

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 543**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2017 PCT/IB2017/051692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2017 WO17175086**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2017 E 17716306 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 3440190**

54 Título: **Proceso de cultivo celular**

30 Prioridad:

05.04.2016 US 201662318275 P

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

13.12.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FIGUEROA, BRUNO;
LUAN, YEN-TUNG y
WANG, WENGE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 992 543 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

Proceso de cultivo celular

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a un medio de cultivo celular que comprende tirosina en una concentración de al menos 5 mM y alcohol polivinílico (PVA) entre 0,5 y 5g/l. La invención también se refiere al método de cultivo celular usando un medio de cultivo celular que comprende tirosina en una concentración de al menos 5 mM y alcohol polivinílico (PVA) entre 0,5 y 5g/l.

ANTECEDENTES

10 Las proteínas se han vuelto cada vez más importantes como agentes diagnósticos y terapéuticos. En la mayoría de los casos, las proteínas para aplicaciones comerciales se producen en cultivo celular, a partir de células que se han manipulado genéticamente y/o seleccionado para producir niveles inusualmente altos de una proteína de interés particular. La optimización de las condiciones de cultivo celular, incluidos los medios de cultivo celular, es importante para la producción comercial exitosa de proteínas. Como la mayoría de los aminoácidos en los medios de cultivo celular, se necesita tirosina (Tyr) para la producción de masa celular y anticuerpos. La reducción de tirosina en un cultivo de producción puede reducir el crecimiento celular, la viabilidad y la producción de proteínas. Como resultado de las mejoras del proceso de cultivo celular y la necesidad de un proceso de alta densidad y alto título, los medios de cultivo celular deben comprender una alta concentración de aminoácidos para asegurar el crecimiento celular y la producción de polipéptido recombinante. Sin embargo, la tirosina tiene solubilidad limitada a la concentración deseada para el máximo crecimiento celular o producción de proteína y tiende a precipitarse de la solución durante el almacenamiento en frío. Una forma de evitar el problema de la precipitación es alimentar el patrón concentrado de tirosina por separado. Sin embargo, tal enfoque agrega complejidad operacional, especialmente para el proceso de fabricación a gran escala. Además, el patrón concentrado de tirosina tiene un pH alto y puede causar cambios de pH durante la alimentación.

25 Por lo tanto, existe la necesidad del desarrollo de medios de cultivo celular mejorados en los que aumenta la solubilidad de tirosina para cultivar células de mamífero a alta densidad y para una producción óptima de proteínas. El documento US7294484 divulga medios para la producción de polipéptidos (anticuerpos) mediante células CHO conteniendo los medios tirosina y alcohol polivinílico (PVA).

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La invención es como se define en las reivindicaciones.

30 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende tirosina a una concentración de al menos 5 mM y alcohol polivinílico (PVA), en el que la concentración de PVA está entre 0,5 y 5 g/l.

En otro aspecto se proporciona un método de cultivo celular que comprende poner en contacto células de mamífero con un medio de cultivo celular como se reivindica.

35 En el medio reivindicado, la concentración de tirosina es de al menos 5 mM. En algunos modos de realización, el medio es un medio libre de suero y/o libre de proteínas.

En algunas formas de realización, el cultivo celular es un cultivo alimentado por lotes y el medio de cultivo celular de la invención se usa como un medio base y/o un medio de alimentación. En algunas formas de realización, la densidad de células viables máxima durante el cultivo celular es superior a 1×10^6 células/mL. En algunas formas de realización, las células expresan una proteína recombinante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos y medios para el cultivo celular y para la producción de polipéptidos. La presente invención se refiere a medios de cultivo celular que comprende alta concentración de tirosina y alcohol polivinílico (PVA).

45 En algunas formas de realización, la concentración de tirosina en el medio de cultivo celular de la invención es al menos 5 mM, al menos 6 mM, al menos 7 mM, al menos 8 mM, al menos 9 mM o al menos 10 mM. La concentración de tirosina en el medio de cultivo celular de la invención al menos 5 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tirosina en el medio de cultivo celular de la invención es al menos 6 mM. En algunas formas de realización, la concentración de tirosina en el medio de cultivo celular de la invención está comprendida entre 5 mM y 20 mM.

50 En algunas formas de realización, el término tirosina incluye cualquier forma de tirosina adecuada para usar como un nutriente en el cultivo celular, con preferencia en cultivo de células animales, con preferencia en un cultivo de células de mamífero. En algunas formas de realización, la tirosina es L-tirosina. En algunas formas de realización, la tirosina es base libre de tirosina o una sal de tirosina. En algunas formas de realización, la tirosina es una sal de tirosina

seleccionada de sal disódica o dihidrato de sal disódica. En una forma de realización preferida, la tirosina es L-tirosina, L-tirosina disódica o dihidrato de L-tirosina disódica.

PVA es un polímero de fórmula $[-CH_2CH(OH)-]_n$ donde n es un número entero y representa el grado de polimerización. En algunas formas de realización, el PVA usado en el medio de cultivo celular de la invención es un polímero de fórmula $[-CH_2CH(OH)-]_n$ donde n es un número entero comprendido entre 100 y 10000, 300 y 8000 o 500 y 5000. En algunas formas de realización, el PVA usado en el medio de cultivo celular de la invención tiene un grado de hidrólisis de aproximadamente 85% a aproximadamente 89%. En algunas formas de realización, el PVA usado en el medio de cultivo celular de la invención tiene un peso molecular de entre 10000 y 100000 Da. En algunas formas de realización, el PVA usado en el medio de la invención tiene un peso molecular entre 10000 y 50000 Da, con preferencia de entre 13000 y 23000 Da. En algunas formas de realización, el PVA usado en el medio de la invención tiene una viscosidad de entre 1 y 10 centipoise (cp), con preferencia de entre 3,0 y 4,5 cp. La viscosidad de PVA se informa en términos de la viscosidad de una solución acuosa del 4% del alcohol polivinílico a una temperatura de 20 °C.

En algunas formas de realización, el PVA usado en el medio de cultivo celular de la presente invención es Selvol™ PVA 203 (Sekisui).

