

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 909**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015** **PCT/IB2015/051943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015** **WO15140708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015** **E 15715840 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024** **EP 3119876**

54 Título: **Procedimiento de cultivo celular**

30 Prioridad:

19.03.2014 US 201461955273 P

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

17.03.2025

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.00%)
66 Hudson Boulevard East
New York, NY 10001-2192, US**

72 Inventor/es:

**HILLER, GREGORY WALTER y
MULUKUTLA, BHANU CHANDRA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 005 909 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

Procedimiento de cultivo celular

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento de cultivo celular en el que la concentración de uno o más de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato se mantiene a niveles bajos en el medio de cultivo celular.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas han adquirido cada vez mayor importancia como agentes diagnósticos y terapéuticos. En la mayoría de los casos, las proteínas para aplicaciones comerciales se producen en cultivos celulares, a partir de células que han sido diseñadas por ingeniería y/o seleccionadas para producir niveles inusualmente altos de una proteína particular de interés. La optimización de las condiciones de cultivo celular es importante para la producción comercial exitosa de proteínas. Las células de mamíferos tienen un metabolismo ineficiente que hace que consuman grandes cantidades de nutrientes y conviertan una cantidad significativa de ellos en subproductos. Los subproductos se liberan en el cultivo y se acumulan a lo largo del mismo. El lactato y el amoníaco, conocidos por ser inhibidores convencionales de las células en cultivo, son los dos principales subproductos del metabolismo celular que se acumulan hasta alcanzar niveles elevados en el cultivo y, más allá de ciertas concentraciones, comienzan a inhibir el crecimiento y la productividad de las células en cultivo. Se han desarrollado procedimientos de cultivo celular destinados a reducir la cantidad de lactato y amoníaco en el medio de cultivo celular y pueden aumentar el crecimiento y la productividad de las células de mamíferos. Sin embargo, el crecimiento celular sigue ralentizándose incluso cuando las concentraciones de lactato y amoníaco se mantienen bajas, lo que limita la densidad celular máxima y la productividad de las células.

20 Por lo tanto, subsiste la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo celular mejorados para una producción óptima de proteínas. En particular, subsiste la necesidad de procedimientos de cultivo celular que proporcionen una mayor densidad y/o titulación de células viables.

Sumario de la invención

25 La invención es como se define en las reivindicaciones.

La invención define un procedimiento de cultivo celular que comprende

(i) proporcionar células de mamífero en un medio de cultivo celular para iniciar un procedimiento de cultivo celular, en el que las células de mamífero expresan una proteína recombinante, y,

30 (ii) mantener al menos un metabolito seleccionado de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato por debajo de una concentración C1 en el medio de cultivo celular, en el que C1 es 3 mM, en el que mantener al menos un metabolito por debajo de una concentración C1 en el medio de cultivo celular comprende la etapa de medir la concentración de dicho al menos un metabolito, y, cuando la concentración medida está por encima de un valor predefinido, en el que el valor predefinido es igual a C1 o es 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de C1, la concentración del precursor de dicho al menos un metabolito en el medio de cultivo celular disminuye al reducir la cantidad de precursor proporcionado a las células de mamífero,

en el que el cultivo celular es un cultivo en lote alimentado.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1A muestra las características de crecimiento y los perfiles metabólicos de las células CHO en un procedimiento en lote alimentado convencional. Los datos informados incluyen densidades de células viables (cuadrados cerrados), niveles de lactato de cultivo (triángulos cerrados) y niveles de amoníaco (rombos cerrados). También, se informa el título de cosecha (concentración de proteína del día 12).

45 La Figura 1B muestra las características de crecimiento y los perfiles metabólicos de las células CHO en un procedimiento HiPDOG. Los datos informados incluyen densidades de células viables (cuadrados cerrados), niveles de lactato de cultivo (triángulos cerrados) y niveles de amoníaco (rombos cerrados). También, se informa el título de cosecha (concentración de proteína del día 12).

50 La Figura 2 muestra gráficos que indican la densidad de células viables de las células GS-CHO en el día 0, el Día 3 y el Día 6 cuando se expusieron a concentraciones crecientes de ácido 2-hidroxibutírico (Figura 2A), homocisteína (Figura 2B) o ácido indolcarboxílico (Figura 2C). Las células GS-CHO se inocularon en Medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con concentraciones informadas de los inhibidores, individualmente. El efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de las células se monitorizó durante 6 días.

La Figura 3 muestra el efecto de aumentar las concentraciones de dos metabolitos, 4-hidroxifenilpiruvato (Figura 3A) y fenilactato (Figura 3B) sobre la densidad de células viables de las células GS-CHO. Las células GS-CHO se inocularon en Medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con concentraciones informadas de los inhibidores, individualmente.

5 Las Figuras 4 y 5 muestran el efecto de aumentar las concentraciones de cuatro metabolitos, indolactato (Figura 4A), 3-(4-hidroxifenil)lactato (Figura 4B), formato de sodio (Figura 5A) e isovalerato (Figura 5B), sobre la densidad de células viables de las células GS-CHO. Las células GS-CHO se inocularon en Medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con las concentraciones descritas de los inhibidores, individualmente.

10 La Figura 6 muestra el efecto de cuatro metabolitos (4-hidroxifenilpiruvato, indolactato, fenilactato y 3-(4-hidroxifenil)lactato) sobre la densidad de células viables de las células GS-CHO en comparación con un control en el que las células se cultivan en ausencia de los metabolitos. Las células GS-CHO se inocularon en Medio A a bajas densidades de células viables y se trataron con medio fresco solo o medio fresco que comprendía los cuatro metabolitos mencionados anteriormente en combinación en concentraciones que se detectaron el día 7 del cultivo con HIPDOG (véase la Tabla 4). El efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de las células se monitorizó durante 6 días.

La Figura 7A muestra las densidades de células viables de las células GS-CHO en el procedimiento 'HiPDOG' (cuadrados cerrados) y el procedimiento 'Bajo AA + HiPDOG' (rombos cerrados).

La Figura 7B muestra el título de cultivo (IgG) en diferentes días en el procedimiento 'HiPDOG' (cuadrados cerrados) y el procedimiento 'Bajo AA + HiPDOG' (rombos cerrados).

20 Las Figuras 8 y 9 muestran las concentraciones de aminoácidos de cuatro aminoácidos en el 'procedimiento HiPDOG restringido a aminoácidos (Bajo AA + HiPDOG)' (cuadrados cerrados) y el procedimiento 'HiPDOG' (rombos cerrados). Los cuatro aminoácidos incluyen tirosina (Figura 7A), triptófano (Figura 8B), fenilalanina (Figura 9A) y metionina (Figura 9B).

25 La Figura 10A muestra las densidades de células viables de células GS-CHO durante un procedimiento de cultivo celular utilizando diferentes condiciones divulgadas en el Ejemplo 5 (HiPDOG1 (cuadrados cerrados), HiPDOG2 (círculos cerrados), Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

30 La Figura 10B muestra el título de cultivo (IgG) en diferentes días en un procedimiento de cultivo celular utilizando células GS-CHO y diferentes condiciones de cultivo celular divulgadas en el Ejemplo 5 ((HiPDOG1 (cuadrados cerrados), HiPDOG2 (círculos cerrados), Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

35 Las Figuras 11, 12, 13 y 14 muestran las concentraciones de tirosina (Figura 11A), metionina (Figura 11B), fenilalanina (Figura 12A), triptófano (Figura 12B), leucina (Figura 13A), treonina (Figura 13B), glicina (Figura 14A) y serina (Figura 14B) durante el cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el Ejemplo 5 ((HiPDOG1 (cuadrados cerrados), (HiPDOG2 (círculos cerrados), Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

Las Figuras 15 y 16 muestran la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato (Figura 15A), isovalerato (Figura 15B) e indol-3-lactato (Figura 16) en el día 5, día 7 y día 9 del cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el Ejemplo 5 ((HiPDOG1 (cuadrados cerrados), HiPDOG2 (círculos cerrados), Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

40 La Figura 17 muestra las densidades de células viables de células GS-CHO y el título de cultivo (IgG) durante un procedimiento de cultivo celular utilizando las condiciones divulgadas en el Ejemplo 5 ((Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

45 Las Figuras 18A y 18B muestran las densidades de células viables de células GS-CHO y el título de cultivo (IgG) durante un procedimiento de cultivo celular utilizando las condiciones divulgadas en el Ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

Las Figuras 19 y 20 muestran la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato (Figura 19A), isovalerato (Figura 19B) e indol-3-lactato (Figura 20) en el día 5, día 7 y día 10 del cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el Ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados cerrados), Bajo 8AA+HipDOG (triángulos cerrados)).

50 Las Figuras 21A y 21B muestran las densidades de células viables de células GS-CHO y el título de cultivo (IgG) durante un procedimiento de cultivo celular utilizando diferentes condiciones divulgadas en el Ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados cerrados), Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados)).

Las Figuras 22 y 23 muestran la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato (Figura 22A), isovalerato (Figura 22B) e indol-3-lactato (Figura 23) en el día 5 y el día 7 del cultivo celular de células GS-CHO utilizando las condiciones divulgadas en el Ejemplo 6 ((HiPDOG (cuadrados cerrados), Bajo 4AA+HipDOG (rombos cerrados)).

Descripción detallada

La presente invención proporciona procedimientos y medios para el cultivo celular. La presente invención proporciona procedimientos de cultivo celular en los que la concentración de al menos un metabolito seleccionado de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato se mantiene a niveles bajos en el medio de cultivo celular.

Los inventores han descubierto inesperadamente que, en el cultivo celular, y en particular en el cultivo celular de alta densidad, tal como por ejemplo el cultivo celular en lote alimentado que tiene como objetivo producir una gran cantidad de una proteína recombinante de interés, el crecimiento de las células se inhibe por la acumulación de metabolitos tales como 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato en el medio de cultivo celular. El efecto inhibitorio de estos metabolitos se puede limitar al mantener su concentración en el medio de cultivo celular por debajo de niveles en los que inhiben el crecimiento celular.

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

La invención se refiere a un procedimiento de cultivo celular que comprende

(i) proporcionar células en un medio de cultivo celular para iniciar un procedimiento de cultivo celular, y,

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

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

Procedimientos que comprenden medir la concentración de metabolito en el medio de cultivo celular

La etapa (ii) comprende la etapa de medir la concentración de dicho al menos un metabolito. La concentración de metabolito se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido por el experto, que incluyen los procedimientos de medición en línea y fuera de línea.

La concentración de metabolitos se mide una o varias veces durante el cultivo celular. En algunas realizaciones, la concentración de metabolitos se mide de forma continua, intermitente, cada 30 min, cada hora, cada dos horas, dos veces al día, diariamente o cada dos días. En una realización preferente, la concentración de metabolito se mide diariamente.

