

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 563**

51 Int. Cl.:
C12N 5/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03718742 .4**
86 Fecha de presentación : **08.04.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1495112**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Medio de cultivo celular.**

30 Prioridad: **08.04.2002 GB 0208041**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Lonza Biologics plc.**
228 Bath Road
Berkshire, Slough SL1 4DY, GB

72 Inventor/es: **Mainwaring, David y**
Wayte, Jeremy

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 271 563 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

Medio de cultivo celular.

La presente invención se refiere en general al campo del cultivo de células animales. Se elabora un método para cultivar células animales para la producción de proteínas terapéuticas y otras proteínas útiles, y un medio de cultivo celular respectivo.

Se sabe que butirato sódico y otras sales de ácido butírico incrementan el rendimiento de proteína producida en un cultivo de células animales, como se describe, p.ej., en el documento EP-239 292 A. El efecto se puede observar para proteínas secretadas de forma natural, p.ej. anticuerpos de hibridomas, o en líneas celulares recombinantes. Se añade butirato al medio de cultivo celular preferiblemente en una concentración de hasta 5 mM. El efecto de ácido butírico es bastante específico, como se confirma mediante la abundancia de bibliografía científica sobre la adición de ácido butírico al medio de cultivo; propionato o pentanoato son considerablemente menos eficaces a concentraciones de alrededor de 1 mM.

Sin embargo, hay limitaciones y desventajas con respecto al uso de butirato como complemento de cultivos celulares. La adición de butirato en el intervalo de 0,1-10 mM necesita ser equilibrada cuidadosamente para evitar la sobredosis y los efectos tóxicos y citostáticos resultantes. El efecto negativo sobre la velocidad de crecimiento puede ser drástico incluso tras incrementos menores en la concentración. Para cada línea celular y clon recombinante, se debe elegir cuidadosamente la cantidad óptima de butirato y se debe controlar durante el cultivo en biorreactor a gran escala. P.ej., según el documento EP-239 292 A, se recomienda un intervalo de concentración de 0,1 mM a 1 mM para células de hibridoma, mientras otras líneas celulares pueden tolerar bien butirato a concentraciones superiores a 1 mM. Se sabe que las células de hibridoma son mucho más sensibles que otros tipos celulares a los efectos adversos de, p.ej., oxígeno insuficiente o aporte de nutrientes insuficiente, o a las influencias tóxicas de compuestos químicos, y que comenzarán fácilmente y de manera irreversible la muerte celular programada una vez que hayan recibido tales estímulos negativos. En vista de ello, se ha demostrado que butirato es un medio hasta cierto punto contraproducente para incrementar la productividad en un cultivo celular.

Kim *et al.* (Biotechnology and Bioengineering 71, 2001, 184-193, Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in CHO cells resulting in enhanced humanized antibody production) contrarrestó el efecto citotóxico de butirato sódico 5 mM por medio de líneas celulares recombinantes de bcl-2, lo que dio como resultado la producción incrementada de proteínas. Sin embargo, este método necesita ingeniería considerable de líneas celulares para crear recombinantes que produzcan tanto bcl-2 recombinante como un producto proteico. Sería ventajoso un método más simple para contrarrestar los efectos negativos de los complementos de los medios de butirato.

El documento US 5378 612 describe el efecto sinérgico e incrementador del rendimiento de proteína de la adición de sales de litio (10 mM) o lipopolisacáridos (LPS, 1 µg/ml) a un medio de cultivo para el cultivo de células CHO que ya comprende butirato sódico 1 mM. Para dos sales de litio diferentes, el efecto

en el rendimiento fue del orden de 1,3 veces, mientras LPS mostró un efecto incrementador de alrededor de 4 veces en comparación con el control de butirato. De manera interesante, se demostró que acetato sódico 10 mM literalmente no resulta beneficioso en comparación con el control en este sistema de ensayo.

Kooistra *et al.* (Biochem. J. 1987, Butyrate stimulates tissue-type plasminogen-activator synthesis in cultured human endothelial cells, 247:605-612) ensayó en cultivo de células endoteliales que contenía suero diversos compuestos en función de su efecto potencialmente incrementador de la expresión sobre la producción de tPA, entre ellos diversos ácidos alcanoicos que incluyen acetato 5 mM. Solamente se descubrió que propionato, valerato y, con un efecto destacado, butirato tenían tal efecto. Acetato no difirió significativamente del control.

Es un objetivo de la presente invención evitar las desventajas de la técnica anterior y elaborar otro método para incrementar el rendimiento de producto proteico en un cultivo de células animales.

Este objetivo se consigue según la presente invención mediante un método para cultivar células animales en el que se complementa con acetato un medio de cultivo celular; otro objetivo de la presente invención son los medios de cultivo celular correspondientes que comprenden acetato según las reivindicaciones independientes 1, 6, 10, 11 y 12.

Las realizaciones posibles de la invención se muestran en las figuras y tablas:

La Fig. 1 muestra el efecto de acetato potásico y sódico sobre la productividad de NS0 en cultivo semicontinuo en matraz con agitación.

La Fig. 2 muestra los perfiles de crecimiento de NS0 para fermentaciones en biorreactor semicontinuo que no contienen acetato sódico o que contienen acetato sódico 10 mM.

La Fig. 3 muestra el efecto de acetato sódico 10 mM sobre la productividad de NS0 en la fermentación realizada según la Fig. 2.

La Fig. 4 compara el efecto sobre NS0 de la inclusión de acetato sódico en los cultivos de siembra (en la siembra) y el momento de la adición de acetato posterior (al sembrar o durante la fase exponencial, es decir, en la alimentación). Todos los valores se expresan como diferencia en porcentaje respecto del control.

Las Figs. 5, 6 muestran el crecimiento y la productividad de anticuerpo de células NS0 recombinantes con acetato 7,5 mM en un medio de cultivo de elevada densidad hecho a medida.

Las Figs. 7, 8 muestran las curvas dosis-respuesta para la complementación de un cultivo de células NS0 con acetato sódico.

Las Figs. 9-11 muestran datos comparativos para la complementación de un medio de cultivo de células NS0 con n-butyrate sódico.

Las Figs. 12-14 muestran curvas dosis-respuesta para la complementación de un cultivo celular de hibridoma VPM 8 con acetato sódico.

Las Figs. 15-17 muestran datos comparativos para la complementación de un cultivo celular de hibridoma VPM 8 con n-butyrate sódico.

Según la presente invención, se elabora un método para producir una proteína, en el que la proteína producida se expresa a partir de una célula de mamífero en cultivo celular y se produce durante al menos un cierto espacio de tiempo durante el cultivo celular. Es decir, la proteína producida puede ser expresada

de forma constitutiva por la célula, o la expresión se podría inducir en algún momento proporcionando un estímulo particular a la célula. Preferiblemente, se expresa de forma constitutiva. El método según la presente invención comprende además las etapas de

- a) preparar un medio de cultivo celular para células mamíferas,
- b) y añadir además ácido acético o una sal de acetato o un éster de acetilo biológicamente activado hasta una concentración final de 1 a 20 mM, preferiblemente de 3 a 15 mM, más preferiblemente de 5 a 12 mM, y lo más preferiblemente de 6 a 9,5 mM, y dicha adición se lleva a cabo directamente en el medio antes de comenzar el cultivo celular o se alimenta en el medio durante el cultivo celular,
- c) cultivar adicionalmente la célula mamífera en dicho medio con la expresión concomitante del producto proteico,
- d) y finalmente recoger dicha proteína del cultivo celular.

En una realización adicionalmente preferida, la concentración de ácido acético o de la sal o del éster biológicamente activado es de 6 a 20 mM, más preferiblemente de 6 a 12 mM, y lo más preferiblemente de 6 a 9,5 mM, como se puede deducir de la combinación de los intervalos de concentración preferidos anteriormente mencionados.

Un producto génico según la presente invención es el producto proteico que se intenta expresar y recoger en cantidad elevada. Puede ser cualquier proteína de interés, p.ej. proteínas terapéuticas, tales como interleucinas o enzimas, o proteínas multiméricas o subunidades de proteínas multiméricas, tales como anticuerpos o sus fragmentos. El producto génico recombinante puede incluir una porción de secuencia que codifica una secuencia señal que permite la secreción del polipéptido una vez expresado de la célula hospedadora productora. El producto proteico puede ser una proteína recombinante expresada a partir de un promotor transgénico, o es un locus genético activo de forma natural, tal como p.ej. un locus de gen de inmunoglobulina en células de hibridoma creadas mediante métodos convencionales de fusión celular. Los métodos de recogida y de procesamiento posterior para la purificación de la proteína del caldo de cultivo se conocen en la técnica y son una tarea rutinaria. Inicialmente, se aplican a menudo métodos tales como centrifugación, ultrafiltración y/o cromatografía de intercambio iónico, ya que permiten el procesamiento de volúmenes elevados.