La concentración de PVA adecuada para evitar la precipitación de un medio de cultivo celular que comprende una concentración específica de tirosina (de al menos 3 mM) puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica, por ejemplo, usando una metodología similar a las descritas en el ejemplo 1. En algunas formas de realización, la concentración de PVA en el medio de cultivo celular de la invención es al menos 0,5 g/L, al menos 1 g/L, al menos 2 g/L, al menos 3 g/L, al menos 4 g/L o al menos 5 g/L. En algunas formas de realización, la concentración de PVA en el medio de cultivo celular de la invención es 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5. En algunas formas de realización, la concentración de PVA en el medio de cultivo celular de la invención es de 2,5 g/L.

La concentración de PVA en el medio de cultivo celular de la invención está comprendida entre 0,5 g/L y 5 g/L. En algunas realizaciones, la concentración de PVA en el medio de cultivo celular de la invención está comprendida entre 1 g/L y 3 g/L.

En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular de la invención tiene una turbidez menor de 5 NTU (Unidad de Turbidez Nefelométrica) después de 1, 2, 3 o 4 semanas de almacenamiento a 4 °C en ausencia de luz. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular de la invención tiene una turbidez menor de 5NTU después de 2 semanas de almacenamiento a 4 °C en ausencia de luz. En algunas formas de realización, la turbidez se mide como se describe en los ejemplos. En algunas formas de realización, la turbidez se mide usando un turbidímetro 2100P (HACH).

En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular de la invención comprende esencialmente sin precipitado después de 1, 2, 3 o 4 semanas de almacenamiento a 4 °C en ausencia de luz. En algunas formas de realización, el medio de cultivo celular de la invención comprende esencialmente sin precipitado después de 2 semanas de almacenamiento a 4 °C en ausencia de luz.

Los términos "medio", "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" tal como se usan en la presente se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren las células de mamífero en crecimiento. Típicamente, tales soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos requeridos por la célula para un crecimiento y/o supervivencia mínimos. En una forma de realización, el medio puede comprender Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val y cistina y/o Cys.

Dicha solución también puede contener componentes suplementarios que mejoran el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen, pero sin limitación, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales muy bajas), compuestos inorgánicos presentes en altas concentraciones finales (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 a una concentración de sal óptimos para la supervivencia y la proliferación celular. Por ejemplo, el medio se puede formular a un pH entre alrededor de 7,1 y 7,3 y una osmolalidad final de entre 1000 y 1300 mOsm.

En algunas formas de realización, el medio es un medio de alimentación que se añade después del comienzo del cultivo celular. En una forma de realización, el medio es un medio, con preferencia un medio de alimentación que comprende 4 a 10 mM de Ala, 30 a 60 mM de Arg, 50 a 90 mM de Asn, 10 a 30 mM de Asp, 2 a 40 mM de Glu, 2 a 15 mM de Gly, 8 a 20 mM de His, 25 a 32 mM de Ile, 35 a 60 mM de Leu, 28 a 60 mM de Lys, 9 a 25 mM de Met, 10 a 30 mM de Phe, 15 a 40 mM de Pro, 44 a 80 mM de Ser, 20 a 45 mM de Thr, 2 a 10 mM de Trp y 20 a 50 mM de Val.

Se puede modificar una amplia variedad de medios de crecimiento de mamífero mediante el ajuste de los niveles de tirosina y PVA para usar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, se puede obtener un medio de acuerdo con la invención mediante la modificación de la cantidad de tirosina y PVA en medios de cultivo celular conocidos, tales como los medios descritos en los documentos WO06026445, EP2243827, WO02066603 o WO06050050.

En algunas realizaciones, el medio es un medio definido químicamente, en el que los componentes del medio son

tanto conocidos como controlados. En algunas formas de realización, el medio es un medio complejo, en el que no todos los componentes del medio son conocidos y/o controlados.

Los medios de crecimiento químicamente definidos para el cultivo de células de mamíferos han sido ampliamente desarrollados y publicados durante las últimas décadas. Todos los componentes de los medios definidos están bien caracterizados y, por lo tanto, los medios definidos 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, las formulaciones de los medios se han desarrollado con el propósito expreso de mantener cultivos celulares productores de proteínas recombinantes altamente productivos. Dichos medios se prefieren para usar en el método de la invención. Tales medios generalmente comprenden altas cantidades de nutrientes y en particular de aminoácidos para soportar el crecimiento y/o el mantenimiento de las células a alta densidad. Si es necesario, estos medios pueden ser modificados por la persona experta para usar en el método de la invención. Por ejemplo, la persona experta puede añadir PVA y aumentar la cantidad de tirosina en estos medios para su uso como medios base o medios de alimentación en un método como se describe en la presente.

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

En algunas realizaciones, los medios definidos típicamente incluyen aproximadamente cincuenta entidades químicas de concentraciones conocidas en agua. La mayoría de ellos también contiene una o más proteínas bien caracterizadas, tales como la insulina, el IGF-1, la transferrina o la ASB, pero otros no requieren componentes proteicos y, por lo tanto, se denominan medios definidos libres de proteínas. Los componentes químicos típicos de los medios se dividen en cinco amplias categorías: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos y una categoría miscelánea que desafía la categorización clara.

El medio de cultivo celular se puede suplementar opcionalmente con componentes suplementarios. El término "componentes suplementarios" como se usa en la presente se refiere a componentes que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen, pero sin limitación, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En algunas realizaciones, se pueden añadir componentes suplementarios al cultivo celular inicial. En algunas realizaciones, se pueden añadir componentes suplementarios después del comienzo del cultivo celular.

Típicamente, los oligoelementos se refieren a una variedad de sales inorgánicas incluidas a niveles micromolares o inferiores. Por ejemplo, los oligoelementos comúnmente incluidos son el zinc, el selenio, el cobre y otros. En algunas realizaciones, se puede incluir hierro (sales ferrosas o férricas) como un oligoelemento en el medio de cultivo celular inicial a concentraciones micromolares. El manganeso también se incluye con frecuencia entre los oligoelementos como un catión divalente ($MnCl_2$ o $MnSO_4$) en un rango de concentraciones nanomolares a micromolares. Numerosos oligoelementos menos comunes generalmente se añaden en concentraciones nanomolares.