Un procedimiento de medición fuera de línea como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento en el que la medición de un parámetro, como una concentración, no está automatizada ni integrada al procedimiento de cultivo celular. Por ejemplo, un procedimiento de medición en el que se toma manualmente una muestra del medio de cultivo celular para que se pueda medir una concentración específica en dicha muestra se considera un procedimiento de medición fuera de línea.

Los procedimientos de medición en línea como se utilizan en la presente memoria se refieren a procedimientos en los que la medición de un parámetro, tal como una concentración, está automatizada e integrada al procedimiento de cultivo celular. Por ejemplo, un procedimiento que utiliza la espectroscopia Raman como se divulga en el Ejemplo 7 es un procedimiento de medición en línea. Alternativamente, el uso de tecnología basada en Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) o Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC) con un muestreador automático que extrae muestras del reactor y las transfiere al equipo de manera programada es un procedimiento de medición en línea.

La concentración de metabolitos se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido por el experto. Los procedimientos preferentes para medir la concentración de metabolitos en procedimientos en línea o fuera de línea incluyen, por ejemplo, Cromatografía Líquida, tal como Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC) o Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masas (LCMS), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (GCMS).

En algunas realizaciones, la concentración de metabolito se mide fuera de línea al tomar una muestra del medio de cultivo celular y medir la concentración de dicho al menos un metabolito en dicha muestra. En algunas realizaciones, la concentración de metabolitos se mide como se divulga en el Ejemplo 2. Un procedimiento preferente para medir la concentración de metabolitos en un procedimiento fuera de línea es LCMS.

En algunas realizaciones, la concentración de metabolito se mide en línea. En algunas realizaciones, la concentración de metabolito se mide en línea utilizando espectroscopia Raman. En algunas realizaciones, la concentración de metabolito se mide en línea utilizando espectroscopia Raman como se divulga en el Ejemplo 7. En algunas

realizaciones, la concentración de metabolito se mide en línea utilizando tecnología basada en HPLC o UPLC con un muestreador automático que extrae muestras del reactor y las transfiere al equipo de manera programada.

5 Cuando la concentración medida está por encima de un valor predefinido, la concentración de precursor de dicho al menos un metabolito en el medio de cultivo celular disminuye. Dicho valor predefinido se selecciona de tal manera que la disminución de la concentración de dicho precursor impida que la concentración de metabolito aumente por encima de C1. El valor predefinido es igual a C1 o es un porcentaje de C1. El porcentaje es 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de C1. En algunas realizaciones, el porcentaje es 80 % de C1.

10 En algunas realizaciones cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y/o fenillactato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de fenilalanina disminuye en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato y/o 4-hidroxifenilpiruvato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de tirosina disminuye en el medio de cultivo celular.

15 En algunas realizaciones cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y/o fenillactato está por encima de dicho valor predefinido, las concentraciones de tirosina y fenilalanina disminuyen en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones cuando la concentración medida de indollactato y/o ácido indolcarboxílico está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de triptófano disminuye en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones cuando la concentración medida de homocisteína y/o ácido 2-hidroxibutírico está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de metionina disminuye en el medio de cultivo celular.

20 En algunas realizaciones cuando la concentración medida de isovalerato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de leucina disminuye en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones cuando la concentración medida de formato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de serina, treonina y/o glicina disminuye en el medio de cultivo celular.

25 En algunas realizaciones cuando la concentración medida de formato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de serina disminuye en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones cuando la concentración medida de formato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de treonina disminuye en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones cuando la concentración medida de formato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de glicina disminuye en el medio de cultivo celular.

30 La concentración de precursor en el medio de cultivo celular se puede disminuir al reducir la cantidad de precursor proporcionado a las células, por ejemplo al reducir la concentración de dicho precursor en el medio de alimentación, reducir la tasa de alimentación o reducir el número o volumen de alimentaciones. Por ejemplo, el medio de alimentación se puede reemplazar por un medio de alimentación que comprende una concentración menor de precursor.

35 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína y ácido 2-hidroxibutírico por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

40 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y fenillactato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener indollactato y ácido indolcarboxílico por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

45 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener homocisteína y ácido 2-hidroxibutírico por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

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

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

- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener isovalerato y 4-hidroxifenilpiruvato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- 5 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, la etapa (ii) comprende mantener 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenilactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico isovalerato y formato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato se mantiene por debajo de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, o 0,1 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato se mantiene por debajo de 0,3 mM.
- 10 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 3-(4-hidroxifenil)lactato se mantiene por debajo de 0,1 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 4-hidroxifenilpiruvato se mantiene por debajo de 0,1 mM, 0,08 mM, 0,06 mM, 0,05 mM, 0,04 mM, 0,03 mM o 0,02 mM.
- 15 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 4-hidroxifenilpiruvato se mantiene por debajo de 0,05 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de 4-hidroxifenilpiruvato se mantiene por debajo de 0,02 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de fenilactato se mantiene por debajo de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, o 0,1 mM.
- 20 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de fenilactato se mantiene por debajo de 0,2 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de fenilactato se mantiene por debajo de 0,1 mM.
- 25 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indollactato se mantiene por debajo de 3 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,3 mM o 0,1 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indollactato se mantiene por debajo de 1 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indollactato se mantiene por debajo de 0,3 mM.
- 30 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de indollactato se mantiene por debajo de 0,1 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido indolcarboxílico se mantiene por debajo de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM o 0,2 mM.
- 35 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido indolcarboxílico se mantiene por debajo de 0,5 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido indolcarboxílico se mantiene por debajo de 0,2 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de homocisteína se mantiene por debajo de 0,5 mM, 0,4 mM, 0,3 mM, 0,2 mM, o 0,1 mM.
- 40 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de homocisteína se mantiene por debajo de 0,3 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de homocisteína se mantiene por debajo de 0,1 mM.
- 45 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido 2-hidroxibutírico se mantiene por debajo de 1 mM, 0,8 mM, 0,6 mM, 0,4 mM o 0,2 mM.
- En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de ácido 2-hidroxibutírico se mantiene por debajo de 0,5 mM.

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

En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de isovalerato se mantiene por debajo de 2 mM, 1 mM, 0.8 mM, 0.6 mM, 0,4 mM o 0,2 mM.

- 5 En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de isovalerato se mantiene por debajo de 1 mM.

En algunas realizaciones de los procedimientos divulgados anteriormente, en la etapa (ii), la concentración de isovalerato se mantiene por debajo de 0,5 mM.

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

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

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

- 15 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM o 5 mM.

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

- 20 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende uno de glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 5 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, de valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM o 5 mM.

- 25 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende uno de valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende uno de valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 5 mM.

Concentración de lactato y amoníaco

- 30 En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos divulgados anteriormente, otros metabolitos que inhiben el crecimiento de células, tal como el lactato y el amoníaco, también se mantienen a niveles bajos en el medio de cultivo celular. Los expertos conocen procedimientos para mantener el lactato y el amoníaco a niveles bajos.

Por ejemplo, el lactato se puede mantener a niveles bajos en el cultivo celular al utilizar los procedimientos divulgados en el documento WO2004104186, Gagnon et al, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108, No. 6, junio de 2011 (Gagnon et al) o el documento WO2004048556.

- 35 Se pueden emplear varias otras estrategias para restringir la producción de lactato y/o inducir el consumo de lactato. Estas incluyen cultivar células a un pH ligeramente reducido (6,7-7,0), cultivar células a bajas concentraciones de glucosa al utilizar fuentes de carbono alternativas que incluyen pero no se limitan a, fructosa (Vlaschin & Hu, 2007) y galactosa (Altamirano et al, 2006), utilizar una estirpe celular que tiene niveles reducidos de proteínas de enzimas glucolíticas, que incluyen pero no se limitan a, el transportador de hexosa o la lactato deshidrogenasa (Kim & Lee, 2007a), emplear una estirpe celular con niveles suprimidos de proteínas celulares tanto de lactato deshidrogenasa como de piruvato deshidrogenasa quinasa (Zhou et al, 2011), o una estirpe celular con sobreexpresión de la enzima piruvato carboxilasa (Kim & Lee, 2007b), o con el uso de inhibidores (de moléculas pequeñas o basados en proteínas) para las rutas de señalización (tal como AKT (Mulukutla et al, 2012), mTOR (Duvel et al, 2010; Lee & Lee, 2012), HIF1a) que regulan la actividad de las rutas del metabolismo energético (glucólisis, ciclo del TCA y ruta redox).

En una realización preferente, el lactato se mantiene a niveles bajos al utilizar el procedimiento de suministro de glucosa controlado por pH de alta calidad (HIPDOG) divulgado en Gagnon et al.

- 50 En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos divulgados anteriormente, el lactato se mantiene a niveles bajos en el medio de cultivo celular. En una realización preferente, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 90 mM. En una realización preferente, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 70 mM. En una realización preferente, la concentración de lactato

en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 50 mM. En una realización preferente, la concentración de lactato en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 40 mM. En una realización preferente, el lactato se mantiene a niveles bajos al controlar la cantidad de glucosa proporcionada al cultivo celular. En una realización preferente, el lactato se mantiene a niveles bajos al utilizar el procedimiento HIPDOG. En una realización preferente, se utiliza un sensor de pH para monitorizar el pH del cultivo celular y, en respuesta a un aumento por encima de un valor de pH predeterminado, se carga glucosa al cultivo celular. En una realización preferente, el valor de pH predeterminado es aproximadamente 7.

El amoníaco se puede mantener a niveles bajos en el cultivo celular mediante cualquier procedimiento conocido por el experto, tal como por ejemplo los procedimientos divulgados en Butler et al., *Cytotechnology* 15: 87-94, 1994 o Hong et al., *Appl Microbial Biotechnol* (2010) 88:869-876. Alternativamente, el amoníaco se puede mantener a niveles bajos al utilizar un sistema de expresión de glutamina sintetasa (GS). Dichos sistemas están disponibles comercialmente (Lonza) y se pueden utilizar para generar estirpes celulares recombinantes. Las estirpes celulares que utilizan el sistema de expresión de GS demuestran la ganancia de función para sintetizar glutamina in vivo, aliviando de esta manera por completo la dependencia celular de la glutamina suministrada externamente. Dado que la fracción principal de amoníaco producido en el cultivo proviene de la catabolización de glutamina suministrada externamente, dicha ganancia de función metabólica reduce los niveles de amoníaco producido en el cultivo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos divulgados anteriormente, el amoníaco se mantiene a niveles bajos en el medio de cultivo celular. En una realización preferente, la concentración de amoníaco en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 20 mM. En una realización preferente, la concentración de amoníaco en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 10 mM. En una realización preferente, la concentración de amoníaco en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de 8 mM.

Células

La célula es una célula de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen la estirpe de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); estirpe CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); estirpe 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 de riñón canino (MOCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una estirpe de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones preferentes, las células son células CHO. En algunas realizaciones preferentes, las células son células GS.