Una sal de acetato según la presente invención puede ser cualquier sal, tal como sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, o se pueden emplear sales de acetato de cualquier otro metal. Ya que los medios normalmente están tamponados, también es concebible la adición de ácido acético o anhídrido acético, aunque se preferirá una sal. De forma similar, se pueden emplear sales de complejos fácilmente disociables de acetato o de ésteres de ácido acético que van a liberar acetato *in situ* en el medio de cultivo durante el cultivo, debido a una velocidad elevada de hidrólisis o debido a la actividad de exoenzimas celulares. Se pueden denominar, en particular si se aplica

a la actividad exoenzimática, ésteres "biológicamente activables". Las sales de acetato de metales alcalinos y alcalinotérreos son realizaciones preferidas de la presente invención. Más preferiblemente, la sal es una sal de metal alcalino, a condición de que el metal alcalino no sea litio, y lo más preferiblemente, es acetato sódico. Se prefiere particularmente acetato sódico en combinación con un intervalo de concentraciones de 6 a 9,5 mM en un medio de crecimiento celular, a diferencia de un medio de mantenimiento, y mediante tratamiento de las células con acetato sódico al comienzo o antes del comienzo del cultivo celular o ambos, como se expone más adelante.

Preferiblemente, el medio de cultivo celular de la presente invención está desprovisto de butirato. Butirato disminuye fácilmente la velocidad de crecimiento e induce la apoptosis; es necesario equilibrar cuidadosamente su concentración. Sin embargo, según la presente invención, se puede sustituir fácilmente por acetato, que casi no muestra efecto sobre la velocidad de crecimiento, o muestra un efecto muy moderado. No se sabe que acetato induzca la apoptosis.

Según la presente invención, se añade acetato o sus equivalentes directamente al medio fresco antes de comenzar el cultivo celular, o se alimenta en el medio durante el cultivo celular, preferiblemente durante el crecimiento en fase exponencial en un medio de crecimiento. En caso de adición mediante alimentación, se debería tener en cuenta que el efecto de acetato tiene lugar con cierto retardo, es decir, es observable una fase de retardo con respecto al efecto incrementador del rendimiento de producto proteico. En general, la adición de acetato por medio solamente de la alimentación es menos eficaz. La adición de acetato directamente al medio de cultivo celular, preferiblemente un medio de cultivo de crecimiento celular, antes de cultivar las células y en las cantidades expuestas anteriormente se prefiere claramente según la presente invención, opcionalmente en conjunción con alimentación adicional de acetato dependiendo de la concentración. Lo más preferiblemente, acetato se añade solamente de forma directa al medio de cultivo antes del inicio del cultivo, en las cantidades expuestas anteriormente y en particular 6 a 9 mM y en forma de acetato sódico, y no se repone durante el cultivo celular por medio de la alimentación, y preferiblemente no se repone durante el crecimiento del cultivo en un medio adecuado, tal como un medio de crecimiento de elevada densidad de células.

La adición al medio antes de comenzar el cultivo celular según la presente invención significa exponer a las células aproximadamente en el momento de la siembra, que incluye la fase de retardo inicial antes del inicio del crecimiento detectable, o exponerlas incluso antes de la siembra del medio de cultivo a acetato o a sus equivalentes en las cantidades anteriormente expuestas. De nuevo, "antes de la siembra" significa que el propio precultivo de siembra se hace crecer en un medio que comprende el complemento de medio con acetato en las cantidades anteriormente expuestas. También es posible combinar ambos aspectos. En una realización particularmente preferida, solamente se trata el cultivo de siembra con acetato en las cantidades anteriormente expuestas, mientras el medio de crecimiento del cultivo celular usado para el cultivo de producción a gran escala está desprovisto de sales de acetato en el intervalo de >1 mM.

Las células o líneas celulares adecuadas pueden ser cualquier línea celular de mamífero. Las líneas celulares adecuadas pueden ser, p.ej., células de riñón de mono inmortalizadas con SV-40 (COS-7), células de riñón caninas (MDCK), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de riñón de hámster (BHK) tales como ATCC CCL10, hepatocitos humanos (Hep G2), células linfocíticas (línea de células T Jurkat), células de hibridoma (p.ej. SP2/0-Ag14, Shulman *et al.* 1977) o células de “mieloma” (tales como, p.ej., células NS0). Se debe entender que no todas esas células responderán igualmente bien a la adición de acetato al medio de cultivo celular. Además, para un tipo celular o línea celular dada, el efecto de acetato puede no ser lineal o constante dentro de los intervalos de concentraciones de acetato especificados anteriormente. Dependiendo de la línea celular, puede exhibir una concentración individual óptima en la que el efecto incrementador del rendimiento de acetato es máximo, y disminuye cuando se desplaza la concentración de acetato a cantidades menores o mayores; la concentración óptima puede variar considerablemente entre tipos celulares, y puede necesitar ser establecida mediante experimentación simple de dosis-respuesta.

Los medios y métodos de cultivo adecuados para las líneas celulares de mamífero se conocen en la técnica, como se describió por ejemplo en el documento US 5633162. Los ejemplos de medios de cultivo celular estándar para matraz de laboratorio o cultivo celular de baja densidad y que están adaptados a las necesidades de los tipos celulares particulares son, por ejemplo: medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Morre, G., *The Journal of the American Medical Association*, 199, pág. 519 y sgte. 1967), medio L-15 (Leibovitz, A. *et al.*, *Amer. J. of Hygiene*, 78, pág. 173 y sgtes., 1963), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio de Ham F12 (Ham, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sc.* 53, pág. 288 y sgtes., 1965) o DMEM modificado por Iscoves que carece de albúmina, transferrina y lecitina (Iscoves *et al.*, *J. Exp. Med.* 1, pág. 923 y sgtes., 1978). Se sabe que tales medios de cultivo se pueden complementar con suero bovino fetal (FBS, también denominado FCS), el cual proporciona una fuente natural de una plétora de hormonas y factores de crecimiento. El cultivo celular de células de vertebrados y mamíferos, respectivamente, se ha convertido en una cuestión rutinaria y se trata con detalle, p.ej., en R. Ian Fresney, *Culture of Animal cells*, a manual, 4ª edición, Wiley-Liss/N.Y., 2000.

Preferiblemente, el medio de cultivo celular según la presente invención es un medio que permite y mantiene el crecimiento de las células animales así cultivadas. El crecimiento se considera un incremento en la densidad de células viables durante al menos un cierto período del cultivo celular. Según la presente invención, tal definición de “medio de crecimiento” se debe considerar opuesta a la expresión “medio de mantenimiento” en su significado habitual en la técnica. Un medio de mantenimiento es un medio de cultivo celular que mantiene la viabilidad celular, pero que no estimula el crecimiento celular. Con frecuencia, tales medios de mantenimiento no contienen factores de crecimiento esenciales, tales como transferrina, insulina, albúmina y similares.

Dicha realización en la que el medio es un me-

dio de cultivo de células de mamífero que comprende acetato o sus equivalentes en las cantidades anteriormente mencionadas se aplica en particular al cultivo o a un medio adecuado para el cultivo de células linfoides, tales como, p.ej., células de hibridoma y mieloma. El término hibridoma incluye no solamente células secretoras de anticuerpos obtenidas mediante fusión celular, que incluyen los denominados cuadromas y similares, sino también células linfocíticas B, secretoras de anticuerpos, obtenidas mediante inmortalización con un agente inmortalizador, tal como un producto génico recombinante que tiene actividad en el ciclo celular o un virus, p.ej. virus de Epstein-Barr, o cualquier agente inmortalizador químico. En el presente contexto, “hibridoma” se extiende también a hibridomas no secretores, tales como, p.ej., SP2/0-Ag14, Shulman *et al.* 1977. Por lo tanto, un producto proteico que se desea recoger de un hibridoma en el presente contexto no se refiere necesariamente a un producto génico homólogo tal como un anticuerpo de una célula precursora, sino que puede ser también un producto proteico recombinante.

