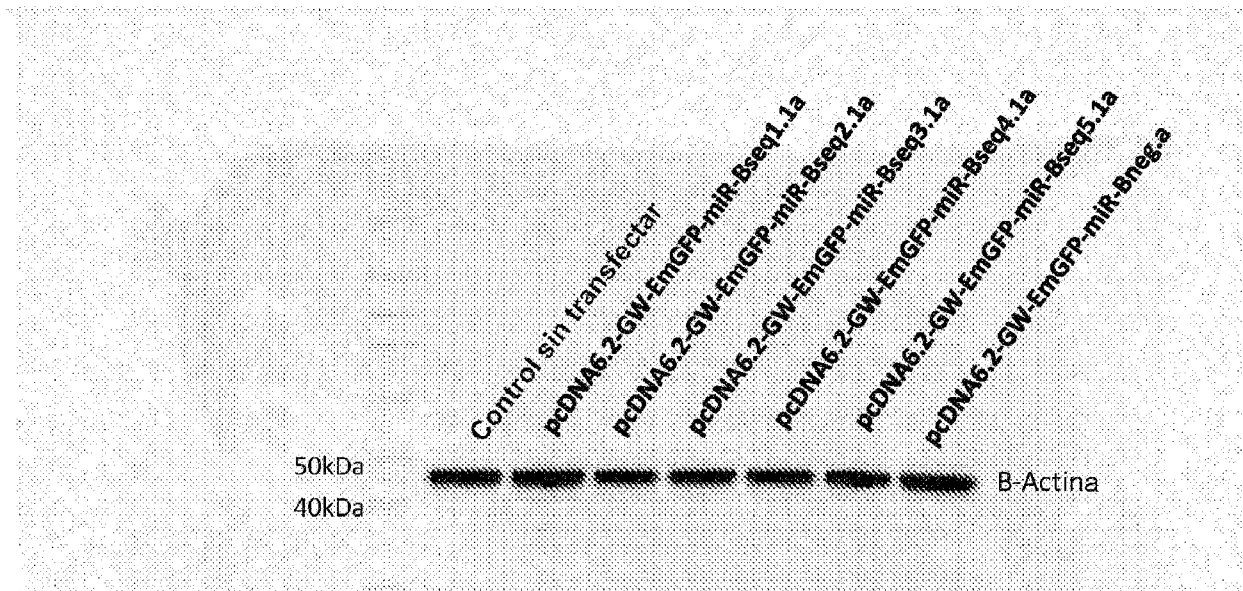


~~X~~ indica atenuación o inactivación

↓ indica producción reducida

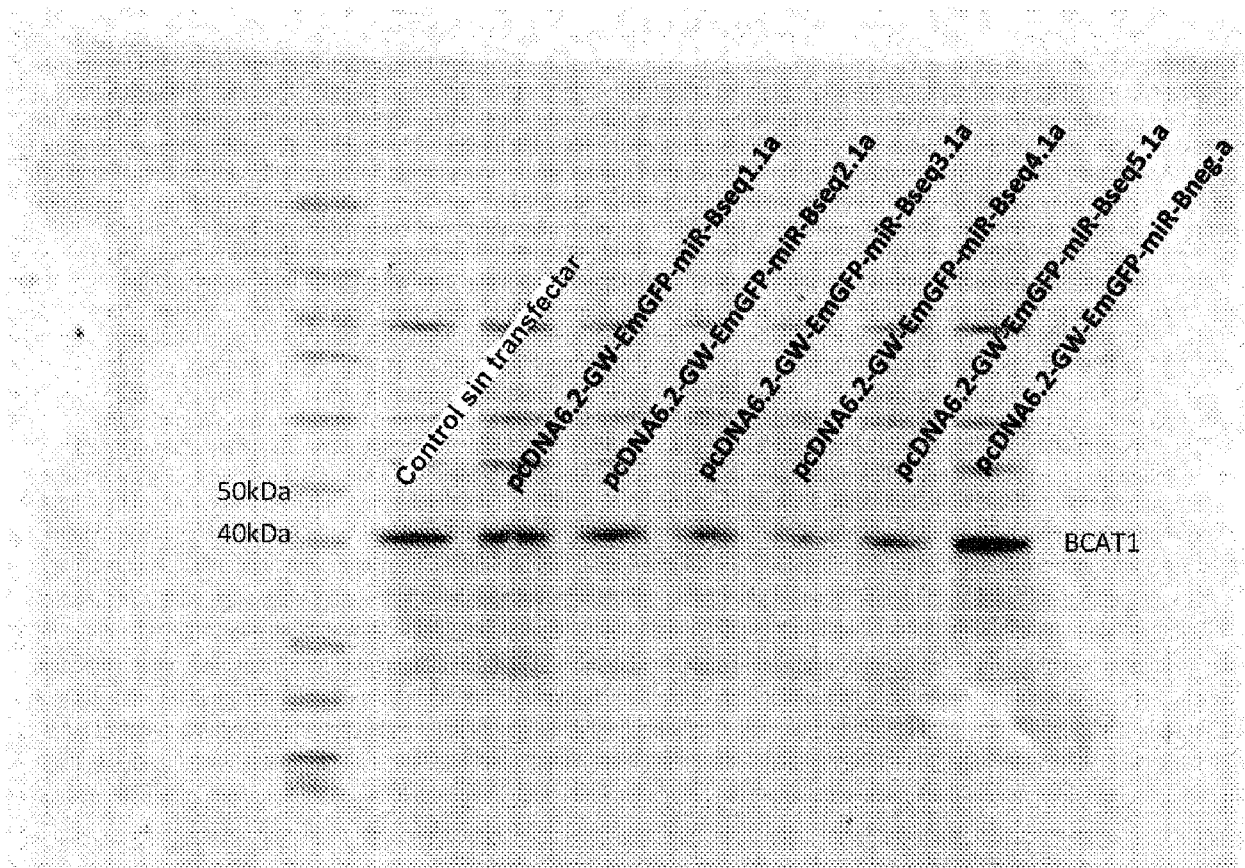