Adicionalmente se puede utilizar cualquier número de estirpes celulares de hibridoma disponibles comercialmente y no comercialmente de acuerdo con la presente invención. El término "hibridoma" como se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula o progenie de una célula resultante de la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de anticuerpos. Dicho hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales utilizadas para crear el hibridoma pueden proceder de cualquier origen mamífero, que incluyen, pero no se limitan a, rata, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra y humano. En algunas realizaciones, un hibridoma es una estirpe celular de trioma, que resulta cuando la progenie de fusiones de mieloma heterohíbridas, que son el producto de una fusión entre células humanas y una estirpe celular de mieloma murino, se fusionan posteriormente con una célula plasmática. En algunas realizaciones, un hibridoma es cualquier estirpe celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos, tales como, por ejemplo, cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein et al., *Nature*, 537:3053, 1983). Un experto en la técnica apreciará que las estirpes celulares de hibridoma pueden tener diferentes requisitos nutricionales y/o pueden requerir diferentes condiciones de cultivo para un crecimiento óptimo, y podrá modificar las condiciones según sea necesario.

Procedimientos de cultivo celular

Los términos "cultivo" y "cultivo celular" como se utilizan en la presente memoria se refieren a una población celular que se suspende en un medio bajo condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como resultará evidente para los expertos con conocimientos básicos en la técnica, en algunas realizaciones, estos términos como se utilizan en la presente memoria se refieren a la combinación que comprende la población celular y el medio en el que se suspende la población. Las células del cultivo celular comprenden células de mamífero.

El cultivo celular de la presente invención es un cultivo en lote alimentado. El término "cultivo en lote alimentado" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos posteriores al comienzo del procedimiento de cultivo. Dichos componentes proporcionados comprenden normalmente componentes nutricionales para las células que se han agotado durante el procedimiento de cultivo. Un cultivo en lote alimentado se detiene normalmente en algún

momento y las células y/o los componentes en el medio se recolectan y, opcionalmente, se purifican. En algunas realizaciones, el cultivo en lote alimentado comprende un medio base suplementado con medios de alimentación.

Las células se pueden cultivar en cualquier volumen conveniente elegido por el profesional. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en recipientes de reacción a pequeña escala cuyo volumen varía desde unos pocos mililitros hasta varios litros. Alternativamente, las células se pueden cultivar en biorreactores comerciales a gran escala cuyo volumen varía desde aproximadamente al menos 1 litro hasta 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000, 15000, 20000 o 25000 litros o más, o cualquier volumen intermedio.

La temperatura de un cultivo celular se seleccionará principalmente en base al rango de temperaturas en el que el cultivo celular permanece viable y el rango en el que se produce un alto nivel del producto deseado (por ejemplo, una proteína recombinante). En general, la mayoría de las células de mamíferos crecen bien y pueden producir productos deseados (por ejemplo, proteínas recombinantes) dentro de un rango de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos enseñados por la presente divulgación no están limitados a estas temperaturas. Ciertas células de mamíferos crecen bien y pueden producir productos deseados (por ejemplo, proteínas recombinantes o anticuerpos) 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 uno o más momentos durante el procedimiento de cultivo celular. Los expertos con conocimientos básicos en la técnica podrán seleccionar la temperatura o temperaturas adecuadas para cultivar células, dependiendo de las necesidades particulares de las células y los requisitos de producción particulares del profesional. Las células se pueden cultivar durante cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del profesional y del requisito de las propias células. En algunas realizaciones, las células se hacen crecer a 37 °C. En algunas realizaciones, las células se hacen crecer a 36,5 °C.

En algunas realizaciones, las células se pueden hacer crecer durante la fase de crecimiento inicial (o fase de crecimiento) durante una cantidad mayor o menor de tiempo, dependiendo de las necesidades del profesional y del requisito de las propias células. En algunas realizaciones, las células se hacen crecer durante un período de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular predefinida. En algunas realizaciones, las células se hacen crecer durante un período de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular que es un porcentaje dado de la densidad celular máxima que las células alcanzarían eventualmente si se les permitiera crecer sin perturbaciones. Por ejemplo, las células se pueden cultivar durante un período de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular viable 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 hacen crecer hasta que la densidad celular no aumenta en más del 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % por día de cultivo. En algunas realizaciones, las células se hacen crecer hasta que la densidad celular no aumenta en más del 5 % por día de cultivo.

En algunas realizaciones, se permite que las células crezcan durante un período de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración inicial del cultivo celular, la temperatura a la que se hacen crecer las células y la tasa de crecimiento intrínseca 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, preferentemente durante 4 a 10 días. En algunos casos, se puede dejar que las células crezcan durante un mes o más. El profesional de la presente invención podrá elegir la duración de la fase de crecimiento inicial dependiendo de los requisitos de producción de proteínas y de las necesidades de las propias células.

El cultivo celular se puede agitar o sacudir 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 con conocimientos básicos en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, que incluye pero no se limita al pH, temperatura, oxigenación, etc.

Al final de la fase de crecimiento inicial, al menos una de las condiciones de cultivo se puede cambiar de tal manera que se aplique un segundo conjunto de condiciones de cultivo y se produzca un cambio metabólico en el cultivo. Un cambio metabólico se puede lograr, por ejemplo, mediante una variación en la temperatura, pH, osmolalidad o nivel de inductor químico del cultivo celular. En una realización no limitante, las condiciones de cultivo se cambian al cambiar la temperatura del cultivo. Sin embargo, como se sabe en la técnica, el cambio de temperatura no es el único mecanismo a través del cual se puede lograr un cambio metabólico apropiado. Por ejemplo, dicho cambio metabólico también se puede lograr al cambiar otras condiciones de cultivo, que incluyen pero no se limitan a, pH, osmolalidad y niveles de butirato de sodio. La temporización del cambio de cultivo lo determinará el profesional de la presente invención, en base a los requisitos de producción de proteínas o las necesidades de las propias células.

Al cambiar la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede llevar varias horas o días completar la variación de temperatura. Alternativamente, el cambio de temperatura puede ser relativamente abrupto. Por ejemplo, la variación de temperatura se puede completar en menos de varias horas. Si se cuenta con el equipo de producción y control adecuado, tal como es habitual en la producción comercial a gran escala de polipéptidos o proteínas, la variación de temperatura incluso se puede completar en menos de una hora.

En algunas realizaciones, una vez que se han cambiado las condiciones del cultivo celular 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 adecuadas para la expresión del polipéptido o proteína deseados a niveles comercialmente adecuados.

5 Como se discutió anteriormente, el cultivo se puede cambiar al cambiar una o más de una serie de condiciones de cultivo que incluyen, pero no se limitan a, temperatura, pH, osmolalidad y niveles de butirato de sodio. En algunas realizaciones, se cambia la temperatura del cultivo. De acuerdo con esta realización, durante la fase de producción posterior, el cultivo se mantiene a una temperatura o un rango de temperaturas que es inferior a la temperatura o el rango de temperaturas 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 la expresión de la proteína recombinante.

15 En algunas realizaciones, las células se pueden mantener en la fase de producción posterior hasta que se alcance una densidad celular o un título de producción deseados. En otra realización de la presente invención, se permite que las células crezcan durante un período de tiempo definido durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, dependiendo de la concentración del cultivo celular al inicio de la fase de crecimiento posterior, la temperatura a la que se hacen crecer las células y la tasa de crecimiento intrínseca de las células, las células se pueden hacer 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, se puede permitir que las células crezcan durante un mes o más. El profesional de la presente invención podrá elegir la duración de la fase de producción posterior dependiendo de los requisitos de producción de polipéptidos o proteínas y de las necesidades de las propias células.

El cultivo celular se puede agitar o sacudir durante la fase de producción posterior con el fin de aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto con conocimientos básicos 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 no se limitan a, pH, temperatura, oxigenación, etc.

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

En algunas realizaciones, la etapa (ii) de cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria se aplica durante la totalidad del procedimiento de cultivo celular. En algunas realizaciones, la etapa (ii) de cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria se aplica durante una parte del procedimiento de cultivo celular.

30 En algunas realizaciones, la etapa (ii) se aplica hasta que se obtiene una densidad de células viables predeterminada.

En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) se aplica durante la fase de crecimiento. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) se aplica durante una parte de la fase de crecimiento. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular de la invención comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) se aplica durante la fase de crecimiento y la fase de producción. En la etapa (ii) de cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria, el término "mantener" se puede referir a mantener la concentración de aminoácido o metabolito por debajo de C1 o C2 durante todo el procedimiento de cultivo (hasta la cosecha) o durante una parte del procedimiento de cultivo, tal como por ejemplo la fase de crecimiento, una parte de la fase de crecimiento o hasta que se obtenga una densidad celular predeterminada.

Mejora del crecimiento y la productividad celular

En algunas realizaciones de cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente, el crecimiento y/o la productividad celular aumentan en comparación con un cultivo de control, dicho cultivo de control es idéntico excepto que no comprende la etapa (ii).

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

Alta densidad celular como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una densidad celular por encima de 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, preferentemente por encima de 1×10^7 células/ml, más preferentemente por encima de 5×10^7 células/ml.

En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención es un procedimiento para mejorar el crecimiento celular en un cultivo celular en el que la densidad celular está por encima de 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 algunas realizaciones, el procedimiento de la invención es un procedimiento para mejorar el crecimiento celular en un cultivo celular donde la densidad celular máxima está por encima de 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 algunas realizaciones, el crecimiento celular se determina por la densidad celular viable (VCD), la densidad celular viable máxima o el recuento celular viable integrado (IVCC). En algunas realizaciones, el crecimiento celular se determina por la densidad celular viable máxima.

El término “densidad celular viable” como se utiliza en la presente memoria se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio. La densidad celular viable se puede medir mediante cualquier procedimiento conocido por el experto. Preferentemente, la densidad celular viable se mide utilizando un contador celular automatizado tal como Bioprofile Flex®. El término densidad celular máxima como se utiliza en la presente memoria se refiere a la densidad celular máxima alcanzada durante el cultivo celular. El término “viabilidad celular” como se utiliza en la presente memoria se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir en un conjunto determinado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. Los expertos con conocimientos básicos en la técnica apreciarán que la presente invención abarca uno de los muchos procedimientos para determinar la viabilidad celular. Por ejemplo, se puede utilizar un colorante (por ejemplo, azul tripán) que no pasa a través de la membrana de una célula viva, pero puede pasar a través de la membrana rota de una célula muerta o moribunda para determinar la viabilidad celular.

El término “recuento de células viables integrado (IVCC)” como se utiliza en la presente memoria se refiere al área bajo la curva de densidad de células viables (VCD). El IVCC se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:

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

donde Δt es la diferencia de tiempo entre los puntos de tiempo t y $t+1$. Se puede suponer que $IVCC_{t=0}$ es insignificante. VCD_t y VCD_{t+1} son densidades de células viables en los puntos de tiempo t y $t+1$.