Preferiblemente, las células son “mieloides”, lo más preferiblemente son una línea celular NS0 de mieloma (tal como, p.ej., la línea celular ECACC N° 85110503 y sus derivados, disponibles libremente de la European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido). Las células “mieloides” son líneas celulares tumorales de las que NS0 es un ejemplo. Las células NS0 son realmente plasmocitomas, y en consecuencia son del linaje celular linfoide de linfocitos B, como lo son los hibridomas, aunque se denominan en la técnica rutinariamente y de forma bastante incorrecta células “mieloides” (Barnes *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123, 2000). Los tipos celulares correspondientes son, en consecuencia, igualmente realizaciones particularmente preferidas. Se ha descubierto que las células NS0 de “mieloma” dan origen a rendimientos de producto extremadamente elevados, en particular si se usan para la producción de anticuerpos recombinantes. La mayoría de las líneas celulares NS0 estándar son dependientes de colesterol, lo que hace que el colesterol sea habitualmente un componente obligado del medio de cultivo. Según la presente invención, las células linfoides comprenden células de hibridoma generadas mediante varios métodos a partir de células secretoras de anticuerpos, tales como fusión celular con líneas celulares tumorales adecuadas, que incluyen la fusión con líneas celulares de hibridomas no secretoras que dan origen a los denominados triomas, o inmortalización con un agente de transformación o virus, así como cualquier otra línea celular linfoide. En otra realización preferida, sin embargo, una célula o línea celular de mamífero según la presente invención no es una línea celular de hibridoma, lo que significa que es una línea celular que no es de hibridoma, y más preferiblemente es una línea celular recombinante que no es de hibridoma, y lo más preferiblemente una línea celular de “mieloma” recombinante como se definió anteriormente.

En una realización adicionalmente preferida, la línea celular es una línea celular NS0 que es capaz de expresar glutamina sintetasa (GS) recombinante. Las células NS0 son específicamente ventajosas si se usan con el sistema de expresión de glutamina sintetasa (GS) (Bebington *et al.*, 1992, High-level expression

of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker, *Bio/Technology* 10:169-175; Cockett *et al.*, 1990, High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using Glutamine synthetase gene amplification, *Bio/Technology* 8: 662-667). Preferiblemente, la secuencia génica del producto proteico y la secuencia génica de GS se portan en un único vector plasmídico de GS para generar dicha línea celular NS0 transfectada, y dichos genes se expresan a partir de los mismos o de diferentes promotores que emplean, p.ej., sitios internos de entrada al ribosoma. El sistema GS es uno de solamente dos sistemas que son de importancia particular para la producción de proteínas terapéuticas. En comparación con el sistema de dihidrofolato reductasa (DHFR), el sistema GS, y en particular el sistema GS usado en combinación con células de mieloma NS0, ofrece una gran ventaja durante el desarrollo porque se pueden crear a menudo líneas celulares sumamente productivas a partir de la transfección inicial, por lo que se evita la necesidad de múltiples rondas de selección en presencia de concentraciones crecientes de agente selectivo para conseguir la amplificación génica (Brown *et al.*, 1992, Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system, *Cytotechnology* 9:231-236). Las células NS0 son fenotípicamente deficientes en glutamina sintetasa. Por lo tanto, la línea celular NS0, que se derivó de una línea celular tumoral de ratón (Galfre, G. y Milstein, C., *Methods in Enzymol.* 73, 3-75, 1981), es con frecuencia la línea celular de elección usada en combinación con el sistema GS a escala industrial.

Preferiblemente, el medio de cultivo celular según la presente invención está desprovisto de suero bovino fetal (FCS o FBS), que entonces se denomina "sin suero". Las células en medio sin suero necesitan generalmente insulina y transferrina en un medio sin suero para un crecimiento óptimo. La transferrina se puede sustituir al menos parcialmente por agentes quelantes no peptídicos o sideróforos, tales como tropolona, como se describió en el documento WO 94/02592, o por concentraciones incrementadas de una fuente de hierro inorgánico favorablemente en conjunción con antioxidantes, tales como vitamina C. La mayoría de líneas celulares necesitan uno o más factores de crecimiento sintéticos (que comprenden polipéptidos recombinantes), que incluyen, p.ej., factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a insulina I y II (IGFI, IGFI), etc. Otras clases de factores que pueden ser necesarios incluyen: prostaglandinas, proteínas de transporte y de unión (p.ej. ceruloplasmina, lipoproteínas de elevada y baja densidad, albúmina de suero bovino (BSA)), hormonas, que incluyen hormonas esteroideas, y ácidos grasos. El ensayo de factores polipeptídicos se realiza mejor por etapas mediante el ensayo de nuevos factores polipeptídicos en presencia de aquellos que se descubrió que son estimuladores del crecimiento. Los factores de crecimiento son sintéticos o recombinantes. Hay varias aproximaciones metodológicas conocidas en el cultivo de células animales, y una aproximación ejemplar se describe a continuación. La etapa inicial es obtener condiciones en las que las células sobrevivirán y/o crecerán lentamente durante 3-6 días después de la transferencia desde un medio de cultivo comple-

mentado con suero. En la mayoría de los tipos celulares, esto es al menos en parte una función de la densidad de la siembra. Una vez que se halla el complemento de hormona/factor de crecimiento/polipéptido óptimo, disminuirá la densidad de la siembra necesaria para la supervivencia.

En una realización más preferida, el medio de cultivo celular según la presente invención carece de proteínas, más preferiblemente es un medio de crecimiento sin proteínas, es decir, carece tanto de suero fetal como de complementos de factores de crecimiento proteicos individuales u otras proteínas, tales como transferrina recombinante o albúmina de suero para la unión y el transporte de lípidos.

Lo más preferiblemente, es un medio sin proteínas como se definió anteriormente, pero al que se le ha añadido albúmina recombinante o purificada o una variante de secuencia o su fragmento. Se debería notar, sin embargo, que incluso para líneas celulares NS0 que normalmente necesitan colesterol como complemento del medio, se ha informado de la obtención de subespecies independientes de colesterol que se pueden cultivar y hacer crecer continuamente para la producción de proteínas (Lonza Biologics, RU). Los medios de cultivo sin proteínas según la presente invención son particularmente preferidos en conjunción con el uso de líneas celulares de mieloma tales como NS0.

Una realización posible adicionalmente preferida del método y del medio de cultivo celular especificado más adelante de la presente invención es la fermentación de elevada densidad o la fermentación de crecimiento de elevada densidad de las células animales, p.ej. en un biorreactor semicontinuo industrial tal como un biorreactor de burbujeo o de perfusión hasta una densidad de células viables de 10^5 células/ml o más, preferiblemente 10^6 células/ml. Por lo tanto, se tiene que emplear un medio de cultivo de crecimiento de elevada densidad. Tales medios de cultivo de elevada densidad se pueden complementar habitualmente con nutrientes tales como todos los aminoácidos, fuentes de energía tales como glucosa en el intervalo dado anteriormente, sales inorgánicas, vitaminas, elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), tampones, los cuatro nucleósidos o sus nucleótidos correspondientes, antioxidantes tales como glutatión (reducido), vitamina C y otros componentes tales como lípidos de membrana importantes, p.ej. colesterol o fosfatidilcolina o precursores lipídicos, por ejemplo colina o inositol. Un medio de elevada densidad se enriquecerá en la mayoría de estos compuestos o en todos ellos, y los comprenderá, excepto para las sales inorgánicas en las que se basa la regulación de la osmolaridad del medio esencialmente isotónico, en cantidades mayores (enriquecidas) que los medios estándar anteriormente mencionados según se puede deducir de los documentos EP-435 911 A o GB-2251249 en comparación con RPMI 1640. El documento GB-2251249 proporciona ejemplos de medios de crecimiento de elevada densidad. De acuerdo con la presente invención, tal medio de cultivo celular de elevada densidad comprende acetato en las cantidades expuestas anteriormente, preferiblemente en ausencia de un butirato. De forma adicionalmente preferida, un medio de cultivo de elevada densidad según la presente invención está enriquecido de forma equilibrada en cuanto a que la ma-

yoría de los aminoácidos excepto triptófano están en exceso de 75 mg/l en el medio de cultivo. Más preferiblemente, en conjunción con la necesidad general de aminoácidos, las cantidades conjuntas de glutamina y asparagina están en total en un exceso de 1 g/l, lo más preferiblemente en un exceso de 2 g/l de medio de cultivo de elevada densidad. Por supuesto, la última realización más preferida es menos adecuada en el caso de una línea celular recombinante transfectada con un vector de glutamina sintetasa (GS), en particular después de que hayan tenido lugar las rondas de amplificación de la secuencia del gen de GS. En esas células, un exceso de, p.ej., glutamina conjuntamente de una fuente exógena y endógena conduciría a la producción de amoniaco, que se debe evitar.

En el contexto de la presente invención, el cultivo celular de elevada densidad se define como una población de células animales que tienen temporalmente una densidad de células viables de al menos 10^5 células/ml o más, preferiblemente al menos 10^6 células/ml o más; y cuya población se ha hecho crecer continuamente a partir de una única célula o siembra de densidad inferior de células viables en un medio de cultivo celular en un volumen de cultivo constante o creciente.