**Figura 34A**

B-actina en la línea celular original de CHO  
Predicho 42kDa



**Figura 34B**

BCAT1 en la línea celular original de CHO  
Predicho 43kDa



**Figura 34C**

B-actina en la línea celular B de CHO  
Predicho 42kDa

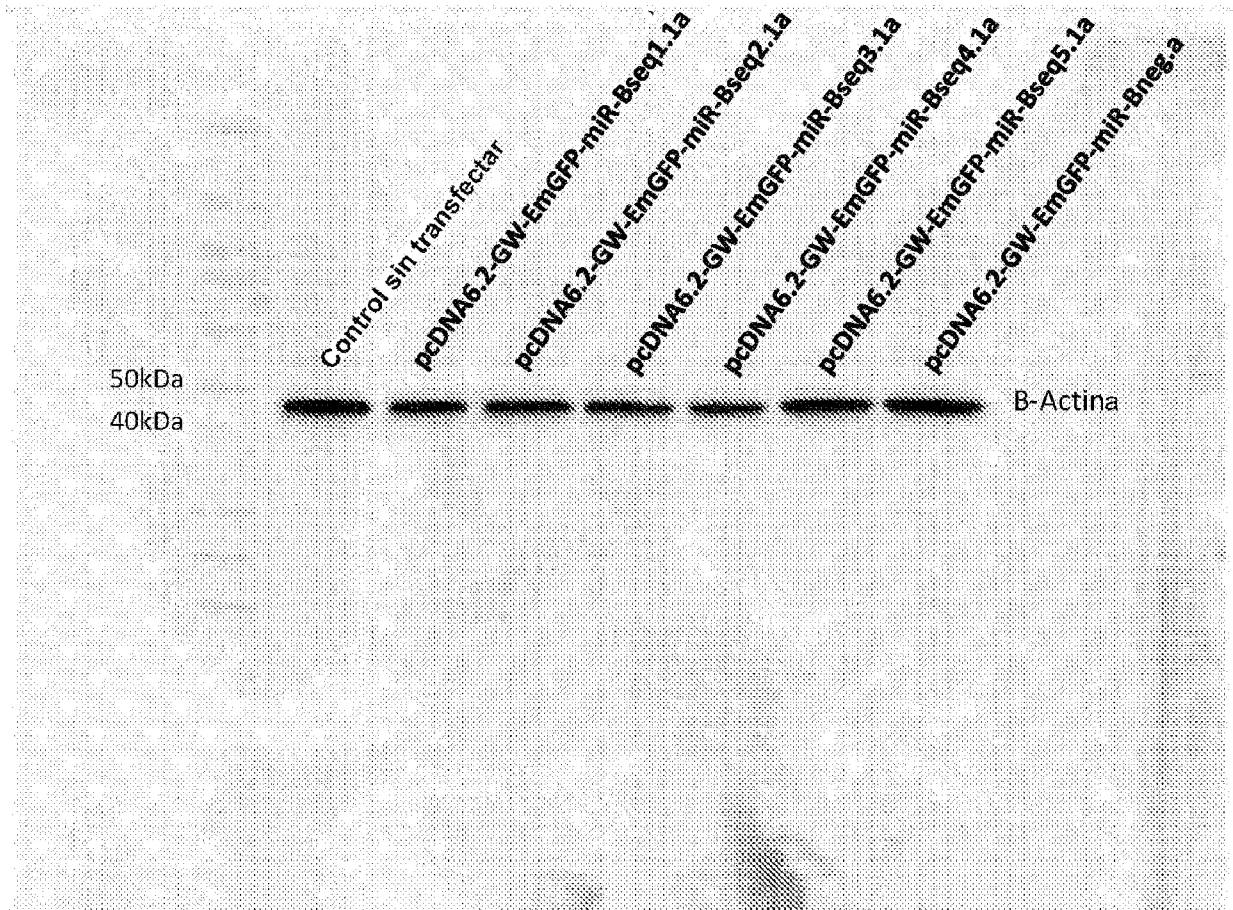
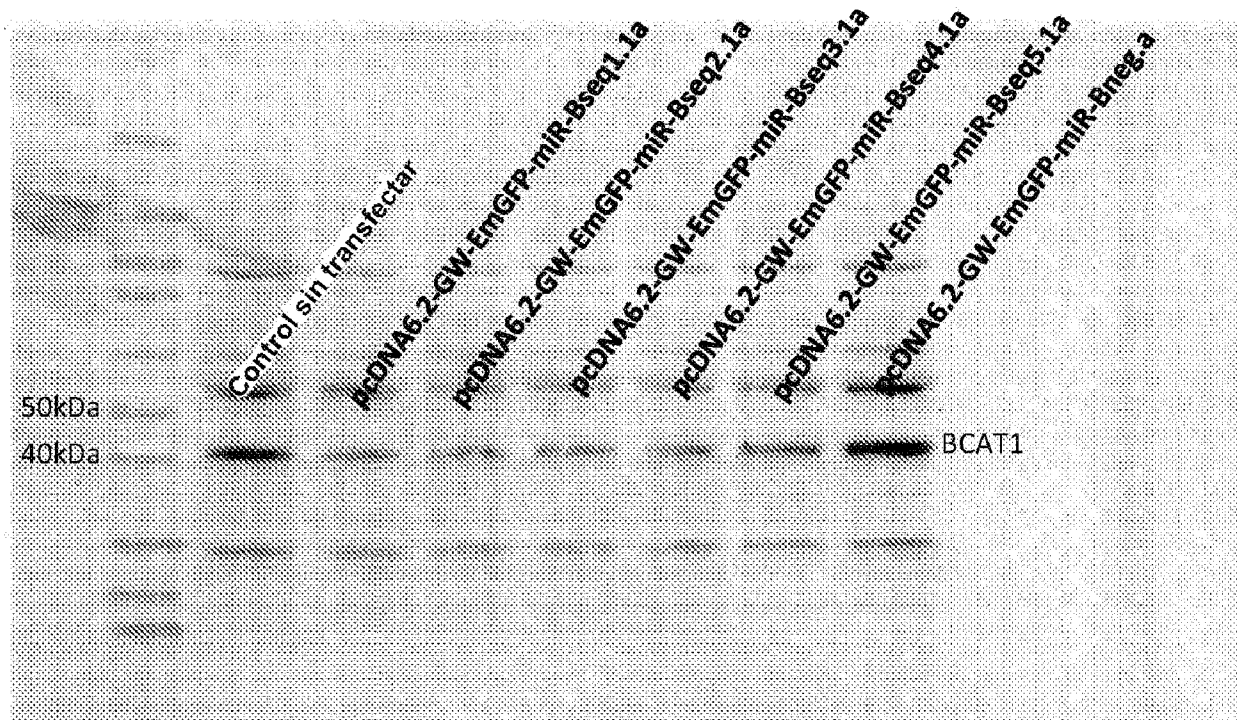