El término “título” como se utiliza en la presente memoria se refiere, por ejemplo, a la cantidad total de proteína expresada de forma recombinante producida por un cultivo celular en una cantidad dada de volumen de medio. El título se expresa normalmente en unidades de gramos de proteína por litro de medio.

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

En algunas realizaciones, la productividad se determina por el título y/o la productividad volumétrica.

El término “título” como se utiliza en la presente memoria se refiere, por ejemplo, a la cantidad total de proteína expresada de forma recombinante producida por un cultivo celular en una cantidad dada de volumen de medio. El título se expresa normalmente en unidades de gramos de proteína por litro de medio.

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

En algunas realizaciones, la productividad aumenta en al menos un 10 % en comparación con un cultivo de control.

En algunas realizaciones, la productividad aumenta en al menos un 20 % en comparación con un cultivo de control.

En algunas realizaciones, la densidad celular máxima del cultivo celular es mayor que 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 algunas realizaciones, la densidad celular máxima del cultivo celular es mayor que 5×10^6 células/ml. En algunas realizaciones, la densidad celular máxima del cultivo celular es mayor que 1×10^8 células/ml.

Medios de cultivo celular

Los términos “medio”, “medio de cultivo celular” y “medio de cultivo” como se utilizan en la presente memoria se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren las células de mamíferos en crecimiento. Normalmente, dichas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos que la célula necesita para un crecimiento y/o supervivencia mínimos. Dicha solución también puede contener componentes complementarios que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen, pero no se limitan a, 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 que suelen estar presentes en concentraciones finales muy bajas), compuestos inorgánicos presentes en concentraciones finales altas (por ejemplo, hierro), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En algunas realizaciones, un medio se formula ventajosamente a un pH y una concentración de sal óptimos para la supervivencia y proliferación celular. En algunas realizaciones, un medio es un medio de alimentación que se agrega después del comienzo del cultivo celular.

Se puede utilizar una amplia variedad de medios de cultivo de mamíferos de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, las células se pueden hacer crecer en uno de una variedad de medios definidos químicamente, en los que los componentes de los medios son conocidos y controlados. En algunas realizaciones, las células se

pueden hacer crecer en un medio complejo, en el que no todos los componentes del medio son conocidos y/o controlados.

- Los medios de crecimiento definidos químicamente para el cultivo de células de mamíferos se han desarrollado y publicado ampliamente 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, se han desarrollado formulaciones de medios con el propósito expreso de soportar cultivos celulares altamente productivos que produzcan proteínas recombinantes. Dichos medios son los preferentes para su uso en el procedimiento de la invención. Dichos medios generalmente comprenden altas cantidades de nutrientes y en particular de aminoácidos para soportar el crecimiento y/o el mantenimiento de células a alta densidad. Si es necesario, estos medios se pueden modificar por el experto para su uso en el procedimiento de la invención. Por ejemplo, el experto puede disminuir la cantidad de fenilalanina, tirosina, triptófano y/o metionina en estos medios para su uso como medios base o medios de alimentación en un procedimiento como se divulga en la presente memoria.
- No todos los componentes de los medios complejos están bien caracterizados, por lo que 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 como hidrolizados además de otros componentes del medio definido como se describe en la presente memoria.
- En algunas realizaciones, los medios definidos incluyen normalmente aproximadamente cincuenta entidades químicas en concentraciones conocidas en agua. La mayoría de ellas también contienen una o más proteínas bien caracterizadas tales como insulina, IGF-1, transferrina o BSA, pero otras 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 categorías amplias: 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 utiliza en la presente memoria se refiere a componentes que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen, pero no se limitan a, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos que suelen estar presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En algunas realizaciones, se pueden agregar componentes suplementarios al cultivo celular inicial. En algunas realizaciones, se pueden agregar componentes suplementarios después del comienzo del cultivo celular.
- Normalmente, los oligoelementos se refieren a una variedad de sales inorgánicas incluidas en niveles micromolares o inferiores. Por ejemplo, los oligoelementos que se incluyen habitualmente son zinc, selenio, cobre y otros. En algunas realizaciones, se puede incluir hierro (sales ferrosas o férricas) como un oligoelemento en el medio de cultivo celular inicial en concentraciones micromolares. El manganeso también se incluye frecuentemente entre los oligoelementos como un catión divalente ($MnCl_2$ o $MnSO_4$) en un rango de concentraciones nanomolares a micromolares. Numerosos oligoelementos menos comunes se agregan habitualmente en concentraciones nanomolares.
- En algunas realizaciones, el medio utilizado en el procedimiento de la invención es un medio adecuado para soportar una alta densidad celular, 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. El cultivo celular es un cultivo de células de mamíferos en tanda alimentado, preferentemente un cultivo de células CHO en tanda alimentado.
- En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende fenilalanina a una concentración por debajo de 2 mM, por debajo de 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 a 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 a 1 mM.
- En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende tirosina a una concentración por debajo de 2 mM, por debajo de 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 a 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 a 1 mM.
- En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende triptófano a una concentración por debajo de 2 mM, por debajo de 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 a 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 a 1 mM.
- En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende metionina a una concentración por debajo de 2 mM, por debajo de 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 a 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 a 1 mM.
- En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende leucina a una concentración por debajo de 2 mM, por debajo de 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 a 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 a 1 mM.
- En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende serina a una concentración por debajo de 2 mM, por debajo de 1 mM, entre 0,1 y 2 mM, entre 0,1 a 1 mM, entre 0,5 y 1,5 mM o entre 0,5 a 1 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende además al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.

5 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende además al menos 5 de glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende además glicina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.

10 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende además al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 de valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.

15 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende además al menos 5 de valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende además valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina a una concentración por encima de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, preferentemente 2 mM.

20 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende serina a una concentración por encima de 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente 10 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende valina a una concentración por encima de 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente 10 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende cisteína a una concentración por encima de 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente 10 mM.

25 En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende isoleucina a una concentración por encima de 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente 10 mM.

En algunas realizaciones el medio de cultivo celular comprende leucina a una concentración por encima de 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM o 20 mM, preferentemente 10 mM.

30 En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular anterior es para su uso en un procedimiento como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular anterior se utiliza en un procedimiento como se divulga en la presente memoria como un medio base. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular anterior se utiliza mediante un procedimiento como se divulga en la presente memoria como medio de alimentación.

Expresión de proteínas

35 Como se ha indicado anteriormente, en muchos casos las células se seleccionarán o modificarán mediante ingeniería genética para producir altos niveles de productos deseados (por ejemplo, proteína recombinante o anticuerpo). 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).

40 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 modificadas mediante ingeniería genética para expresar una proteína específica, existe variabilidad dentro de la población celular de tal manera que ciertas células individuales crecerán mejor, producirán más proteína de interés o producirán una proteína con niveles de actividad más altos (por ejemplo, actividad enzimática). En ciertas realizaciones, el profesional selecciona empíricamente una estirpe celular para un crecimiento robusto bajo las condiciones particulares elegidas para cultivar las células. En algunas realizaciones, se eligen células individuales diseñadas por ingeniería para expresar una proteína particular para la producción a gran escala en base al crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, el título de la proteína expresada o cualquier combinación de estas u otras condiciones que el profesional considere importantes.

50 Se puede producir cualquier proteína que se pueda expresar en una célula huésped de acuerdo con las presentes enseñanzas. El término "célula huésped" como se utiliza en la presente memoria 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 memoria. Una proteína se puede expresar a partir de un gen que es endógeno a 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 se diseñó o seleccionó por la mano del hombre.

Las proteínas que se pueden expresar de manera deseable 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 células en cultivo se selecciona de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio único, glicoproteínas, proteínas terapéuticas, factores de crecimiento, factores de coagulación, citocinas, proteínas de fusión, sustancias de fármaco farmacéuticas, vacunas, enzimas o Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (SMIP). Un experto con conocimientos básicos en la técnica entenderá que cualquier proteína se puede expresar de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína particular que se producirá en base a sus necesidades particulares.

Anticuerpos

Dada la gran cantidad 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 que se va a expresar es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que se derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se ha descrito una variedad enfoques para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 81, 6851 (1985); Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452 (1985), Cabilly *et al.*, Patente de EE. UU. No. 4,816,567; Boss *et al.*, Patente de EE. UU. No. 4,816,397; Tanaguchi *et al.*, Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano derivado, por ejemplo, a través del uso de bibliotecas de visualización de ribosomas o de visualización de fagos (véase, por ejemplo, Winter *et al.*, Patente de EE. UU. No. 6,291,159 y Kawasaki, Patente de EE. UU. No. 5,658,754) o el uso de especies xenográficas en las que los genes de anticuerpos nativos se inactivan y se reemplazan funcionalmente con genes de anticuerpos humanos, mientras que se dejan intactos los otros componentes del sistema inmunitario nativo (véase, por ejemplo, Kucherlapati *et al.*, Patente de EE. UU. No. 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 derivan de anticuerpos humanos, lo que minimiza cualquier posible reacción inmunitaria cuando se suministra a un sujeto humano. En los 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 confieren una especificidad o afinidad antigénica deseada. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden preparar mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la materia (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 preferentemente de acuerdo con las enseñanzas de la Publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400). Los anticuerpos humanizados se pueden producir comercialmente, por ejemplo, por Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña. Para mayor referencia, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados descritos anteriormente pueden contener residuos de aminoácidos que no se encuentran de forma natural en ningún anticuerpo de ninguna especie en la naturaleza. Estos residuos extraños se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir especificidad, afinidad o función efectora novedosas o modificadas al 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 radionúclidos (véase, por ejemplo, Kunz *et al.*, Calicheamicin derived-carrier conjugates, US20040082764 A1).

En general, los profesionales de la presente invención seleccionarán una proteína de interés y conocerán su secuencia precisa de aminoácidos. Cualquier proteína dada que se vaya a expresar de acuerdo con la presente invención puede tener sus propias características particulares y puede influir en la densidad celular o la viabilidad de las células cultivadas, se puede expresar a niveles más bajos que otra proteína que crece bajo condiciones de cultivo idénticas y puede tener una actividad biológica diferente dependiendo de las condiciones de cultivo exactas y las etapas realizadas. Un experto con conocimientos básicos en la técnica podrá modificar de forma apropiada las etapas y las composiciones utilizadas 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 dada.

Introducción de genes para la expresión de proteínas en células hospedadoras

En general, 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. Alternativamente o adicionalmente, una molécula de ácido nucleico introducida puede aumentar la traducción o estabilidad de una proteína expresada por la célula.