En algunas formas de realización, el medio de la invención es un medio adecuado para soportar densidad de células viables alta, tal como por ejemplo 1×10^6 células/mL, 5×10^6 células/mL, 1×10^7 células/mL, 5×10^7 células/mL, 1×10^8 células/mL o 5×10^8 células/mL, en un cultivo celular. En algunas formas de realización, el cultivo celular es un cultivo alimentado por lotes de células de mamífero, con preferencia un cultivo alimentado por lotes de células CHO.

El término "densidad de células viables" como se usa en la presente se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio. La densidad de células viables se puede medir mediante cualquier método conocido por la persona experta. Con preferencia, la densidad de células viables se mide usando un contador celular automatizado tal como Bioprofile Flex®. El término densidad celular máxima tal como se usa en la presente se refiere a la densidad celular máxima lograda durante el cultivo celular. El término "viabilidad celular" como se usa en la presente se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir bajo un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. Los expertos en la técnica apreciarán que uno de los muchos métodos para determinar la viabilidad celular está abarcado en esta invención. Por ejemplo, se puede usar un colorante (por ejemplo, azul de tripano) que no pasa a través de la membrana de una célula viva, pero puede pasar a través de la membrana alterada de una célula muerta o moribunda para determinar la viabilidad celular.

Métodos de cultivo celular

Los términos "cultivo" y "cultivo celular", tal como se usan en la presente, se refieren a una población celular que se suspende 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 técnica, en algunas realizaciones, estos términos tal como se usan en la

presente 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 son células de mamífero.

El medio de la invención se puede usar con cualquier método de cultivo celular que sea susceptible al proceso deseado (por ejemplo, la producción de una proteína recombinante (por ejemplo, el anticuerpo)). Como un ejemplo no limitante, las células pueden crecer en cultivos por lotes o alimentados por lotes, donde el cultivo finaliza después de una expresión suficiente de la proteína recombinante (por ejemplo, el anticuerpo), después de lo cual se recolecta la proteína expresada (por ejemplo, el anticuerpo). Alternativamente, como otro ejemplo no limitante, las células se pueden cultivar en una realimentación por lotes, donde el cultivo no se termina, y se añaden nuevos nutrientes y otros componentes en forma periódica o continua al cultivo, durante el cual la proteína recombinante expresada (por ejemplo, anticuerpo) se recolecta en forma periódica o continua. Se conocen en la técnica otros métodos adecuados (por ejemplo, cultivos de tubo de centrifugación) y se pueden usar para poner en práctica la presente invención.

En algunas formas de realización, un cultivo celular adecuado para usar con el medio de la invención es un cultivo alimentado por lotes. El término "cultivo alimentado por lotes", como se usa en la presente, se refiere a un método de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos posteriores al comienzo del proceso de cultivo. Dichos componentes proporcionados comprenden típicamente componentes nutricionales para las células que se han reducido durante el proceso de cultivo. Un cultivo alimentado por lotes se detiene típicamente en algún punto, y las células y/o componentes en el medio se recolectan y opcionalmente se purifican. En algunas realizaciones, el cultivo alimentado por lotes comprende un medio base suplementado con medios de alimentación. El medio de la invención se puede usar como un medio base y/o como un medio de alimentación.

Las células pueden crecer en cualquier volumen conveniente elegido por el profesional. Por ejemplo, las células pueden crecer en recipientes de reacción a pequeña escala que varían en volumen desde algunos mililitros hasta varios litros. Alternativamente, las células se pueden cultivar en biorreactores comerciales a gran escala que varían en volumen desde aproximadamente al menos 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000, 15.000, 20.000 o 25.000 litros o más, o cualquier volumen entre estos. En algunas formas de realización, el volumen del medio de cultivo celular es al menos 500 L. En algunas formas de realización, el volumen del medio de cultivo celular es al menos 5000 L.

La temperatura de un cultivo celular se seleccionará sobre la base principalmente del rango de temperaturas a las que el cultivo celular permanece viable y el rango en el que se produce un alto nivel de 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 rango de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los métodos enseñados por la presente descripción no están limitados a estas temperaturas. Ciertas células de mamífero crecen bien y pueden producir los productos deseados (por ejemplo, proteínas o anticuerpos recombinantes) dentro del rango de aproximadamente 35 °C a 40 °C. En ciertas realizaciones, un cultivo celular se cultiva a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 °C en una o más veces durante el proceso de cultivo celular. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la temperatura o las temperaturas apropiadas para el crecimiento de las células, de acuerdo con las necesidades particulares de las células y los requisitos de producción particulares del profesional. Las células se pueden cultivar durante cualquier cantidad de tiempo, de acuerdo con las necesidades del profesional y el requerimiento de las células mismas. En algunas realizaciones, las células se cultivan a una temperatura entre 35 °C y 40 °C. En algunas realizaciones, las células crecen a 37 °C. En algunas realizaciones, las células crecen a 36,5 °C.

En algunas realizaciones, las células pueden crecer durante la fase de crecimiento inicial (o fase de crecimiento) durante un período mayor o menor de tiempo, de acuerdo con las necesidades del profesional y el requerimiento de las células mismas. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un período de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular predefinida. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un período de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular predefinida de aproximadamente 1×10^6 células/mL, aproximadamente 5×10^6 células/mL, aproximadamente 1×10^7 células/mL, aproximadamente 5×10^7 células/mL, aproximadamente 1×10^8 células/mL o aproximadamente 5×10^8 células/mL. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante un período de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular que es un porcentaje dado de la densidad máxima de células que las células finalmente pueden alcanzar si se dejan crecer sin alteración. Por ejemplo, las células se pueden cultivar durante un período de tiempo suficiente para lograr una densidad de células viables deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad celular máxima. En algunas realizaciones, las células se cultivan hasta que la densidad celular no aumenta en más de 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 crecen hasta que la densidad celular no aumenta en más de 5% por día de cultivo.

En algunas realizaciones, las células se dejan crecer durante un período de tiempo definido. Por ejemplo, de acuerdo con la concentración inicial del cultivo celular, la temperatura a la que se cultivan las células y la tasa de crecimiento intrínseco de las células, las células se pueden cultivar 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, con preferencia durante 4 a 10 días. En algunos casos, las células se dejan crecer durante un mes o más. El profesional de la presente invención podrá elegir la duración de la fase de crecimiento inicial de acuerdo con los requerimientos de producción de proteínas y las necesidades de las células mismas.

El cultivo celular se puede agitar o batir durante la fase de cultivo inicial para aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, que incluyen, pero sin limitación, pH, temperatura, oxigenación, etc.