En una realización adicionalmente preferida, el cultivo celular según la presente invención es un cultivo semicontinuo en el que se alimenta el cultivo celular con otro u otros aminoácidos, que comprenden preferiblemente al menos glutamina, como se describió en el documento GB-2251249, para mantener su concentración en el medio, aparte de controlar la concentración de glucosa mediante alimentación separada. Más preferiblemente, la alimentación de glutamina y opcionalmente otro u otros aminoácidos, que comprenden de forma ideal glutamina, se combina con la alimentación de una o más fuentes de energía, tales como glucosa, al cultivo celular como se describió en el documento EP-229 809-A. Se puede sustituir al menos parcialmente glutamina por asparagina (para la sustitución de glutamina por asparagina véase Kurano, N. *et al.*, 1990, J. Biotechnology 15, 113-128). La alimentación se inicia normalmente a las 25-60 horas después del inicio del cultivo; por ejemplo, es útil comenzar la alimentación cuando las células han alcanzado una densidad de alrededor de 10^6 células/ml. Los aminoácidos que pueden estar presentes en la alimentación se dosificarán normalmente en el intervalo de 10 a 300 mg de adición total por aminoácido por litro de volumen de cultivo; en particular se alimentan normalmente glicocola, lisina, arginina, valina, isoleucina y leucina en cantidades superiores a, al menos, 150 a 200 mg por L de volumen de cultivo comparado con los otros aminoácidos. Excepto para las líneas celulares GS, puede ser beneficioso ajustar la alimentación total de glutamina y/o asparagina al intervalo de 0,5 a 3 g por L de volumen de cultivo, preferiblemente al intervalo de 1 a 2 g por L de volumen de cultivo. La alimentación se puede añadir en forma de adición rápida o como una alimentación bombeada continuamente, preferiblemente la alimentación se bombea casi continuamente en el biorreactor. Por supuesto, el pH se controla cuidadosamente durante el cultivo semicontinuo en un biorreactor a un pH aproximadamente fisiológico, óptimo para una línea celular dada, mediante la adición de una base o de tampón. Cuando se usa glucosa como fuente de energía, la alimentación de glucosa se ajusta normalmente

para mantener la concentración de glucosa del medio de 1 a 10 gramos, preferiblemente de 3 a 6 gramos por litro de cultivo. Aparte de la inclusión de aminoácidos, la alimentación comprende preferiblemente una cantidad baja de colina en el intervalo de 5 a 20 mg por litro de cultivo.

Son objetivos adicionales de la presente invención un medio de cultivo celular correspondiente que comprende un complemento de acetato adaptado, p.ej., para un cultivo de células NS0, un cultivo celular hecho de tal medio de cultivo celular y células linfoides y/o NS0, y un concentrado de medio para preparar tal medio. La descripción anterior se aplica de manera similar a estas realizaciones de la presente invención.

Experimentos

Donde no se especifique, la productividad o el título de anticuerpos se determinó mediante HPLC-proteína A.

Experimento 1

Se usó la línea celular GS-NS0 6A1(100)3, abreviada 6A1, que secreta IgG cB72.3 quimérica ratón/humano recombinante (Bebington, 1992, anteriormente mencionado) en todos los experimentos de esta sección. El cultivo celular se llevó a cabo en cultivo en matraz con agitación o en un modo semicontinuo en un biorreactor estándar 101 de burbujeo, esencialmente como se describió (Bebington, 1992). Las alimentaciones comprendieron esencialmente aminoácidos y carbohidratos como se describió anteriormente para los medios y la fermentación de elevada densidad, respectivamente. El volumen de alimentación fue de un 4% del volumen post-siembra. La alimentación se inició a una velocidad de 0,2 ml/Lh cuando la densidad de células viables excedió 14×10^5 células/ml. La temperatura se controló a 36,5 grados centígrados; para el burbujeo, la saturación de aire fue del 15%. El pH se controló a pH 7,00. El cultivo se sembró a 2×10^5 células viables/ml. El medio es medio de cultivo ProCH04-CDM (BioWhittaker) sin suero y esencialmente sin proteínas complementado con metionina sulfoximina (MSX) 50 mM. Las células se preadaptaron al medio. Se observaron incrementos en el rendimiento de proteína de hasta el 98% (desde 470 mg/L del control hasta 768 mg/L para una cepa cultivada con acetato 10 mM). Se descubrió que el acetato no inhibe el crecimiento. Disminuyó ligeramente la velocidad de crecimiento, pero no disminuyeron las densidades máximas de células viables. De forma positiva, prolongó la fase estacionaria en la fermentación.

El tiempo de acumulación de células (10^6 células/h ml) se calculó mediante la integración de la curva de crecimiento celular, esencialmente como describió Renard *et al.* (1988, Biotechnology Letters 10, 91-96).

La Fig. 1 muestra el efecto de acetato potásico y sódico sobre la productividad en cultivo semicontinuo en matraz con agitación. Se añadió acetato sódico o acetato potásico al cultivo en matraz con agitación durante la fase de crecimiento exponencial hasta las concentraciones finales expuestas en las secciones respectivas de la tabla de la Fig. 1. Los cultivos se contaron diariamente mediante el método de azul Trypan y se tomaron muestras para el análisis del producto por medio de fraccionamiento con proteína A y análisis mediante HPLC. Acetato sódico 10 mM se comportó incluso mejor que acetato potásico 10 mM o 15 mM. El CCT fue similar en todos los tratamientos (lo

que incluye el control). Por lo tanto, se descubrió que se incrementó la productividad por célula única (q_p).

La Fig. 2 muestra los perfiles de crecimiento para fermentaciones en biorreactor semicontinuo que no contienen acetato sódico o que contienen acetato sódico 10 mM. Se analizó la concentración de células viables (determinada mediante ensayo de recuento estándar de exclusión con azul Trypan) en cultivos duplicados tanto para los controles como para el cultivo complementado con acetato sódico 10 mM. La alimentación se inició en el día 4. No se alimentó acetato durante la fase de crecimiento como en la Fig. 1, sino que se incluyó en el medio de producción de cultivo celular al que se añadieron inmediatamente las células de la siembra. Como se puede observar, se probó que el efecto incrementador del rendimiento de acetato es sumamente reproducible (Fig. 3), como lo fue el comportamiento del crecimiento. No se pudo observar una inhibición del crecimiento significativa en cuanto a la densidad celular máxima alcanzable. La velocidad de crecimiento no disminuyó significativamente, aunque se halló de forma reproducible un cierto efecto de la adición de acetato. El CCT permaneció esencialmente parecido para todos los cultivos. De forma notable, el acetato mejoró la duración o estabilidad de la fase de crecimiento estacionario; la disminución de la densidad de células viables después de que la densidad de células viables alcanzase el máximo fue mucho más lenta en presencia de acetato. Se sabe que la producción de anticuerpo es mucho más elevada en la fase estacionaria que en la fase de crecimiento exponencial.

En un grupo adicional de experimentos, la alimentación se complementó adicionalmente con LiCl tanto para el control como para el cultivo tratado con acetato como se dijo en el párrafo precedente, por lo que se acumuló hasta una concentración final de aprox. 1-10 mM (datos no mostrados). No se probó que la adición de una sal de Li modificase el efecto de la adición de acetato de ninguna manera. Sin ninguna duda, no se pudo observar un aumento sinérgico del efecto de la adición de acetato, como se ha informado para la complementación de los cultivos con n-butilato.

La Fig. 4 compara el efecto de la inclusión de acetato sódico en los cultivos de siembra (en la siembra) o en el momento de la siembra en el medio de producción (al sembrar) o en la alimentación dada durante la fase exponencial (en la alimentación) o sus combinaciones en el cultivo semicontinuo en matraz con agitación. Todos los valores se expresan como diferencia en porcentaje comparado con el control. Fue observable una clara dependencia de la dosis con respecto a la cantidad de acetato añadido. Se descubrió que la adición de acetato al cultivo de siembra o en el momento de la siembra, lo que implica el uso de un medio de cultivo complementado con acetato para el cultivo de producción, es el modo más eficaz en vista del rendimiento incrementado y de la productividad por célula única llevada al máximo.