Se conocen en la técnica procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de una proteína de interés en células hospedadoras de mamíferos. Véase, 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. En el caso de las células de mamíferos, los procedimientos habituales para introducir material genético en ellas incluyen el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb (*Virology*, 52:456-457, 1978) o el procedimiento lipofectamine™ (Gibco BRL) de Hawley-Nelson (*Focus* 15:73, 1993). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamíferos se ha descrito por Axel en la Patente de EE.UU. No. 4,399,216 expedida el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas para introducir material genético en células de mamíferos, véase Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 1989, Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537, 1990, y Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352, 1988.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que se va a introducir está en forma de una molécula de ácido nucleico desnudo. 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 mamíferos incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, *et al.* *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142, 1985; pMCIneo Poly-A, véase Thomas, *et al.* *Cell* 51:503-512, 1987; un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610; CDM8, véase Seed, B. *Nature* 329:840, 1987; y pMT2PC, véase Kaufman, *et al.* *EMBO J.* 6:187-195, 1987. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico que se va a introducir en una célula está contenida dentro de un vector viral. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína se puede insertar en el genoma viral (o en 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, ligados al gen insertado en el genoma viral) o se pueden proporcionar por el propio genoma viral.

El ADN desnudo se puede introducir en las células al formar un precipitado que contiene el ADN y el fosfato de calcio. Alternativamente, el ADN desnudo también se puede introducir en las células formando una mezcla del ADN y DEAE-dextrano e incubar la mezcla con las células o al incubar las células y el ADN juntos en un tampón apropiado y someter las células a un pulso eléctrico de alto voltaje (por ejemplo, mediante electroporación). Un procedimiento adicional para introducir ADN desnudo en las células es mezclar el ADN con una suspensión de liposomas que contenga lípidos catiónicos. A continuación, el complejo ADN/liposoma se incuba con las células. El ADN desnudo también se puede inyectar directamente en las células mediante, por ejemplo, microinyección.

Alternativamente, el ADN desnudo también se puede introducir en las células mediante la formación de complejos del ADN con un catión, tales como la polilisina, que se acopla a un ligando para un receptor de la superficie celular (véase, por ejemplo, Wu, G. and Wu, C.H. *J. Biol. Chem.* 263:14621, 1988; Wilson *et al.* *J. Biol. Chem.* 267:963-967, 1992; y la Patente de EE.UU. No. 5,166,320). La unión del complejo ADN-ligando al receptor facilita la absorción del ADN por endocitosis mediada por el 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 reciben el ácido nucleico, lo que puede obviar la necesidad de seleccionar 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 células que han absorbido el ácido nucleico del vector viral.

Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión, véase Miller, A.O. *Blood* 76:271, 1990). Se puede construir un retrovirus recombinante que tenga un ácido nucleico que codifique una proteína de interés insertado en el genoma retroviral. Adicionalmente, se pueden eliminar porciones del genoma retroviral para hacer que la replicación del retrovirus sea defectuosa. Dicho retrovirus defectuoso en la replicación se empaqueta luego en viriones que se pueden utilizar para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar mediante técnicas estándar.

El genoma de un adenovirus se puede manipular de tal manera que codifique y exprese una proteína de interés pero se inactive en términos de su capacidad para 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.* Los expertos en la técnica conocen vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.). Los adenovirus recombinantes tienen la ventaja de que no

requieren células en división para ser vehículos eficaces de administración de genes y se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de tipos de células, que incluyen el epitelio de las rutas respiratorias (Rosenfeld *et al.*, 1992, citado anteriormente), células endoteliales (Lemarchand *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486, 1992), hepatocitos (Herz and 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). Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño que contiene) no se integra en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episomal, evitando de esta manera los problemas potenciales que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis insercional en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Más aún, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para el ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) relativo a otros vectores de suministro de genes (Berkner *et al.* citado supra; Haj-Ahmand and Graham, J. Virol. 57:267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales defectuosos para la replicación que se utilizan actualmente tienen eliminados todos o parte de los genes virales E1 y E3, pero retienen hasta el 80 % del material genético adenoviral.

El virus adenoasociado (AAV) es un virus defectuoso que se produce de forma natural y que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para una 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; y McLaughlin *et al.*, J. Virol. 62:1963-1973, 1989). Los vectores que contienen tan sólo 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar y se pueden integrar. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV como el descrito en Tratschin *et al.* (Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260, 1985) se puede utilizar para introducir ADN en las células. Se han introducido diversos ácidos nucleicos en diferentes tipos de células utilizando 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 procedimiento utilizado para introducir moléculas de ácido nucleico en una población de células da como resultado la modificación de una gran proporción de las células y la expresión eficaz de la proteína por las células, la población de células modificada se puede utilizar sin aislamiento adicional o subclonación de células individuales dentro de la población. Es decir, puede haber suficiente producción de la proteína por la población de células de tal manera que no se necesite ningún aislamiento adicional de células y la población se puede utilizar 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 de una sola célula que produzca(n) eficazmente la proteína.

Como 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 un tratamiento adicional de la célula. De manera similar, la célula puede expresar cantidades insuficientes de la proteína para el propósito deseado. Por lo tanto, se puede utilizar un agente que estimule la expresión de la proteína de interés para inducir o aumentar la expresión de esa proteína por la célula. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida puede codificar un factor de transcripción que activa o regula al alza la transcripción de la proteína de interés. La expresión de dicho factor de transcripción a su vez conduce a la expresión, o a una expresión más robusta, de la proteína de interés.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de la proteína se introduce de manera 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 con conocimientos básicos en la técnica podrá elegir si introducir de forma estable o transitoria un ácido nucleico en la célula en base a sus necesidades experimentales.

Un gen que codifica una proteína de interés opcionalmente se puede ligar a uno o más elementos de control genético reguladores. En ciertas realizaciones, un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva de la proteína. En ciertas realizaciones, se puede utilizar 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. Ejemplos no limitantes de elementos de control genético inducibles potencialmente útiles para su uso en células eucariotas incluyen elementos regulados por hormonas (por ejemplo, véase Mader, S. and 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 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 utilizar sistemas reguladores específicos de células adicionales u otros conocidos en la técnica de acuerdo con la invención.

1 Un experto con conocimientos básicos en la técnica podrá elegir y, opcionalmente, modificar apropiadamente el procedimiento 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, será normalmente deseable aislar y/o purificar proteínas expresadas de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, la proteína expresada se secreta en el medio y, por lo tanto, las células y otros sólidos se pueden eliminar, como por centrifugación o filtración, por ejemplo, como una primera etapa en el procedimiento de purificación.

- 5 Alternativamente, la proteína expresada se puede unir a la superficie de la célula huésped. Por ejemplo, el medio se puede eliminar y las células huésped que expresan la proteína se lisan como una primera etapa en el procedimiento de purificación. La lisis de células huésped de mamíferos se puede lograr por cualquier número de medios bien conocidos por aquellos expertos con conocimientos básicos en la técnica, que incluyen la disrupción física con perlas de vidrio y la exposición a condiciones de pH alto.
- 10 La proteína expresada se puede aislar y purificar mediante procedimientos estándar que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño y cromatografía de hidroxipatita), filtración en gel, centrifugación o solubilidad diferencial, 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; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, vol. 182), Academic Press, 1997). En particular, para la cromatografía de inmutafinidad, la proteína se puede aislar a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se generan contra esa proteína y se fijaron a un soporte estacionario. Alternativamente, se pueden adherir a la proteína etiquetas de afinidad, como una secuencia de la capa de influenza, polihistidina o glutatión-S-transferasa, mediante técnicas recombinantes estándar para permitir una purificación fácil mediante el paso por la columna de afinidad adecuada. Se pueden agregar inhibidores de proteasa, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina, en cualquiera o en todos los estadios para reducir o eliminar la degradación de la proteína durante el procedimiento de purificación. Los inhibidores de proteasa son particularmente ventajosos cuando las células se deben lisar para aislar y purificar la proteína expresada.
- 20
- 25 Un experto con conocimientos básicos en la técnica apreciará que la técnica de purificación exacta variará dependiendo del carácter de la proteína que se va a purificar, el carácter de las células a partir de las cuales se expresa la proteína y/o la composición del medio en el que se cultivaron las células.

Formulaciones farmacéuticas

- 30 En ciertas realizaciones preferentes de la invención, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones inventivas como se describió anteriormente se pueden administrar a un sujeto o se pueden formular primero para suministro por cualquier ruta disponible, que incluye, pero no se limitan a, las rutas parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas inventivas incluyen normalmente un polipéptido o proteína purificados expresados a partir de una estirpe celular de mamífero, un agente de suministro (es decir, un polímero catiónico, transportador molecular de péptidos, tensioactivo, etc., como se describió anteriormente) en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente memoria, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.
- 35
- 40

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

- 50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen normalmente 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 una fácil capacidad de inyección. Las formulaciones farmacéuticas preferentes son estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se deben conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el portador relevante puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el
- 55
- 60

uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr al incluir la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el polipéptido o proteína purificados en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el polipéptido o proteína purificado expresado a partir de una estirpe celular de mamífero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferentes son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

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 utilizar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, *por ejemplo*, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un portador fluido para utilizar como enjuague bucal. Se pueden incluir agentes aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Las formulaciones para suministro oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

Para la administración por inhalación, las composiciones inventivas que comprenden un polipéptido o proteína purificada expresada a partir de una estirpe celular de mamífero y un agente de suministro se suministran preferentemente en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, *por ejemplo*, un gas como dióxido de carbono o un nebulizador. La presente invención contempla particularmente el suministro de las composiciones mediante un aerosol nasal, un inhalador u otro procedimiento de suministro directo a las rutas respiratorias superiores y/o inferiores. Se ha mostrado que la administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra los virus de la gripe induce respuestas de células T CD8, lo que indica que al menos algunas células del tracto respiratorio pueden captar ADN cuando se administran por esta ruta, y los agentes de administración de la invención mejorarán la absorción celular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado expresado a partir de una estirpe celular de mamífero y un agente de suministro se formulan como partículas porosas grandes para administración en aerosol.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el polipéptido o proteína purificado y los agentes de suministro se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

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

Las composiciones se preparan con portadores que protegerán el polipéptido o proteína contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas 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 liposomales (que incluyen los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. No. 4,522,811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se

va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de polipéptido o proteína activa 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 períodos de tiempo según sea necesario, por ejemplo, una vez por semana durante aproximadamente entre 1 a 10 semanas, entre 2 a 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 dosis y la temporización necesarias para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. En general, el tratamiento de un sujeto con un polipéptido o proteína como se describe en la presente memoria puede incluir un solo tratamiento o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Además, se entiende que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y pueden opcionalmente ser adaptadas al receptor particular, por ejemplo, a través de 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 particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del polipéptido o proteína específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que se va a modular.

La divulgación incluye el uso de composiciones para el tratamiento de animales no humanos. De acuerdo con lo anterior, las dosis y los procedimientos de administración se pueden seleccionar de acuerdo con los principios conocidos de la farmacología y la medicina veterinaria. Se puede encontrar orientación, 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 envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de los subproductos metabólicos que se acumulan en cultivos en lote alimentado y que tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento de células de mamíferos en cultivo

Objetivo:

Este experimento se llevó a cabo para identificar los principales inhibidores del crecimiento (subproductos metabólicos) que se acumulan en cultivos en lote alimentado convencionales y restringidos en glucosa de células de mamíferos, utilizando enfoques de perfilación global de metabolitos.