5 Al final de la fase de crecimiento inicial, al menos una de las condiciones de cultivo se puede modificar para aplicar un segundo conjunto de condiciones de cultivo y se produzca un cambio metabólico en el cultivo. Se puede lograr un cambio metabólico mediante, por ejemplo, un cambio en la temperatura, pH, osmolalidad o nivel de inductor químico del cultivo celular. En una forma de realización no limitante, las condiciones de cultivo se cambian mediante la
10 disminución de la temperatura del cultivo. Sin embargo, como es sabido en la técnica, el cambio de temperatura no es el único mecanismo a través del cual se puede lograr un cambio metabólico apropiado. Por ejemplo, tal cambio metabólico también se puede lograr mediante el cambio de otras condiciones de cultivo que incluyen, pero sin limitación, pH, osmolalidad y niveles de butirato de sodio. El momento del cambio de cultivo será determinado por el profesional de la presente invención, sobre la base de los requerimientos de producción de proteínas o las necesidades de las células mismas.

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

20 En algunas formas de realización, una vez que las condiciones del cultivo celular se han cambiado como se discutió anteriormente, el cultivo celular se mantiene durante una fase de producción posterior bajo un segundo conjunto de condiciones de cultivo propicias para la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y apropiadas para expresión del polipéptido o proteína deseado a niveles comercialmente adecuados.

25 Como se discutió anteriormente, el cultivo se puede cambiar mediante el cambio de una o más de una serie de condiciones de cultivo que incluyen, pero sin limitación, temperatura, pH, osmolalidad y niveles de butirato de sodio. En algunas realizaciones, se cambia la temperatura del cultivo. De acuerdo con esta forma de realización, durante la fase de producción posterior, el cultivo se mantiene a una temperatura o rango de temperatura que es inferior que la temperatura o rango de temperatura de la fase de crecimiento inicial. Como se discutió anteriormente, se pueden emplear múltiples cambios discretos de temperatura para aumentar la densidad o viabilidad celular o para aumentar
30 la expresión de la proteína recombinante.

En algunas formas de realización, las células se pueden mantener en la fase de producción posterior hasta que se alcanza una densidad celular o título de producción deseados. En otra forma de realización de la presente invención, las células se dejan crecer durante un período de tiempo definido durante la fase de producción posterior. Por ejemplo,
35 de acuerdo con la concentración del cultivo celular en el inicio de la temperatura a la cual crecen las células, y la tasa de crecimiento intrínseco de las células, las células pueden crecer 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 se dejan crecer durante un mes o más. El profesional de la presente invención podrá elegir la duración de la fase de producción posterior de acuerdo con los requerimientos de producción de polipéptidos o proteínas y las necesidades de las propias células.

40 El cultivo celular se puede agitar o batir durante la fase de producción posterior para aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento posterior, que incluyen, pero sin limitación, pH, temperatura, oxigenación, etc.

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

45 Células

Se puede utilizar cualquier célula de mamífero susceptible al cultivo celular de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC N.º: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243 - 251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MOCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En alguna forma de realización preferida, las células son células CHO. En algunas

realizaciones preferidas, las células son células GS-CHO.

Adicionalmente, se puede utilizar cualquier número de líneas celulares de hibridoma disponibles en comercial y no comercialmente de acuerdo con la presente invención. El término "hibridoma" tal como se usa en la presente se refiere a una célula o progenie de una célula resultante de la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de anticuerpos. Tal hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales usadas para crear el hibridoma pueden ser de cualquier fuente de mamíferos, que incluyen, pero sin limitaciones, rata, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra y ser humano. En algunas realizaciones, un hibridoma es una línea celular de trioma, que se produce cuando la progenie de fusiones de mieloma heterohíbrido, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, se fusionan posteriormente con una célula plasmática. En algunas realizaciones, un hibridoma es cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos tales como, por ejemplo, cuadromas (ver, por ejemplo, Milstein et al., *Nature*, 537: 3053, 1983). Un experto en la técnica apreciará que las líneas celulares de hibridoma podrían tener diferentes requerimientos nutricionales y/o podrían requerir diferentes condiciones de cultivo para un crecimiento óptimo, y podrán modificar las condiciones según sea necesario.

Expresión de proteínas

Como se indicó anteriormente, en muchos casos las células se seleccionarán o se manipularán genéticamente para producir altos niveles de productos deseados (por ejemplo, proteína o anticuerpo recombinante). A menudo, las células serán manipuladas por la mano del hombre para producir altos niveles de proteína recombinante, por ejemplo, mediante la introducción de un gen que codifica la proteína de interés y/o mediante la introducción de elementos de control genético que regulan la expresión de ese gen (ya sea endógeno o introducido).

Ciertas proteínas pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o alguna otra característica de las células que en última instancia limita la producción de la proteína de interés de alguna manera. Incluso entre una población de células de un tipo particular manipulado genéticamente para expresar una proteína específica, existe variabilidad dentro de la población celular de manera que ciertas células individuales crecerán mejor, producirán más proteínas de interés, o producirán una proteína con niveles de actividad más altos (por ejemplo, actividad enzimática). En ciertas realizaciones, el profesional selecciona empíricamente una línea celular para un crecimiento robusto en las condiciones particulares elegidas para cultivar las células. En algunas realizaciones, las células individuales manipuladas genéticamente para expresar una proteína particular se eligen para producción a gran escala sobre la base del crecimiento celular, densidad celular final, porcentaje de viabilidad celular, título de la proteína expresada o cualquier combinación de estas o cualquier otra condición considerada importante por el profesional.

Cualquier proteína que se pueda expresar en una célula huésped se puede producir de acuerdo con las presentes enseñanzas. El término "célula huésped", como se usa en la presente, se refiere a una célula que se manipula de acuerdo con la presente invención para producir una proteína de interés como se describe en la presente. Una proteína se puede expresar a partir de un gen que es endógeno para la célula, o de un gen heterólogo que se introduce en la célula. Una proteína puede ser una que se produce en la naturaleza, o alternativamente puede tener una secuencia que fue manipulada genéticamente o seleccionada por la mano del hombre.