Experimento 2

El Exp. 2 se llevó a cabo esencialmente como se describió anteriormente para el Exp. 1/Fig. 2, excepto en que ahora se usó acetato sódico 7,5 mM y un medio de cultivo de elevada densidad patentado, similar a los medios de elevada densidad complementados con lípidos descritos en el documento EP-435 911 A, pero distinto al emplear menos etanolamina y nada de tioglicerol, y mantener la concentración de triptófano

constante en 19 mM mediante alimentación automática controlada por sensores. Con tal medio, se descubrió que acetato 7,5 mM es óptimo para esa línea celular con respecto al rendimiento de anticuerpo y a la solidez del proceso. La Fig. 5 muestra el diagrama de CCT para acetato 7,5 mM, que demuestra de nuevo que la aplicación de acetato permite aumentar el rendimiento de anticuerpo sin disminuir la velocidad del crecimiento o la densidad de células viables. En contraste con el Exp. 1, se pudo alcanzar la misma densidad de células viables en presencia de acetato comparado con el control sin acetato en ausencia de efectos adversos sobre la duración del crecimiento en la fase estacionaria. De forma similar, la concentración de producto se incrementó de forma constante sobre el control con el tiempo (Fig. 6). A diferencia de otros agentes incrementadores de la productividad, tales como butirato sódico, la adición de acetato sódico conduce solamente a pequeñas disminuciones en los parámetros de crecimiento celular (velocidad de crecimiento celular y tiempo de acumulación celular). Así, la adición de acetato sódico conduce a un gran incremento en la concentración de anticuerpo recogido.

Experimento 3

El experimento fue un estudio dosis-respuesta para la adición de diferentes cantidades de acetato sódico para la línea celular NS0 6A1 en el intervalo de hasta 20 mM, y se llevó a cabo esencialmente como se describió en el Exp. 1/Fig. 2. La Fig. 7 muestra el CCT dependiente de la dosis de acetato añadido, y la Fig. 8 muestra la productividad específica por célula única (q_p) dependiente de la dosis de acetato añadido.

Ejemplo comparativo: Experimento 4

La adición de butirato a los medios de cultivo celular no incrementa la productividad de anticuerpo en células NS0-6A1; a dosis > 1 mM, es intensamente tóxico para las células y disminuye la densidad de células viables muy rápidamente. En el intervalo permisible, no se pudo observar ningún incremento de la productividad en absoluto, ni siquiera a nivel de célula única. El experimento se llevó a cabo esencialmente como se describió en el Exp. 1/Fig. 2, excepto en que se añadió butirato en las cantidades mostradas en vez de acetato. La adición tardía de butirato en la fase exponencial tampoco aumentó la productividad. Las Figs. 9-11 muestran el efecto de la adición de butirato sobre el CCT, el título y la recogida de anticuerpo y la productividad específica por célula única (q_p).

Experimento 5

Se llevó a cabo un estudio dosis-respuesta para la adición de acetato sódico para la línea celular de hibridoma VPM 8 (ECACC N° 93113024, European Collection of Cell Cultures, anteriormente mencionado) esencialmente como se describió en el Exp. 3, excepto que VPM 8 se hizo crecer en medio comercial sin proteínas CD-Hybridoma (Invitrogen/R.U.) y que no se añadió MSX, ya que no era una línea celular GS. VPM 8 es un hibridoma de ratón que se generó mediante medios convencionales de fusión celular con células de mieloma no secretoras y que secreta un anticuerpo IgG1 murino. Las Figs. 12-14 muestran el efecto de la adición de acetato sobre CCT, el título y la recogida de anticuerpo, y la productividad específica por célula única (q_p). Notablemente, en comparación con butirato, el hibridoma VPM 8 tolera acetato sorprendentemente bien en el intervalo de mM, en contraste con butirato (véase el Exp. 6) y muestra una productividad aumentada comparado con el con-

tol sin tratar con acetato. Esto último no se podría haber esperado basándose en el tratamiento con butirato de tales células conocido en la técnica anterior (véase el Exp. 6).

Ejemplo comparativo: Experimento 6

Las Figs. 15-17 muestran el efecto del tratamiento con n-butirato de células de hibridoma VPM 8 sobre la CCT, el título de anticuerpo recogido y la productividad específica por célula única (qp), respectivamen-

te. El experimento se ha llevado a cabo esencialmente como se describió en el Exp. 5, excepto en que se sustituyó acetato con n-butirato en las cantidades expuestas en las figuras. Dada la toxicidad excepcional de butirato para esta línea celular, es poco probable añadir butirato sin disminuir la velocidad de crecimiento y la densidad de células viables. La complementación con butirato, por lo tanto, no es eficaz para incrementar el título de anticuerpo.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína, en el que la proteína se expresa a partir de una célula linfóide en un cultivo celular al menos durante un cierto espacio de tiempo durante el cultivo celular, que comprende las etapas de

- a) preparar un medio de crecimiento de cultivo celular sin proteínas,
- b) y añadir además ácido acético o una sal de acetato o un éster de acetilo hasta una concentración final de 3 a 20 mM, y dicha adición se lleva a cabo directamente en el medio antes o al comienzo del cultivo celular, o se alimenta en el medio durante el cultivo celular,
- c) cultivar adicionalmente, preferiblemente hacer crecer, dicha célula en dicho medio con la expresión concomitante del producto proteico,
- d) y finalmente recoger dicha proteína del cultivo celular.

2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la adición de ácido acético o de una sal cuya se lleva a cabo directamente en el medio antes o al comienzo del cultivo celular.

3. El método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el ácido acético o una sal de acetato o un éster de acetilo se añade en una concentración final de 3 a 15 mM, más preferiblemente de 6 a 9,5 mM, y en el que preferiblemente el medio de cultivo celular está desprovisto de

butirato.

4. El método según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque las células son células linfoides de mamífero, preferiblemente células NS0.

5. El método según la reivindicación 4, **caracterizado** porque las células son células NS0 que son recombinantes para, y pueden expresar, glutamina sintetasa.

6. Un medio de crecimiento de cultivo celular sin proteínas para células linfoides, **caracterizado** porque el medio comprende ácido acético o una sal de acetato o un éster de acetilo biológicamente activado a una concentración de 3 a 20 mM, y preferiblemente está desprovisto de ácido butírico o de sus sales.

7. El medio de cultivo celular según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el medio es un medio de cultivo celular de elevada densidad.

8. El medio de cultivo celular según las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizado** porque el medio es un medio de cultivo celular sin suero y sin proteínas adecuado para el cultivo de células NS0 sin proteínas.

9. Un concentrado de medio para la preparación de un medio de cultivo como se definió en la reivindicación 6 que es un sólido o un líquido.

10. El uso de un medio de cultivo celular según la reivindicación 6 para el cultivo de células linfoides.

11. Un cultivo celular, que comprende células linfoides de mamífero en un medio según la reivindicación 6.

12. El cultivo celular según la reivindicación 11, **caracterizado** porque las células linfoides son células NS0.

Parámetro	Control	Acetato potásico (mM)			Acetato sódico (10 mM)
		5	10	15	
CCT (10^6 cél h mL $^{-1}$)	554	597 (8%)	593 (7%)	572* (3%)	535 (-3%)
Producto (mg L $^{-1}$)	365	448 (23%)	480 (32%)	487* (33%)	501 (37%)
q_p (mg 10^6 cél $^{-1}$ h $^{-1}$)	0.659	0.752 (14%)	0.810 (23%)	0.852 (29%)	0.937 (42%)

- * Un cultivo duplicado exhibió un crecimiento celular muy pobre. No se determinó la concentración de producto.