Materiales y procedimientos:

Células y medio

En el experimento actual se utilizaron células CHO que comprenden un sistema de expresión de glutamina sintasa (disponible comercialmente de Lonza) (en adelante GS-CHO, estirpe celular A) y que expresan un anticuerpo recombinante. En este experimento se utilizaron dos tipos de medio. El primer medio es el "Medio A", que se utiliza para la inoculación del experimento el día 0 del cultivo. El segundo medio es el "Medio B", que es el medio nutritivo enriquecido utilizado como medio de alimentación para los procedimientos de lotes alimentados convencionales y HIPDOG (descritos en la siguiente sección).

El medio A es una versión fortificada del Medio 9 sin insulina (US7294484, tabla 14), con ligeras diferencias en las concentraciones de bicarbonato de sodio y cloruro de potasio, y que contiene Pluronic F68 en lugar de alcohol polivinílico. Se fortificó al agregar un 10 % de medio 5 sin glutamina (US7294484, tabla 7) y aumentar aún más las concentraciones de ocho aminoácidos (Glu, Tyr, Gly, Phe, Pro, Thr, Trp y Val). Las concentraciones de aminoácidos se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Concentración de aminoácidos en el Medio A

Aminoácidos	Concentración en Medio A (mM)
alanina	0,4
arginina	5,3

(continuación)

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

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

5 **Tabla 2: Concentración de aminoácidos en el Medio B**

Aminoácidos	Concentración en el Medio B (mM)
alanina	6,0
arginina	32,9
asparagina•H ₂ O	54,0
ácido aspártico	15,0
cisteína•HCl•H ₂ O	0,0
cistina•2HCl	4,7
ácido glutámico	6,0
glutamato monosódico	0,0
glutamina	0,0
glicina	6,0
histidina•HCl •H ₂ O	10,5
isoleucina	27,0
leucina	38,9

(continuación)

Aminoácidos	Concentración en el Medio B (mM)
lisina•HCl	30,0
metionina	12,0
fenilalanina	15,0
prolina	18,0
serina	45,2
treonina	24,0
triptófano	4,8
tirosina•2Na•2H ₂ O	12,0
valina	24,0

Configuración del biorreactor

5 Se emplearon dos condiciones, que incluye un procedimiento en lote alimentado convencional y un procedimiento en lote alimentado restringido con glucosa. En el procedimiento en lote alimentado restringido con glucosa (en adelante, cultivo con HIPDOG), la glucosa se limitó al utilizar la tecnología HIPDOG (Gagnon et al., 2011). La banda muerta de pH utilizada mientras el control HIPDOG estaba en operación fue de 7,025 +/- 0,025.

10 El procedimiento convencional fue idéntico al procedimiento HIPDOG con respecto a la densidad celular del inóculo deseada (1E6 células/ml), el medio utilizado, el volumen de cultivo (1 l), la cantidad de alimento agregado diariamente al cultivo y los parámetros del procedimiento, que incluyen la temperatura (36,5 °C), pH (6,9-7,2) y tasa de agitación (267 rpm). Los dos cultivos solo diferían en sus niveles de glucosa. En el cultivo convencional, la glucosa se mantuvo en niveles mayores que 2 g/l entre los días 2 y 5, mientras que en el cultivo con HIPDOG las células consumieron glucosa de forma natural hasta que el nivel de glucosa descendió hasta un punto en el que las células comenzaron a consumir también ácido láctico (observado por un ligero aumento del pH del cultivo) y comenzó la tecnología/estrategia de alimentación HIPDOG. Después del día 5, los niveles de glucosa en ambas condiciones se mantuvieron en concentraciones por encima de 2 g/l mediante la alimentación con glucosa según fuera necesario y se trataron de manera similar hasta el día 12. La densidad de células viables, la concentración de lactato y amoníaco en el medio de cultivo celular se midieron diariamente para ambas condiciones. El medio base utilizado es el Medio A y el medio de alimentación utilizado fue el Medio B.

20 Para el análisis metabolómico, se recogieron y analizaron muestras de medio gastado y muestras de sedimento celular a partir de ejecuciones de reactores duplicados, realizadas para cada condición. Los puntos de tiempo considerados para el análisis incluyen los días 0, 2, 3, 5, 7, 9 y 10. El enfoque metabolómico utilizado empleó técnicas de RMN (grupos 4 y 5 de la Tabla 3), LC/MS y GC/MS (grupos 1 a 3 de la Tabla 3) para evaluar los niveles relativos de metabolitos en diferentes puntos de tiempo del cultivo. Los detalles de la preparación de la muestra y el tipo de equipo/procedimientos utilizados para el análisis de RMN, LC/MS y GC/MS se describen a continuación. Se midieron y calcularon los niveles relativos (variaciones en el factor de multiplicación) de todos los metabolitos. Los niveles relativos se determinaron tanto en el medio gastado como en las muestras de sedimento celular, que se calcularon en base a las variaciones en el factor de multiplicación en comparación con el nivel del metabolito cuando se detectó por primera vez. Las variaciones en el factor de multiplicación se utilizaron para identificar los metabolitos que se estaban acumulando a niveles muy altos el día 7 del cultivo con HIPDOG y del cultivo en lote alimentado convencional.

Procedimientos para el análisis metabolómico*Cromatografía de líquidos/gases con espectrometría de masas*

35 La preparación de la muestra se realizó utilizando una extracción con metanol para eliminar la fracción proteica y permitir la máxima recuperación de moléculas pequeñas. El extracto resultante se secó bajo vacío y posteriormente se utilizó para la preparación de la muestra para el instrumento adecuado, ya sea LC/MS o GC/MS.

40 La porción LC/MS de la plataforma se basó en un Waters ACQUITY UPLC y un espectrómetro de masas Thermo Finnigan LTQ, que consistía en una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas con trampa de iones lineal (LIT). La muestra se analizó de forma independiente en los modos de iones positivos y negativos. La muestra se reconstituyó en condiciones ácidas para el modo de iones positivos y se eluyó en gradiente utilizando agua y metanol, ambos con un 0,1 % de ácido fórmico, mientras que para el modo de iones negativos, la muestra se reconstituyó en extractos básicos, que también utilizaron agua/metanol, que contenían 6,5 mM de bicarbonato de

amonio para la elución en gradiente. El análisis de MS alternó entre MS y escaneos MS² dependientes de datos utilizando exclusión dinámica.

Las muestras destinadas al análisis GC/MS se volvieron a secar bajo desecación al vacío durante un mínimo de 24 horas antes de ser derivatizadas bajo nitrógeno seco utilizando bistrimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA). La columna GC tenía un 5 % de fenilo y la rampa de temperatura es de 40° a 300° C en un período de 16 minutos. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple de escaneo rápido Thermo-Finnigan Trace DSQ utilizando ionización por impacto electrónico. El instrumento se ajustó y calibró para resolución de masas y precisión de masas de manera frecuente.

Los datos se extrajeron de los archivos de datos de espectrometría de masas sin procesar y se identificaron los picos. Posteriormente, los picos se anotaron y cuantificaron (valores de intensidad arbitrarios) con información del compuesto mediante comparación con las entradas de la biblioteca de estándares purificados o entidades desconocidas recurrentes. La combinación de propiedades cromatográficas y espectros de masas dio una indicación de una coincidencia con el compuesto específico o una entidad isobárica.

Preparación de muestras de RMN, adquisición de datos y procesamiento

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

Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro de RMN Varian VNMRS de cuatro canales de 700 MHz equipado con una sonda biomolecular de triple resonancia 1H/13C enfriada criogénicamente con sintonización automática. La secuencia de pulsos utilizada fue una 1 D-tnoesy con una presaturación de 990 ms en agua y un tiempo de adquisición de 4 s. Los espectros se recogieron con 32 transitorios y 4 escaneos de estado estable a 298 K.

Los espectros se procesaron y se generaron archivos.cnx utilizando el módulo Procesador en Chenomx NMR Suite 8.0. Los compuestos se identificaron y cuantificaron utilizando el módulo Perfilador en Chenomx NMR Suite 8.0 con la versión 9 de la Biblioteca de Compuestos de Chenomx, que contiene 332 compuestos. Para fines de informes, las concentraciones perfiladas se han corregido para reflejar la composición de la muestra original, en lugar del contenido del tubo de RMN. Durante la preparación de la muestra, cada muestra se diluye al introducir un estándar interno y, cuando es necesario, para aumentar el volumen analizado de una muestra pequeña.

Resultados:

Inicialmente, las células crecieron exponencialmente tanto en cultivos convencionales como en cultivos HIPDOG y alcanzaron densidades celulares máximas el día 6 y el día 7, respectivamente, y el cultivo con HIPDOG alcanzó un máximo a densidades celulares mucho más altas (Figura 1). Los niveles de lactato en el procedimiento HIPDOG se mantuvieron bajos debido a la aplicación del control HIPDOG (entre el día 2 - 5), mientras que los niveles de lactato se acumularon hasta niveles muy altos en el caso del cultivo en lote alimentado convencional. El amoníaco también se mantuvo en niveles bajos durante el cultivo convencional y el HIPDOG mediante el uso de células que comprendían un sistema de expresión de glutamina sintetasa. El título (cantidad de proteína de interés por litro de medio de cultivo celular) se midió al final del cultivo (día 12). El cultivo con HIPDOG alcanzó un título más alto en comparación con el procedimiento convencional. Las diferencias en las densidades celulares y los valores de título probablemente sean el resultado de las diferencias en las acumulaciones de lactato observadas entre los dos cultivos.

Los metabolitos que se acumulaban hasta niveles altos el día 7 del cultivo con HIPDOG se identificaron en base a las variaciones de pliegue medidos utilizando las técnicas de perfil de metabolitos globales. Para cada uno de los metabolitos identificados anteriormente, se determinó la concentración en la que el metabolito afecta negativamente el crecimiento de la célula mediante experimentos de adición de compuestos purificados (véase el ejemplo 3). Los resultados de estos experimentos se utilizaron para reducir la lista de los inhibidores nuevos putativos. Se identificó un total de 9 inhibidores mediante este procedimiento. La lista de los 9 metabolitos identificados como inhibidores potenciales, así como su fuente metabólica potencial en el medio de cultivo celular, se presentan en la Tabla 3.