Las proteínas que se pueden expresar deseablemente de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán sobre la base de una actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente invención se puede emplear para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc., farmacéutica o comercialmente relevante. En algunas realizaciones, la proteína expresada por las células en cultivo se selecciona de anticuerpos, o fragmentos de estos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio único, glicoproteínas, proteínas terapéuticas, factores de crecimiento, factores de coagulación, citoquinas, proteínas de fusión, principios activos farmacéuticos, vacunas, enzimas o Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (SMIP). Un experto en la materia entenderá que cualquier proteína se puede expresar de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína particular que se producirá en función de sus necesidades particulares.

Anticuerpos

Dado el gran número de anticuerpos actualmente en uso o bajo investigación como agentes farmacéuticos u otros agentes comerciales, la producción de anticuerpos es de particular interés de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Cualquier anticuerpo que se pueda expresar en una célula huésped se puede producir de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo para expresar es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que se derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se han descrito una variedad de enfoques para producir 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 U.S. N.º 4.816.567; Boss et al., Patente U.S. 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 formas de realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano derivado, por ejemplo, a través del uso de bibliotecas de despliegue de ribosomas o despliegue en fagos (*véase, por ejemplo, Winter et al.*, Patente U.S: N.º 6.291.159 y Kawasaki, Patente U.S: N.º 5.658.754) o el uso de especies xenográficas en las que los genes de anticuerpos nativos se inactivan y reemplazan funcionalmente con genes de anticuerpos humanos, mientras que dejan intactos los otros componentes del sistema inmune nativo (*véase, por ejemplo, Kucherlapati et al.*, Patente U.S: 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 se deriva de anticuerpos humanos para, de este modo, minimizar cualquier posible reacción inmunitaria cuando se administra a un sujeto humano. En anticuerpos humanizados, los residuos de aminoácidos en las regiones determinantes de complementariedad se reemplazan, al menos en parte, con residuos de una especie no humana que confiere una especificidad o afinidad de antígeno deseada. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden preparar mediante cualquiera de las varias 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 preparan con preferencia de acuerdo con las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400, todas las cuales se incorporan en la presente por referencia). Los anticuerpos humanizados se pueden producir comercialmente por, por ejemplo, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña. Para referencia adicional 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 formas de realización, los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados descritos anteriormente pueden contener residuos de aminoácidos que no aparecen de forma natural en ningún anticuerpo en ninguna especie en la naturaleza. Estos residuos extraños se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir especificidad nueva o modificada, afinidad o función efectora sobre el anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos anteriormente se pueden conjugar con fármacos para farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica y radionucleidos (ver, por ejemplo, Kunz *et al.*, Calicheamicin derivative-carrier conjugates, US20040082764 A1).

En general, los profesionales de la presente invención seleccionarán una proteína de interés, y conocerán su secuencia de aminoácidos precisa. Cualquier proteína determinada que se expresará de acuerdo con la presente invención puede tener sus propias características particulares y puede influir en la densidad celular o viabilidad de las células cultivadas, se puede expresar a niveles inferiores que otra proteína cultivada en condiciones de cultivo idénticas, y puede tener una actividad biológica diferente de acuerdo con las condiciones de cultivo exactas y las etapas realizadas. Un experto en la técnica será capaz de modificar apropiadamente las etapas y las composiciones usadas para producir una proteína particular de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención con el fin de optimizar el crecimiento celular y el nivel de producción y/o actividad de cualquier proteína expresada determinada.

Introducción de genes para la expresión de proteínas en las células huésped

Generalmente, una molécula de ácido nucleico introducida en la célula codifica la proteína que se desea expresar de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, una molécula de ácido nucleico puede codificar un producto génico que induce la expresión de la proteína deseada por la célula. Por ejemplo, el material genético introducido puede codificar un factor de transcripción que activa la transcripción de una proteína endógena o heteróloga. Alternativa o adicionalmente, una molécula de ácido nucleico introducida puede aumentar la traducción o la estabilidad de una proteína expresada por la célula.

Los métodos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de una proteína de interés en células huésped de mamífero son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46, 1979; Levinson *et al.* EP 117.060; y EP 117.058. Para las células de mamíferos, los métodos comunes de introducción de material genético en células de mamíferos incluyen el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb (*Virology*, 52:456-457, 1978) o la lipofectamina™ (Gibco BRL) Method of Hawley-Nelson (*Focus* 15:73, 1993). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamíferos fueron descritas por Axel en la patente U.S. N.º 4.399.216 expedida el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas para introducir material genético en células de mamífero, 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.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico para 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. Alternativamente, un ácido nucleico que codifica la proteína (que incluye los elementos reguladores necesarios) puede estar contenido dentro de un vector plasmídico. Los 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 Poli-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, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico para introducir en una célula está contenida dentro de un vector viral. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína se puede insertar en el genoma viral (o un genoma viral parcial). Los elementos reguladores que dirigen la expresión de la proteína se pueden incluir con el ácido nucleico insertado en el genoma viral (es decir, unido al gen insertado en el genoma viral) o se pueden proporcionar mediante el genoma viral mismo.

El ADN desnudo se puede introducir en las células mediante la formación de un precipitado que contiene el ADN y el fosfato de calcio. Alternativamente, también se puede introducir ADN desnudo en las células mediante la formación de una mezcla de ADN y DEAE-dextrano e incubación de la mezcla con las células o mediante la incubación de las células y el ADN en un tampón apropiado y someter las células a un pulso eléctrico de alto voltaje (por ejemplo, por electroporación). Un método adicional para introducir células de ADN desnudas es mediante la mezcla de ADN con una suspensión de liposomas que contiene lípidos catiónicos. El complejo ADN/liposoma luego se incuba con células. El ADN desnudo también se puede inyectar directamente en las células mediante, por ejemplo, la microinyección.

Alternativamente, también se puede introducir ADN desnudo en las células mediante la formación de un complejo del ADN con un catión, tal como polilisina, que se acopla a un ligando por un receptor de 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 U.S. N.º 5.166.320). La unión del complejo ADN-ligando al receptor facilita la captación del ADN por endocitosis mediada por receptor.