Fig. 1

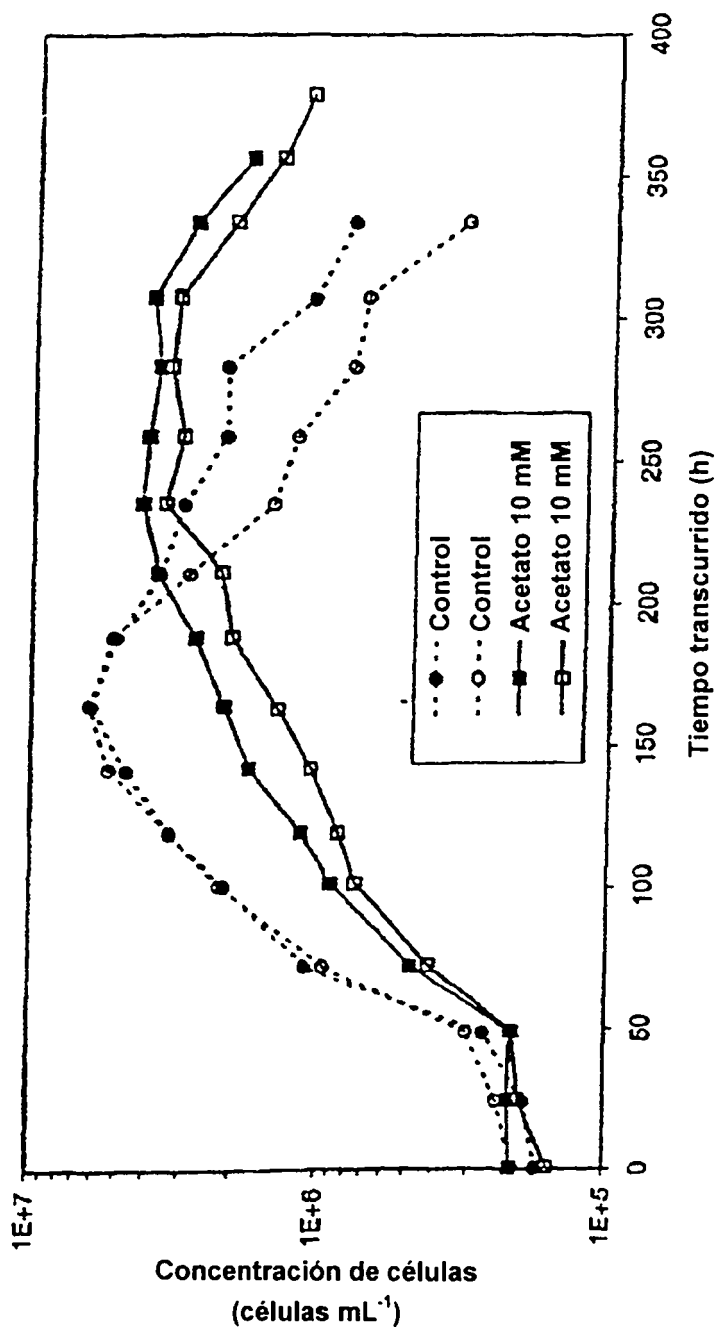


Fig. 2

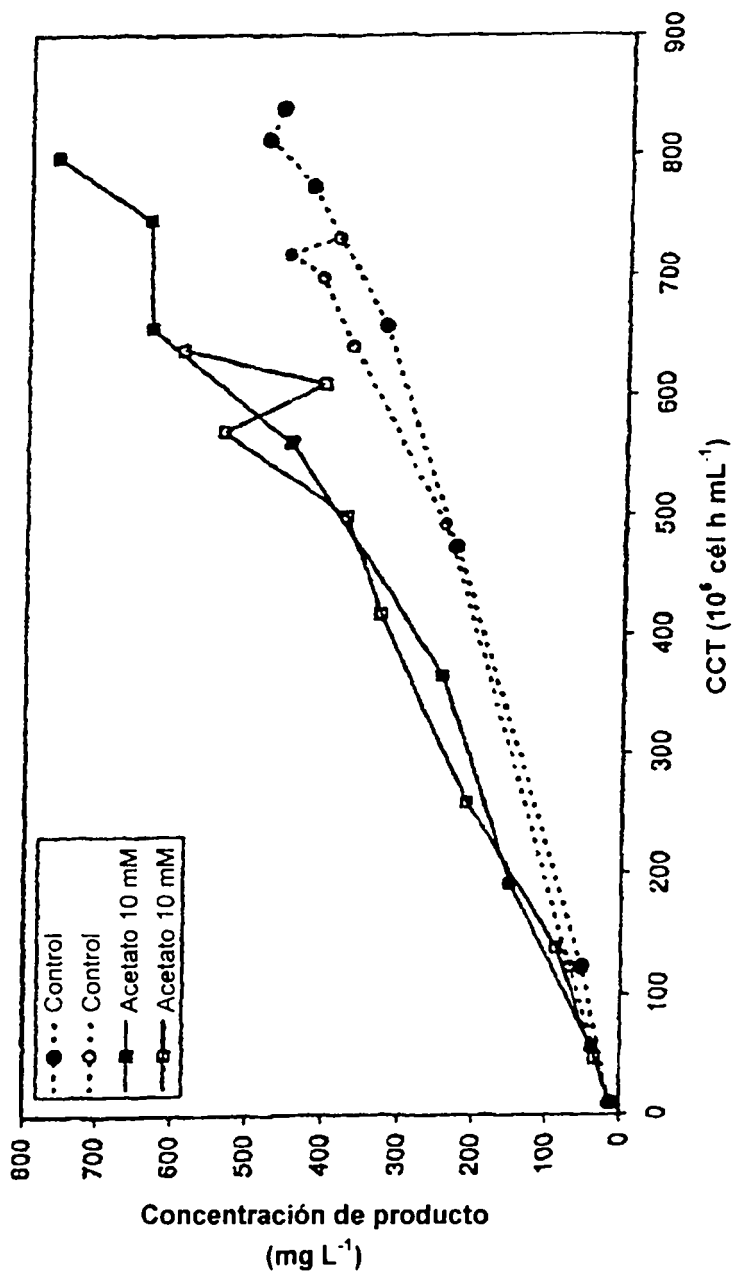


Fig. 3

Fig. 4

Tratamiento	Concentración máxima de células viables	CCT	Concentración de producto	q _p
Sin acetato (control)	0%	0%	0%	0%
5 mM en la siembra	-4%	23%	24%	12%
10 mM en la siembra	24%	40%	97%	56%
5 mM en la alimentación	8%	-13%	-15%	-5%
10 mM en la alimentación	1%	-8%	8%	17%
15 mM en la alimentación	26%	7%	1%	-3%
5 mM en la siem. 10 mM al semb.	9%	59%	98%	39%
5 mM en la siem. 10 mM en la alim.	12%	47%	73%	28%