La Tabla 3 muestra los nombres y las clases funcionales de los nueve metabolitos identificados como inhibidores putativos del crecimiento que se acumulan en los cultivos en lote alimentado con GS-CHO

<u>Grupo</u>	<u>Metabolito</u>	<u>Clase Funcional</u>
1	3-(4-hidroxifenil)lactato (HPLA)	Metabolismo de la fenilalanina y la tirosina
	4-hidroxifenilpiruvato	

(continuación)

<u>Grupo</u>	<u>Metabolito</u>	<u>Clase Funcional</u>
	Fenilactato (PLA)	Metabolismo de la fenilalanina
2	Indollactato (indol-3-lactato)	Metabolismo del triptófano
	Ácido indolcarboxílico (ácido indol-3-carboxílico)	
3	Homocisteína	Metabolismo de la metionina
	Ácido 2-hidroxibutírico	
4	Isovalerato	Leucina
5	Formato	Serina, treonina y glicina

Ejemplo 2: Determinación de la concentración a la que se acumulan los inhibidores putativos en los últimos estadios de los cultivos en lote alimentado de HIPDOG

5 Objetivo:

Este experimento se llevó a cabo para evaluar las concentraciones de inhibidores putativos del crecimiento recientemente identificados (subproductos metabólicos) en diferentes puntos de tiempo en los cultivos en lote alimentado de HIPDOG de células GS-CHO.

Materiales y procedimientos:

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

Resultados:

- 25 Las concentraciones de los metabolitos recientemente identificados de los dos primeros grupos de la Tabla 3 se determinaron utilizando las curvas de calibración desarrolladas, y las concentraciones de los metabolitos enumerados en los grupos 4 y 5 se determinaron mediante tecnología de RMN como se discute en la sección Materiales y Procedimientos del Ejemplo 1. La concentración de seis inhibidores putativos (fenilactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, indollactato, isovalerato y formato) en el día 7 de los cultivos en lote alimentado de HIPDOG se enumeran en la Tabla 4.

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

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

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

Objetivo:

Este experimento se llevó a cabo para evaluar el efecto de los inhibidores putativos recientemente identificados, en las concentraciones determinadas el día 7 del cultivo con HIPDOG, sobre el crecimiento de células GS-CHO en cultivo. Primero se probó el efecto independiente de los nueve metabolitos (fenillactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato) sobre el crecimiento de las células. Posteriormente, se probó el efecto sinérgico de cuatro metabolitos (fenillactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato e indollactato) sobre el crecimiento celular.

Materiales y procedimientos:

Las células GS-CHO productoras de un anticuerpo recombinante se inocularon a bajas densidades de células viables (0,1E6 células/ml) en diversas condiciones en cultivos en placas de 6 pocillos con un volumen de 5 ml. Estas condiciones incluyen Medio A fresco o Medio A fresco enriquecido con cuatro inhibidores putativos en concentraciones detectadas el día 7 del cultivo con HIPDOG del Ejemplo 1 (fenillactato a 0,2 mM, 3-(4-hidroxifenil)lactato a 0,38 mM, 4-hidroxifenilpiruvato a 0,08 mM e indollactato a 0,26 mM). En un experimento independiente, se inocularon células GS-CHO productoras de un anticuerpo recombinante a bajas densidades de células viables en Medio A fresco enriquecido con diferentes concentraciones de 9 inhibidores (ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, fenillactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, indollactato, isovalerato y formato) con un inhibidor a la vez por condición. El pH del Medio A, enriquecido con cualquiera de los nueve metabolitos o cualquier combinación de los nueve metabolitos, se ajustó a 7 antes de inocular las células (el día 0). Las concentraciones probadas son:

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

Para el indollactato, la solución madre (500 mM) se preparó en DMSO. Por lo tanto, se incluyeron condiciones de enriquecimiento de DMSO puro ('cont de DMSO' o control de DMSO) para cada concentración de indollactato analizada, a fin de controlar el efecto del DMSO sobre el crecimiento de las células. Todas las condiciones se realizaron por duplicado o triplicado. El crecimiento de las células en las condiciones descritas anteriormente se monitorizó durante 5 o 6 días.

Resultados:

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

Un experimento anterior mostró que las células GS-CHO, cuando se trataron de forma independiente con cada uno de los siete inhibidores putativos de los grupos 1 a 3, la concentración a la que se inhibe el crecimiento celular fue generalmente mucho mayor que la concentración medida el día 7 del cultivo en lote alimentado con HIPDOG. Por lo tanto, se evaluó posteriormente el efecto de estos inhibidores cuando se trataron en combinación. Curiosamente, al tratar las células con la combinación de cuatro metabolitos (fenillactato, 4-hidroxifenilactato, 3-(4-hidroxifenil)lactato e indollactato), en concentraciones detectadas el día 7 del cultivo con HIPDOG, el crecimiento celular se inhibió significativamente en comparación con el crecimiento celular en el medio fresco (Figura 6). Estos datos indican que los cuatro metabolitos anteriores actúan de manera sinérgica para inhibir el crecimiento de las células GS-CHO.

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

crecimiento celular, la reducción de los niveles de metionina, leucina, serina, treonina y glicina en el cultivo podría limitar potencialmente la formación de estos metabolitos y promover el crecimiento celular.

Ejemplo 4: Reducción del efecto supresor del crecimiento de los inhibidores recientemente identificados mediante estrategias de limitación de nutrientes en cultivos en lote alimentado

5 Objetivo:

Este experimento se realizó para reducir la formación de inhibidores recientemente identificados mediante la limitación del suministro de las fuentes de carbono responsables de su biosíntesis. El objetivo de este experimento fue evaluar si dicha reducción en la formación de inhibidores alivia la supresión del crecimiento en los últimos estadios del cultivo, lo que da como resultado un aumento de las densidades máximas de células viables en los cultivos en lote alimentado.

10 Materiales y procedimientos:

Configuración de células y biorreactor

En el presente experimento se utilizaron células GS-CHO que expresaban un anticuerpo recombinante (estirpe celular A). Como parte de este experimento se probaron dos condiciones: A) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de cuatro aminoácidos (tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano) (condición de bajo AA), B) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (condición HIPDOG de control). Se inocularon células de crecimiento exponencial a partir de cultivos de semillas a una concentración de 1×10^6 células/ml en cada biorreactor de producción. Para ambas condiciones, la estrategia HIPDOG estuvo en operación entre el día 2 y el día 7 del cultivo. En la condición de bajo contenido de aminoácidos, las concentraciones de tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los primeros siete días del cultivo, después de lo cual se ajustaron a los niveles de cada uno de esos aminoácidos en la condición HIPDOG de control. Después del día 7, ambas condiciones se trataron de manera similar. La densidad de células viables, lactato, amoníaco y concentraciones de aminoácidos se midieron diariamente (los aminoácidos se midieron solo durante los primeros siete días). Para ambas condiciones, la densidad de células viables del inóculo objetivo (1×10^6 células/ml), el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del procedimiento, que incluyen la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la tasa de agitación (267 rpm) fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición HIPDOG de control fue Medio A y el utilizado en la condición de Bajo AA fue la versión modificada del Medio A con bajas concentraciones de los cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina a aproximadamente 0,6 mM). El medio de alimentación utilizado para el cultivo de control HIPDOG fue el Medio B. Para la condición de Bajo AA, se formuló y utilizó como medio de alimentación el Medio B original o una versión modificada del Medio B con una concentración más alta de cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, metionina y fenilalanina) (60 % más alta para metionina y ~100 % más altos para tirosina, triptófano y fenilalanina en comparación con el Medio de alimentación original B). Los niveles de los cuatro aminoácidos en la versión modificada del Medio B se configuraron en base a las tasas de consumo específicas de las células para los cuatro aminoácidos y el programa de alimentación determinado previamente para la estirpe celular A en un procedimiento HIPDOG. Las concentraciones de aminoácidos se midieron todos los días utilizando un procedimiento de aminoácidos basado en UPLC que se describe en detalle a continuación. En base al nivel de aminoácidos en un punto de muestreo determinado y del programa de alimentación, se eligió uno de los dos tipos de medio B (concentración original o superior) como medio de alimentación hasta el siguiente punto de muestreo, de tal manera que la concentración de los cuatro aminoácidos se encuentre entre 0,5 mM-1 mM en el siguiente punto de tiempo de muestreo.

40 Análisis de aminoácidos

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

55 Resultados:

Las concentraciones de aminoácidos se mantuvieron con éxito entre 0,5 mM-1 mM en condiciones de Bajo AA (Figura 8 y Figura 9). Las concentraciones de aminoácidos en el procedimiento de control HIPDOG se mantuvieron altas durante el curso del cultivo. Como se muestra en la Figura 7, las densidades celulares en la condición de Bajo AA

alcanzaron un máximo de alrededor de 35×10^6 células/ml el día 7, mientras que las densidades celulares en la condición HIPDOG de control alcanzaron un máximo de alrededor de 32×10^6 células/ml. Los niveles de titulación de cosecha en la condición de Bajo AA (5,3 g/l) fueron un 18 % más altos que en la condición de control (4,5 g/l). Claramente, limitar el suministro de aminoácidos aumentó las densidades celulares (y, por lo tanto, la titulación) en los últimos estadios de los cultivos.

El Ejemplo 5 demuestra que dicho aumento en el crecimiento y la productividad se puede explicar como resultado de la producción reducida de los inhibidores recientemente identificados.

Ejemplo 5: Demostración de (i) la acumulación reducida de los inhibidores recientemente identificados a través de la limitación de aminoácidos y (ii) la reproducibilidad del efecto positivo de dicha limitación de metabolitos inhibidores en el crecimiento de células GS-CHO (estirpe celular A) en cultivos en lote alimentado.

Objetivo:

El objetivo principal de este ejemplo es demostrar la reducción en la acumulación de los inhibidores recientemente identificados en cultivos en lote alimentado al limitar el suministro de las fuentes de carbono (aminoácidos) responsables de su biosíntesis. En este ejemplo, se incluyen dos experimentos para demostrar que dicha reducción en los niveles de los inhibidores recientemente identificados a través de la limitación de cuatro u ocho aminoácidos alivia la supresión del crecimiento en los últimos estadios del cultivo en lote alimentado, lo que da como resultado un aumento de las densidades máximas de células viables.

Materiales y procedimientos:

Células y configuración del biorreactor

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

A) cultivo de lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano (condición Bajo 4AA + HIPDOG),

B) cultivo de lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, serina, treonina y glicina (condición Bajo 8AA + HIPDOG), y,

C) dos cultivos de lote alimentado con HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (HIPDOG 1 y HIPDOG 2).

En un segundo experimento se probaron dos condiciones:

A) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, serina, treonina y glicina (condición Bajo 8AA + HIPDOG) y,

B) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano (condición Bajo 4AA + HIPDOG).

El primer experimento se llevó a cabo durante 12 días, mientras que el segundo experimento se llevó a cabo durante 16 días.