El uso de vectores virales que contienen secuencias de ácidos nucleicos particulares, por ejemplo, un ADNc que codifica una proteína, es un enfoque común para introducir secuencias de ácidos nucleicos 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. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector viral, generalmente se expresan 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 para fines de terapia génica (para una revisión véase Miller, A.D. *Blood* 76:271, 1990). Se puede construir un retrovirus recombinante que tenga una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de interés insertada en el genoma retroviral. Adicionalmente, las porciones del genoma retroviral se pueden eliminar para hacer que la replicación del retrovirus sea defectuosa. Tal retrovirus de replicación defectuosa luego se empaqueta en viriones que se pueden usar para infectar una célula blanco mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas estándares.

El genoma de un adenovirus se puede manipular de modo que codifique y exprese una proteína de interés pero se inactive en términos de 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 vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes son ventajosos porque no requieren que las células en división sean vehículos de administración génica efectivos y se pueden usar para infectar una amplia variedad de tipos celulares, que incluyen el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld *et al.*, 1992, citado supra), 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 allí contenido) no está integrado en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episomal, de este modo se evitan problemas potenciales que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis por inserción en situaciones donde el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, el ADN retroviral). Además, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para el ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) en relación con otros vectores de administración génica (Berkner *et al.* citados supra, Haj-Ahmand y Graham, *J. Virol.*, 57:267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales con replicación defectuosa actualmente en uso están suprimidos en la totalidad o parte de los genes virales E1 y E3, pero retienen hasta un 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 virus del herpes, como virus auxiliar para la replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión 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 exhibe 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; and McLaughlin *et al.*, *J. Virol.* 62:1963-1973, 1989). Los vectores que contienen como mínimo 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar e integrar. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector AAV tal como el descrito en Tratschin *et al.* (*Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260, 1985) se puede usar para introducir ADN en las células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores 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 método utilizado para introducir moléculas de ácido nucleico en una población de células da como resultado

la modificación de una gran proporción de células y la expresión eficiente de la proteína por las células, la población modificada de células se puede usar sin aislamiento adicional o subclonación de células individuales dentro de la población. Es decir, puede haber una producción suficiente de la proteína por parte de la población de células de modo que no se necesite más aislamiento celular y la población se pueda usar inmediatamente para sembrar un cultivo celular para la producción de la proteína. Alternativamente, puede ser deseable aislar y expandir una población homogénea de células a partir de unas pocas células o una única célula que produzca de manera eficiente la proteína.

En forma alternativa a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula que codifica una proteína de interés, el ácido nucleico introducido puede codificar otro polipéptido o proteína que induce o aumenta el nivel de expresión de la proteína producida endógenamente por una célula. Por ejemplo, una célula puede ser capaz de expresar una proteína particular pero puede no hacerlo sin tratamiento adicional de la célula. De manera similar, la célula puede expresar cantidades insuficientes de la proteína para el propósito deseado. Por lo tanto, un agente que estimula la expresión de la proteína de interés se puede usar para inducir o aumentar la expresión de esa proteína por parte de la célula. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida puede codificar un factor de transcripción que activa o regula por aumento la transcripción de la proteína de interés. La expresión de dicho factor de transcripción a su vez produce la expresión o la expresión más robusta de la proteína de interés.

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

Un gen que codifica una proteína de interés se puede unir opcionalmente a uno o más elementos reguladores de control genético. En ciertas realizaciones, un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva de la proteína. En ciertas realizaciones, se puede usar un elemento de control genético que proporciona la 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 la modulación de la producción de la proteína en la célula. Los ejemplos no limitantes de los 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 ligando sintético (véase, por ejemplo, Spencer, D.M. *et al.*, *Science* 262:1019-1024, 1993) y elementos regulados por la radiación ionizante (por ejemplo, véase Manome, Y. *et al.*, *Biochemistry* 32:10607-10613, 1993; Datta, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10149-10153, 1992). Se pueden usar sistemas reguladores específicos de células u otros conocidos en la técnica de acuerdo con la invención.

Un experto en la técnica será capaz de elegir y, opcionalmente, modificar de forma apropiada el método de introducción de genes que hacen que la célula exprese la proteína de interés de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

Aislamiento de la proteína expresada

En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar las proteínas expresadas de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, la proteína expresada se secreta en el medio y así se pueden eliminar las células y otros sólidos, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, como una primera etapa en el proceso de purificación.

Alternativamente, la proteína expresada puede estar unida a la superficie de la célula huésped. Por ejemplo, los medios se pueden eliminar y las células huésped que expresan la proteína se lisan como una primera etapa en el proceso de purificación. La lisis de las células huésped de mamífero se puede lograr mediante diversos medios bien conocidos por los expertos en la técnica, que incluye la alteración física por perlas de vidrio y la exposición a condiciones de pH alto.

La proteína expresada se puede aislar y purificar mediante métodos estándar que incluyen, pero sin limitación, la cromatografía (por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño y con hidroxipatita), la filtración en gel, la centrifugación o la solubilidad diferencial, la precipitación con etanol y/o cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (Véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification Principles and Practice* 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. y Hames, B.D. (eds.), *Protein Expression: A Practical Approach*, Oxford Univ Press, 1999; and 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, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia). Para la cromatografía de inmunoafinidad en particular, la proteína se puede aislar mediante su unión a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se generaron contra esa proteína y se fijaron a un soporte estacionario. Alternativamente, las marcas de afinidad, tales como una secuencia de revestimiento de gripe, polihistidina o glutatión-S-transferasa, se pueden unir a la proteína mediante técnicas recombinantes estándar para permitir una purificación fácil mediante el paso sobre la columna de afinidad apropiada. Se pueden añadir inhibidores de la proteasa, tales como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), la leupeptina, la pepstatina o la aprotinina en cualquiera o en todas las etapas con el fin de reducir o eliminar la degradación de la proteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de proteasa son particularmente ventajosos cuando las células se deben lisar para aislar y purificar la proteína expresada.