Fig. 5

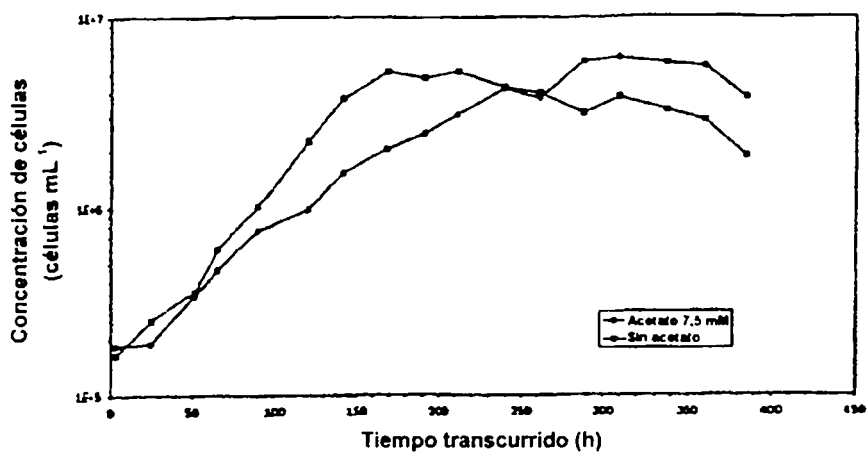


Fig. 6

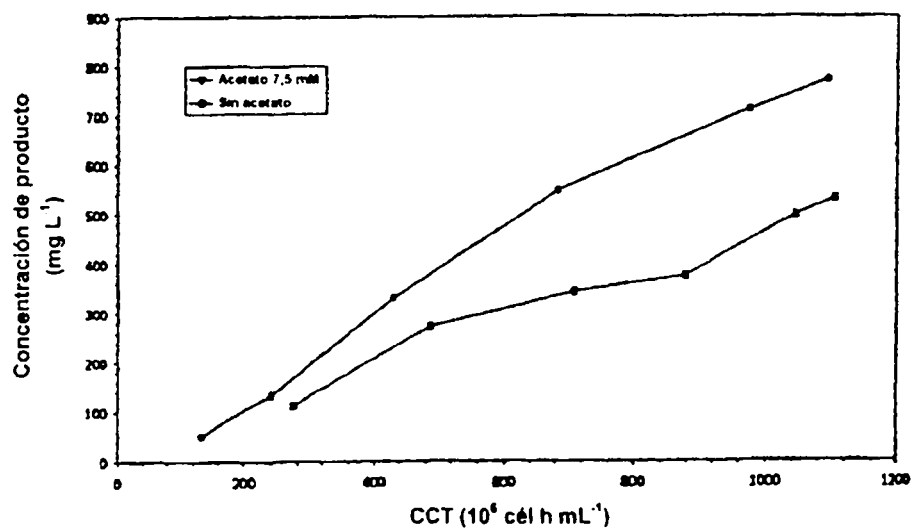


Fig. 7

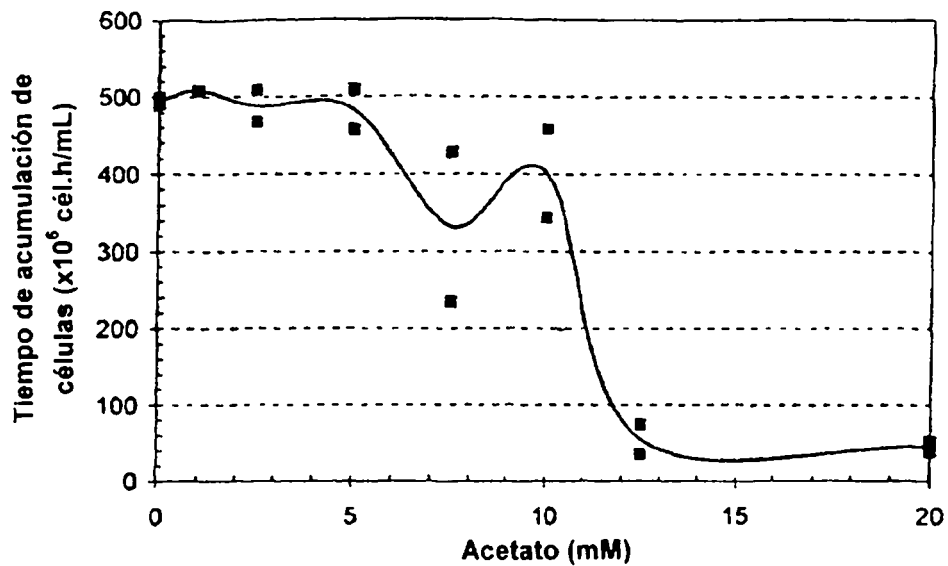


Fig. 8

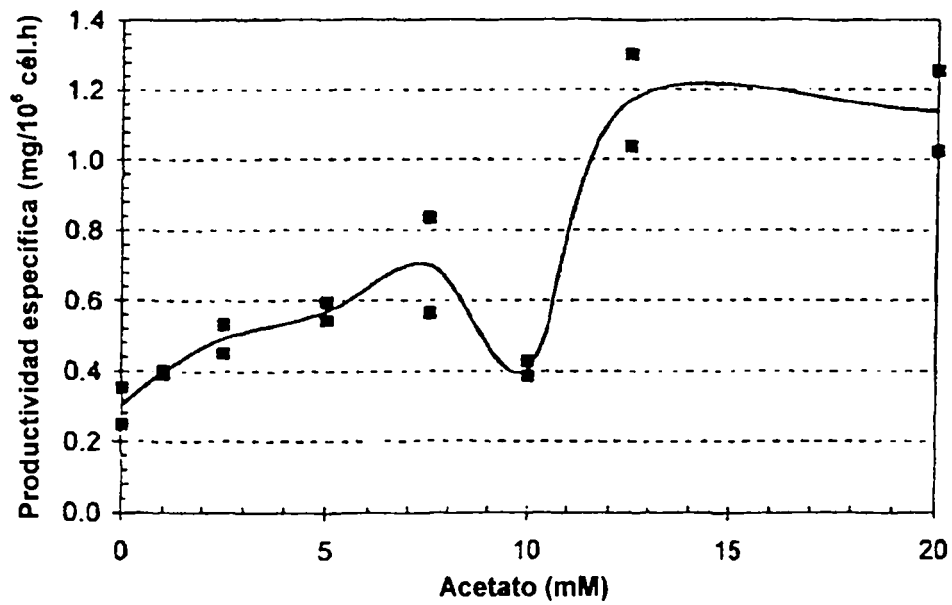


Fig. 9

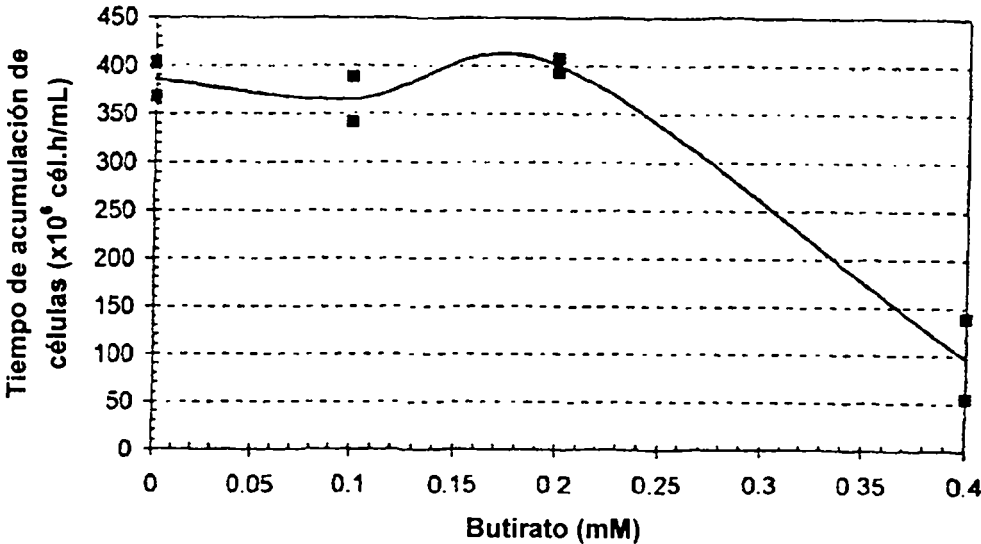


Fig. 10

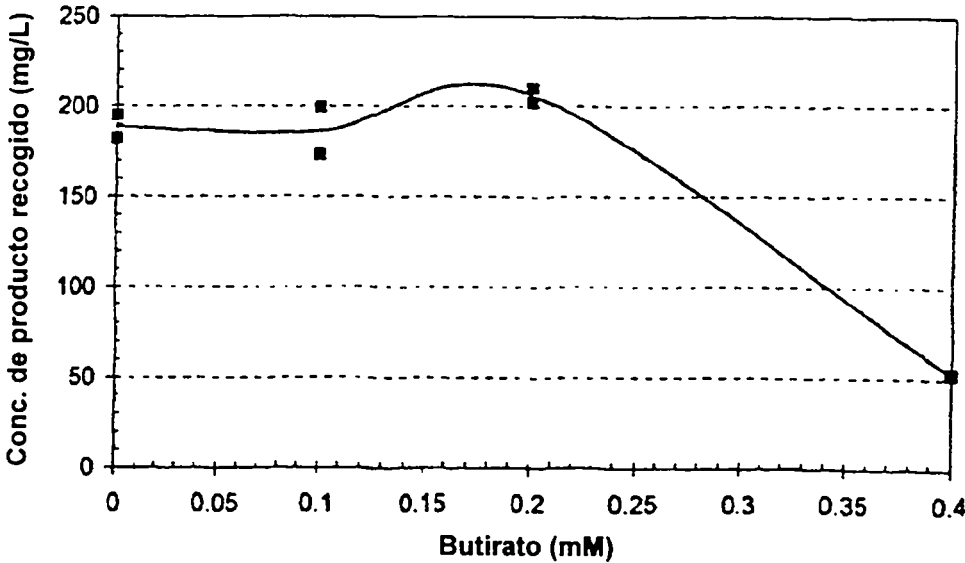


Fig. 11