Figura 34D

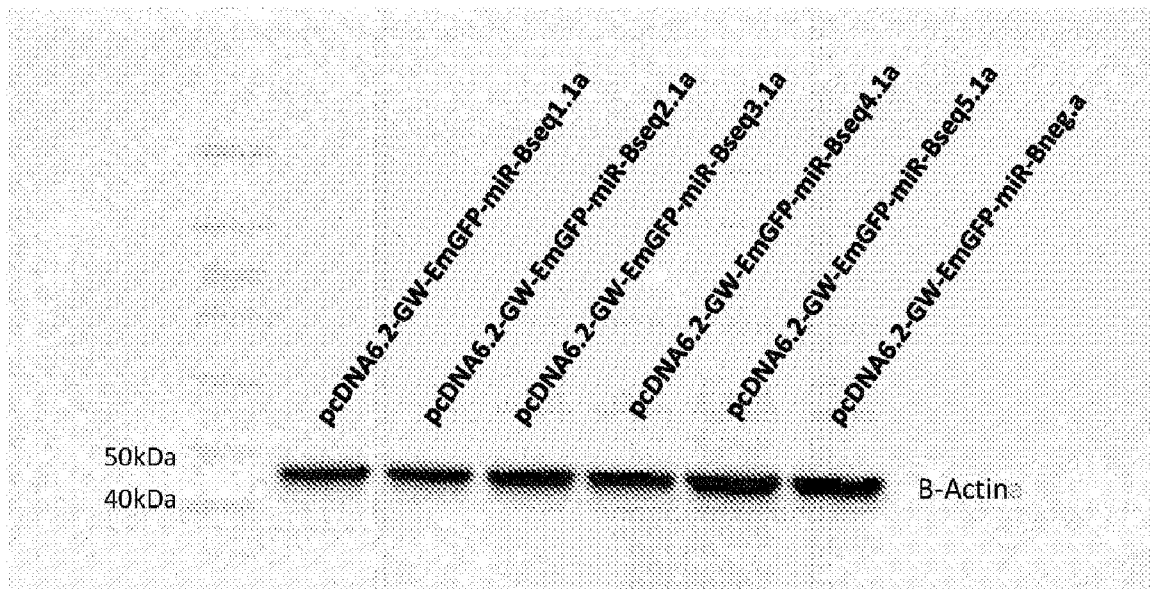
BCAT1 en la línea celular B de CHO  
Predicho 43kDa



**Figura 35A**

**Expresión de B-actina en agrupamientos de atenuación estables generados a partir de la línea celular original de CHO**

**Predicho 42kDa**



**Figura 35B**

**Expresión de BCAT1 en agrupamientos de atenuación estables generados a partir de la línea celular original de CHO**

Predicho 43kDa