Un experto en la técnica apreciará que la técnica de purificación exacta variará de acuerdo con el carácter de la proteína para 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

5 En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Tal polipéptido o proteína producida se pueden administrar a un sujeto o se pueden formular primero para el suministro por cualquier vía disponible que incluye, pero sin limitación, las vías parenteral (por ejemplo, la intravenosa), la intradérmica, la subcutánea, la oral, la nasal, la bronquial, la oftálmica, la transdérmica (tópica), la transmucosa, la rectal y la vaginal. Las composiciones farmacéuticas incluyen, típicamente, un polipéptido o proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero, un agente de administración (es decir, un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, tensioactivo, etc., como se describió anteriormente) en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente, la frase "portador farmacéuticamente aceptable" incluye solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración deseada. Las soluciones o las suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como el agua para inyección, la solución salina, los aceites fijados, los polietilenglicoles, la glicerina, el propilenglicol u otros solventes sintéticos; los agentes antibacterianos, tales como el alcohol bencílico o el metil parabenos; los antioxidantes, tales como el ácido ascórbico o el bisulfito de sodio; los agentes quelantes, tales como el ácido etilendiaminotetraacético; los tampones, tales como los acetatos, los citratos o los fosfatos y los agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como el cloruro de sodio o la dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encapsular en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se deben preservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el portador relevante puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, el glicerol, el propilenglicol y el polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la 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 microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, los parabenos, el clorobutanol, el fenol, el ácido ascórbico, el timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, los azúcares, los polialcoholes, tales como el manitol, el sorbitol o el cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede realizar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del polipéptido o proteína purificado en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del polipéptido o proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril de este.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificado se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador fluido para usar como enjuague bucal. Los agentes aglutinantes y/o los materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, las pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como la celulosa microcristalina, la goma de tragacanto o la gelatina; un excipiente tal como el almidón o la lactosa, un agente disgregante tal como el ácido algínico, el Primogel o el almidón de maíz; un lubricante tal como el estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante, tal como el dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante, tal como la sacarosa o la sacarina; o un agente saborizante, tal como la menta, el salicilato de metilo o el sabor de naranja. Las formulaciones para la administración oral pueden incorporar

de manera ventajosa agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o potenciar la absorción.

Para la administración por inhalación, las composiciones de la invención que comprenden un polipéptido o proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero y un agente de administración se administran con preferencia en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como el dióxido de carbono o un nebulizador. La presente invención particularmente contempla la administración de las composiciones usando un pulverizador nasal, un inhalador u otro suministro directo a la vía aérea superior y/o inferior. Se ha demostrado que la administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra virus de la gripe induce respuestas de células T CD8, lo que indica que al menos algunas células en el tracto respiratorio pueden captar ADN cuando se administran por esta vía, y los agentes de administración de la invención potenciarán la captación celular. De acuerdo con ciertas 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 como partículas porosas grandes para la administración en aerosol.

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

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

En algunas realizaciones, las composiciones se preparan con portadores que protegerán el polipéptido o la proteína contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como el acetato de etilvinilo, los polianhídridos, el ácido poliglicólico, el colágeno, los poliortoésteres y el ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente U.S. N.º 4.522.811.

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

El polipéptido o proteína expresado de acuerdo con la presente invención se puede administrar a diversos intervalos y durante diferentes periodos de tiempo según se requiera, por ejemplo, una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, entre aproximadamente 2 y 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas, aproximadamente 4, 5 o 6 semanas, etc. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requeridos para tratar efectivamente a un sujeto, que incluyen, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Generalmente, el tratamiento de un sujeto con un polipéptido o proteína como se describe en la presente puede incluir un tratamiento único o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Se entiende además que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y, opcionalmente, se pueden adaptar al receptor particular, por ejemplo, mediante la administración de dosis crecientes hasta que se logre una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del polipéptido o proteína específico empleado, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad para modular.

La presente divulgación que no es reivindicada incluye el uso de composiciones para el tratamiento de animales no humanos. Por consiguiente, las dosis y los métodos de administración se pueden seleccionar de acuerdo con los principios conocidos de farmacología y medicina veterinaria. Se pueden encontrar lineamientos, por ejemplo, en Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8ª edición, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Los medios que comprenden diversas concentraciones de L-tirosina (tirosina 2Na2H2O), PVA (Sekisui Chemical Co, Selvol™ 203) y Pluronic F68 (Kolliphor P188, Sigma) y concentraciones fijas de Ala, Arg, Asn, Asp, Cistina, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val se prepararon usando medio de alimentación A como material de partida. Se prepararon medios de acuerdo con el procedimiento descrito en la Tabla 1 para medio que comprende 5 g/L de PVA y 3 o 12 mM de Tyr, Tabla 2 para medio que no comprende PVA, 5 g/L de Pluronic F68 y 3 o 12 mM de Tyr y la Tabla 3 para medio que no comprende PVA, sin Pluronic F68 y con 3 o 12 mM de Tyr. El resto de los medios se prepararon mezclando los 6 medios anteriores para obtener las concentraciones correspondientes de PVA, Pluronic F68 y Tyr. Todos los medios tuvieron una osmolaridad final de 1000-1300 mOsm y un pH de 7,1-7,3. Todos los medios se filtraron estériles a través de una unidad de filtro de 0,2 µm y se almacenaron en frascos de filtro Nalgen de 0,2 µm en frío (2-8 °C) y protegidos de la luz.

Tabla 1-Medio con 5 g/L de PVA, 3 mM o 12 mM de Tyr

Medio de alimentación A (polvo)	139,17	g/L
PVA 60 g/L	83,3	mL/L
Tirosina 2Na 2H ₂ O (predisolver)	0,785 o 3,14	g/L
Adición de NaOH 10 N para ajustar el pH a 9,0 +/-0,1 a 18-22 °C		
Cistina ácida (400 mM)	11,7	mL/L
Ajustar pH a 7,2+/-0,1 a 18-22 °C		

15

Tabla 2 Medios con 5 g/L de Pluronic F68, 3 mM de Tyr o 12 mM de Tyr

Medio de alimentación A (polvo)	139,17	g/L
Pluronic F68	5	g/L
Tirosina 2Na 2H ₂ O (predisolver)	0,785 o 3,14	g/L
Ajustar pH a 9,0 +/-0,1 a 18-22 °C		
Cistina ácida (400 mM)	11,7	mL/L
Ajustar pH a 7,2+/-0,1 a 18-22 °C		

Tabla 3 Medios sin PVA, sin Pluronic F68, 3 mM de Tyr o 12 mM de Tyr

Medio de alimentación A(polvo)	139,17	g/L
Tirosina 2Na 2H ₂ O(predisolver)	0,785 o 3,14	g/L
Ajustar pH a 9,0 +/-0,1 a 18-22 °C		
Cistina ácida (400 mM)	11,7	mL/L
Ajustar pH a 7,2+/-0,1 a 18-22 °C		

20

Se tomaron muestras en los días indicados en la Tabla 4 para la medición de turbidez mediante un Turbidímetro 2100P (HACH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. D0 es la fecha de inicio para el almacenamiento de medios para todas las condiciones. No se tomaron muestras de los medios con precipitaciones para la medición de la turbidez durante el resto de los tiempos de muestreo después de la precipitación, pero continuaron almacenados en frío (2 a 8 °C) y oscuridad. Los medios con una turbidez de 50 NTU y superior son visibles por precipitación.