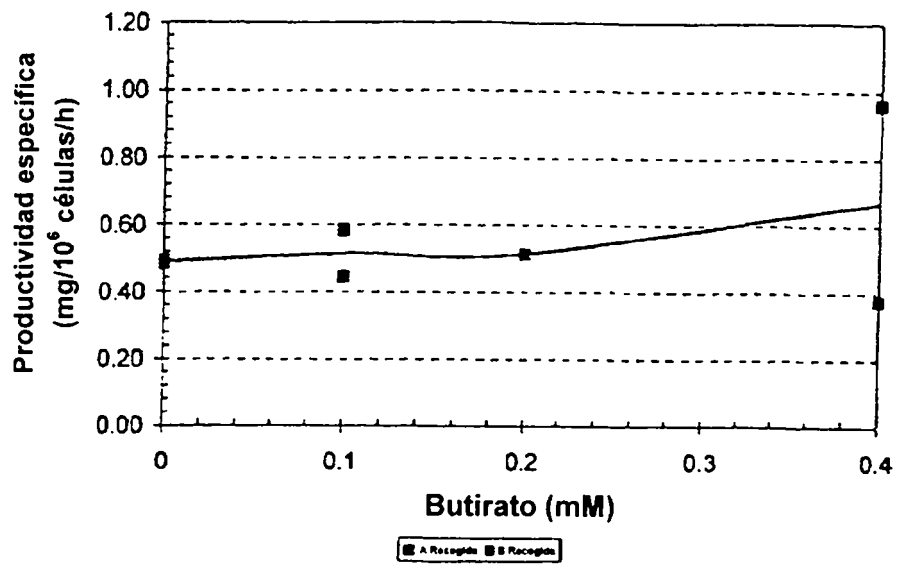


Fig. 12

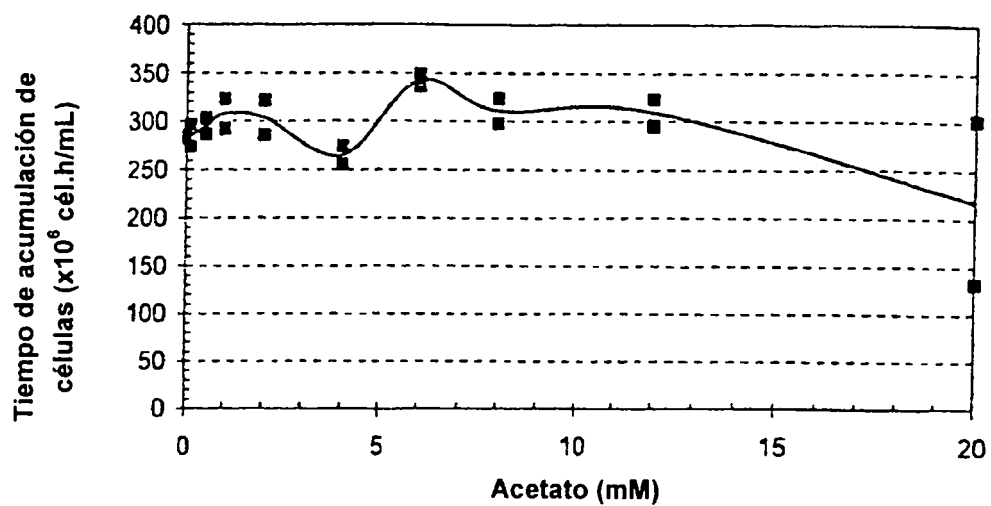


Fig. 13

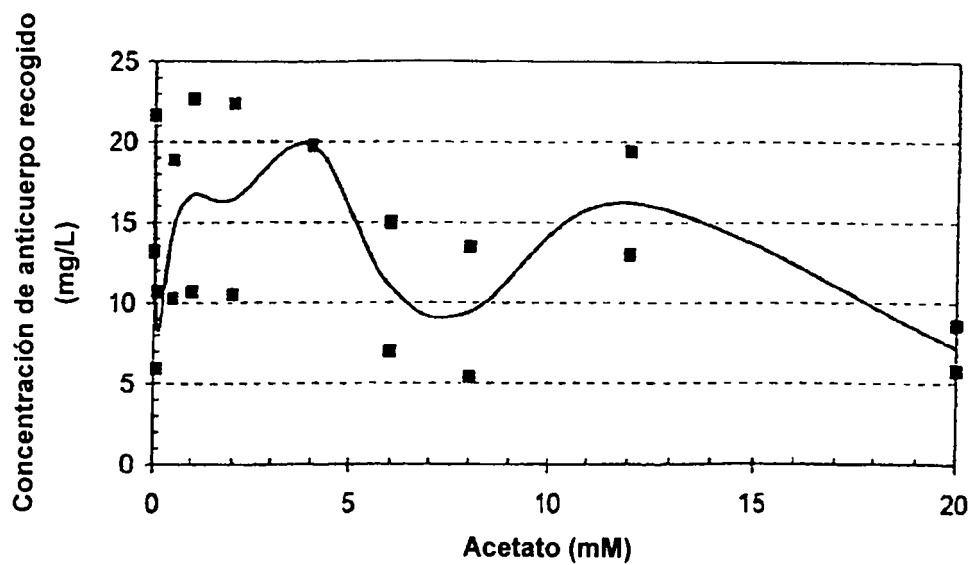


Fig. 14

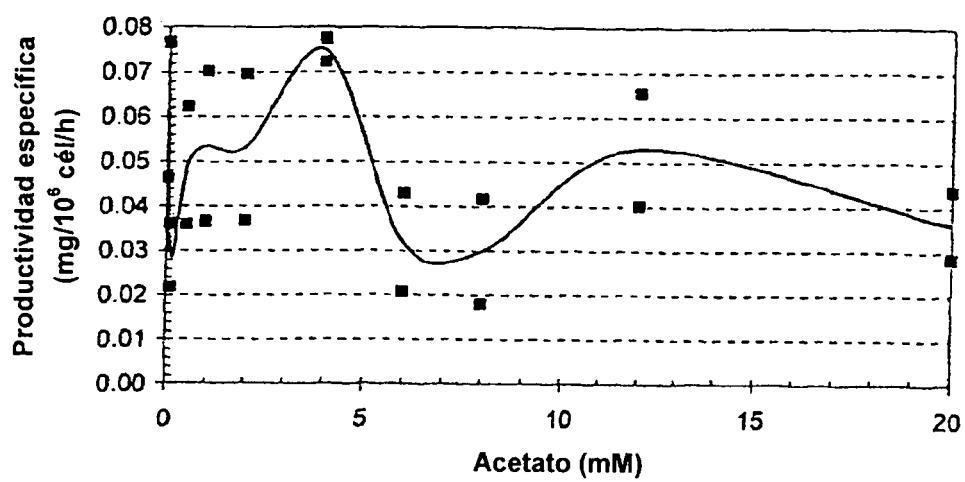


Fig. 15

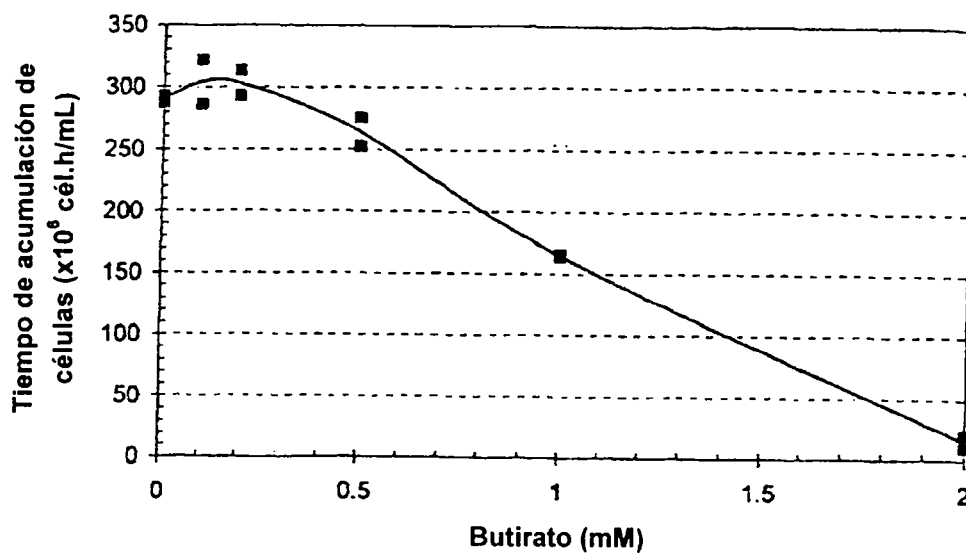


Fig. 16

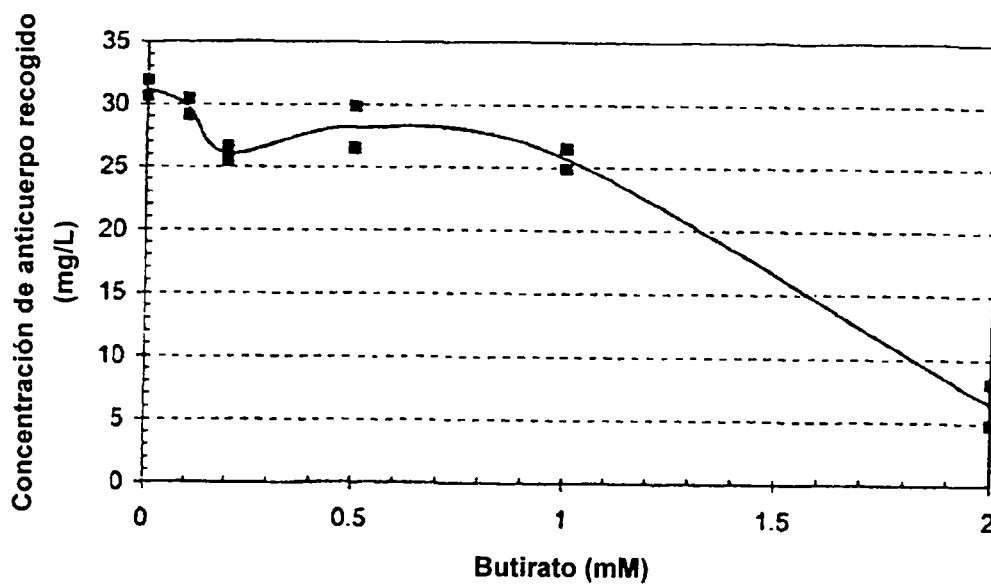


Fig. 17