Tabla 4

ES 2 992 543 T3

	PVA (g/L)	Plur.	Tyr (mM)	D1		D4		D8		D15		D27	
				T	P	T	P	T	P	T	P	T	P
1	0	0	3	1,67	No	1,73	No	1,78	No	1,5	No	1,55	No
2	0	0	6	1,76	No	1,66	No	1,63	No	1,54	No	6,99	No
3	0	0	9	1,79	No	122	Sí						
4	0	0	12	79,8	Sí								
5	2,5	0	3	1,77	No	1,74	No	1,77	No	1,71	No	9,47	No
6	2,5	0	6	1,67	No	2,41	No	1,67	No	1,66	No	1,82	No
7	2,5	0	9	1,62	No	1,64	No	1,63	No	1,45	No	1,92	No
8	2,5	0	12	1,57	No	1,59	No	1,69	No	1,35	No	7,94	No
9	0	2,5	3	1,76	No	1,77	No	2,62	No	98,1	Sí		
10	0	2,5	6	1,74	No	2,11	No	2,19	No	152	Sí		
11	0	2,5	9	7,14	No	95,7	Sí						
12	0	2,5	12	>Lim	Sí								
13	5	0	3	1,86	No	2,17	No	2,09	No	2,84	No	13,4	No
14	5	0	6	1,75	No	1,79	No	2,05	No	2,03	No	14,1	No
15	5	0	9	1,68	No	1,66	No	1,8	No	1,6	No	11,3	No
16	5	0	12	1,68	No	1,69	No	1,74	No	1,54	No	2,92	No
17	0	5	3	1,97	No	2,54	No	87,6	Sí				
18	0	5	6	1,94	No	2,05	No	52,8	Sí				
19	0	5	9	24,2	No	248	Sí						
20	0	5	12	>Lim	Sí								

T: turbidez (NTU), P: precipitación, >Lim: por encima del límite

Turbidez por debajo de 5 NTU es normal.

Los medios sin PVA con una concentración de tirosina superior a 6 mM formaron precipitados dentro de 4 días (ver las muestras 3 y 4). Todos los medios con Pluronic F68 han precipitado durante el tiempo de almacenamiento (4 semanas), los medios de concentración de tirosina más altos precipitaron antes que aquellos con concentraciones de tirosina más bajas. En presencia de PVA, la turbidez se mantuvo baja y no se observó precipitado, incluso después de 27 días de almacenamiento.

5

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular que comprende tirosina a una concentración de al menos 5 mM y alcohol polivinílico (PVA), donde la concentración de PVA está entre 0,5 y 5 g/L.
- 5 2. El medio de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 1 donde la concentración de tirosina es de al menos 10 mM.
3. El medio de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 1 donde la concentración de tirosina está entre 5 y 20 mM.
4. El medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la concentración de PVA es de al menos 0,5 g/L.
- 10 5. El medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de PVA es de 2,5 g/L.
6. El medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicho medio está libre de proteína.
- 15 7. El medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la turbidez es menor de 5 NTU después de dos semanas de almacenamiento a 4 °C en ausencia de luz.
8. El medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que esencialmente no se observa precipitado después de dos semanas de almacenamiento a 4 °C en ausencia de luz.
- 20 9. El medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el medio comprende 4 a 10 mM de Ala, 30 a 60 mM de Arg, 50 a 90 mM de Asn, 10 a 30 mM de Asp, 2 a 40 mM de Glu, 2 a 15 mM Gly, 8 a 20 mM de His, 25 a 32 mM de Ile, 35 a 60 mM de Leu, 28 a 60 mM de Lys, 9 a 25 mM de Met, 10 a 30 mM de Phe, 15 a 40 mM de Pro, 44 a 80 mM de Ser, 20 a 45 mM de Thr, 2 a 10 mM de Trp y 20 a 50 mM de Val.
10. Un método de cultivo celular que comprende poner en contacto células de mamíferos con un medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. El método de la reivindicación 10, en el que las células de mamífero son células CHO.
- 25 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que el cultivo celular es un cultivo alimentado por lotes.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el cultivo alimentado por lotes comprende un medio base suplementado con medio de alimentación.
14. El método de la reivindicación 13, en el que solo el medio base es un medio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 30 15. El método de la reivindicación 13, en el que solo el medio de alimentación es un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
16. El método de la reivindicación 13, en el que el medio base y el medio de alimentación son medios de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en el que la densidad de células viables máxima durante el cultivo celular es superior a 1×10^6 células/mL.
18. El método de la reivindicación 17, en el que la densidad de células viables máxima es superior a 5×10^6 células/mL, 1×10^7 células/mL, 5×10^7 células/mL, 1×10^8 células/mL o 5×10^8 células/mL.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, donde el volumen del medio de cultivo celular es al menos 500 L.
- 40 20. El método de la reivindicación 19, en el que el volumen del medio de cultivo celular es de al menos 5000 L.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20, en el que las células expresan una proteína recombinante.
- 45 22. El método de la reivindicación 21, en el que la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos o fragmentos de estos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio único, Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (SMIP), anticuerpos VHH, anticuerpos de camélidos, polipéptidos de dominio único de tiburón (IgNAR), armazones de dominio único (por ejemplo, armazones de fibronectina), polipéptidos de cadena simple que comprenden un dominio de unión N-terminal, un dominio efector y un dominio de unión C-terminal, factores de crecimiento, factores de coagulación, citoquinas, proteínas de fusión, principios activos farmacológicos, vacunas,

enzimas y combinaciones de estos.

23. El método de la reivindicación 21 o 22, que además comprende obtener la proteína recombinante producida por las células.

24. El método de la reivindicación 23, que además comprende purificar la proteína recombinante.