En ambos experimentos, se inocularon células de crecimiento exponencial de cultivos de semillas a 1×10^6 células/ml en cada biorreactor de producción. Para todas las condiciones, el control HIPDOG estuvo en operación entre el día 2 y el día 7 del cultivo. En las condiciones de bajo contenido de aminoácidos, las concentraciones de los cuatro u ocho aminoácidos mencionados anteriormente se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los primeros siete días del cultivo, tras lo cual se ajustaron a niveles más cercanos a los respectivos aminoácidos en las condiciones de control HIPDOG. Después del día 7, ambas condiciones se trataron de manera similar. Las concentraciones de células viables, amoníaco y aminoácidos se midieron diariamente. Para todas las condiciones, la densidad de células viables del inóculo diana (1×10^6 células/ml), el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del procedimiento, que incluyen la temperatura (36,5 °C), pH (6,9-7,2) y tasa de agitación (259 rpm) fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición HIPDOG fue el Medio A y el utilizado en condiciones de bajo contenido de aminoácidos fue la versión modificada del Medio A con bajas concentraciones de cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina a aproximadamente 0,6 mM) u ocho aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina, metionina, leucina, serina, treonina y glicina a aproximadamente 0,6 mM). El medio de alimentación utilizado para todas las condiciones fue el Medio B. Las concentraciones de aminoácidos se midieron todos los días utilizando el procedimiento de aminoácidos basado en UPLC como se describe en el Ejemplo 4. En las condiciones de bajo contenido de aminoácidos, en base al nivel de aminoácidos en un punto de muestreo determinado y el programa de alimentación a seguir, se complementaron las condiciones con soluciones concentradas de los aminoácidos de tal manera que la concentración de los cuatro aminoácidos o los ocho aminoácidos en las condiciones de bajo contenido de aminoácidos correspondientes estuviera entre 0,5 mM-1 mM en el siguiente punto de tiempo de muestreo. Se analizaron muestras de medio gastado de

diversas condiciones en ambos experimentos para determinar los niveles de los inhibidores recientemente identificados utilizando la tecnología de RMN descrita en la sección Materiales y Procedimientos del Ejemplo 1.

Resultados:

En el primer experimento, las concentraciones de aminoácidos se mantuvieron con éxito entre 0,5 mM-1 mM en las condiciones tanto de Bajo 4 AA como de Bajo 8 AA hasta el día 7 de los cultivos en lote alimentado (Figuras 11-14). Dicha limitación de los niveles de aminoácidos en las dos condiciones resultó en niveles más bajos de acumulación de los metabolitos recientemente identificados (Figura 15 y Figura 16). Se perfilaron específicamente el isovalerato, formato, 3-(4-hidroxifenil)lactato e indol-3-lactato. El isovalerato y el formato son subproductos de la leucina, serina, glicina y treonina, que se controlan en niveles bajos solo en la condición Bajo 8 AA. Estos aminoácidos no se controlan en niveles bajos en la condición Bajo 4 AA. En correspondencia, solo se observaron concentraciones significativamente más bajas de isovalerato en la condición Bajo 8 AA. Los niveles de isovalerato fueron más altos en las condiciones de control de HIPDOG y en la condición Bajo 4 AA (Figura 15B). Los niveles de formato fueron similares en todas las condiciones en el día 7 del cultivo; sin embargo, sobre una base por célula, la cantidad de formato producida es menor en la condición Bajo 8 AA en comparación con las condiciones HIPDOG. Los otros dos inhibidores perfilados, 3-(4-hidroxifenil)lactato e indol-3-lactato, son subproductos de los aminoácidos fenilalanina y triptófano, que se controlan en niveles más bajos tanto en las condiciones Bajo 8 AA como Bajo 4 AA. Se observaron concentraciones significativamente más bajas de estos dos inhibidores en las condiciones Bajo 8 AA y Bajo 4 AA en comparación con las condiciones HIPDOG en el día 7 (Figuras 15A y 16).

Las células en condiciones de Bajo 8 AA y Bajo 4 AA crecieron mejor que las condiciones de control (HIPDOG1 y HIPDOG 2), alcanzando un máximo densidades celulares máximas de 50×10^6 células/ml y 45×10^6 células/ml, respectivamente, el día 9, mientras que las densidades celulares en condiciones de control HIPDOG alcanzaron un máximo de alrededor de 32×10^6 células/ml (Figura 10A). dicho aumento en el crecimiento celular observado en los últimos estadios de las condiciones de bajo contenido de aminoácidos se puede explicar como resultado de las acumulaciones reducidas de inhibidores en el cultivo (Figuras 15 y 16). Además, las condiciones de bajo contenido de aminoácidos tuvieron un título más alto en comparación con las condiciones de HIPDOG de control hasta el día 9, que luego disminuyó para igualar los niveles de título de las condiciones HIPDOG al final del cultivo (Figura 10B). La reducción posterior al día 9 en la producción de proteínas en las condiciones de bajo contenido de aminoácidos se atribuyó al agotamiento casi total de los niveles de tirosina en los cultivos después del día 9 (Figura 11A).

El segundo experimento se realizó para verificar y reproducir el efecto positivo aumentado de limitar la leucina, serina, glicina y treonina en la condición Bajo 8 AA en comparación con la condición Bajo 4 AA (Figura 17). Solo se probaron dos condiciones en este experimento, incluidas la condición Bajo 8 AA y la condición Bajo 4 AA utilizando la estirpe celular A. Los ocho aminoácidos o los cuatro aminoácidos se controlaron entre 0,5 mM y 1 mM hasta el día 7 del cultivo. Los datos de aminoácidos no se muestran para este experimento, pero son similares a los perfiles de aminoácidos observados para las dos condiciones en el experimento anterior (Figuras 11 - 14), excepto por la tirosina que no se agotó en este experimento. Las células crecieron mejor en la condición Bajo 8 AA alcanzando un máximo de 42×10^6 células/ml el día 9, mientras que las densidades celulares en la condición Bajo 4 AA alcanzaron un máximo de alrededor de 33×10^6 células/ml (Figura 17). Dicha mayor densidad celular también se tradujo en mayores niveles de titulación de cosecha en las condiciones de 8 Bajo AA en comparación con las condiciones de 4 Bajo AA.

Ejemplo 6: Demostración de (i) la reducción en la acumulación de los inhibidores recientemente identificados a través de la limitación de aminoácidos y (ii) el efecto positivo de dicha limitación de metabolitos inhibidores sobre el crecimiento de una estirpe celular GS-CHO diferente (estirpe celular BJ en cultivos en lote alimentado).

Objetivo:

Este experimento se realizó para demostrar que los efectos beneficiosos para el crecimiento de limitar los niveles de ciertos aminoácidos sobre el crecimiento de las células no eran específicos de una estirpe celular (estirpe celular A) sino que son más generales y se pueden aplicar a otras estirpes celulares. Se realizaron dos experimentos de limitación de nutrientes como parte de este ejemplo utilizando una estirpe celular CHO diferente (estirpe celular B) que produce un anticuerpo recombinante diferente. El objetivo de estos experimentos fue mostrar que en los cultivos en lote alimentado, el control de aminoácidos a niveles más bajos da como resultado acumulaciones reducidas de inhibidores y dichas acumulaciones bajas de inhibidores pueden explicar las mayores densidades de células viables y títulos de proteínas que se observaron en los cultivos en lote alimentado con bajo contenido de aminoácidos.

Materiales y procedimientos:

Configuración de células y biorreactor

En este ejemplo se utilizó una nueva estirpe celular GS-CHO (estirpe celular B) que expresa un anticuerpo recombinante diferente. Se realizaron dos experimentos para comprender el efecto de limitar simultáneamente cuatro u ocho aminoácidos. En el primer experimento, se probaron dos condiciones: A) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de ocho aminoácidos, que incluyen tirosina, metionina, fenilalanina, triptófano, leucina, serina, glicina y treonina (condición de Bajo 8 AA + HIPDOG) y B) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con

concentraciones normales de aminoácidos (condición HIPDOG). En el segundo experimento, se probaron dos condiciones:

A) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con niveles bajos de cuatro aminoácidos, que incluyen tirosina, metionina, fenilalanina y triptófano (condición Bajo 4 AA + HIPDOG) y B) cultivo en lote alimentado con HIPDOG con concentraciones normales de aminoácidos (condición HIPDOG). El primer experimento se ejecutó durante 12 días, mientras que el segundo experimento se ejecutó solo hasta el día 8 del cultivo.

Las células de crecimiento exponencial de los cultivos de semillas se inocularon a 1×10^6 células/ml en cada biorreactor de producción. Para todas las condiciones, la estrategia HIPDOG estuvo en operación entre el día 2 y el día 7 del cultivo. En las condiciones de bajo contenido de aminoácidos, las concentraciones de los cuatro u ocho aminoácidos mencionados anteriormente se mantuvieron entre 0,5 mM y 1 mM durante los primeros siete días del cultivo, después de lo cual se ajustaron a niveles más cercanos a los respectivos aminoácidos en la condición HIPDOG de control. Después del día 7, ambas condiciones se trataron de manera similar. Las concentraciones de células viables, amoníaco y aminoácidos se midieron diariamente durante todo el cultivo. Para todas las condiciones, la densidad de células viables del inóculo diana (1×10^6 células/ml), y el volumen de cultivo (1 l) y los parámetros del procedimiento, incluida la temperatura (36,5 °C), el pH (6,9-7,2) y la tasa de agitación (259 rpm) fueron idénticos. El medio base utilizado en la condición HIPDOG fue el Medio A y el utilizado en las condiciones de Bajo AA fue la versión modificada del Medio A con bajas concentraciones de cuatro aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina y metionina a aproximadamente 0,6 mM) u ocho aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina, metionina, leucina, serina, treonina y glicina a aproximadamente 0,6 mM). El medio de alimentación utilizado para todas las condiciones fue el Medio B. Las concentraciones de aminoácidos se midieron todos los días utilizando el procedimiento de aminoácidos basado en UPLC como se describe en el Ejemplo 4. En las condiciones de aminoácidos bajos, en base al nivel de aminoácidos en un punto de muestreo determinado y el programa de alimentación a seguir, se complementaron las condiciones con soluciones concentradas de los aminoácidos de tal manera que la concentración de los cuatro aminoácidos o los ocho aminoácidos en las condiciones correspondientes estuviera entre 0,5 mM-1 mM en el siguiente punto de muestreo. Se analizaron muestras de medio gastado de diversas condiciones en ambos experimentos de este Ejemplo para cuantificar los niveles de los inhibidores recientemente identificados utilizando la tecnología de RMN, como se describe en la sección Materiales y Procedimientos del Ejemplo 1.

Resultados:

En el primer experimento, las concentraciones de los ocho aminoácidos se mantuvieron con éxito entre 0,5 mM - 1 mM en condiciones de Bajo 8 AA hasta el día 7 de los cultivos en lote alimentado. Los perfiles de cultivo de aminoácidos no se muestran para este experimento, pero son similares a los observados para las condiciones similares en el Experimento 1 del Ejemplo 5 (Figuras 11 - 14), excepto por la tirosina, que no se agotó en este experimento. Dicha limitación de los niveles de aminoácidos en la condición de Bajo 8 AA resultó en niveles más bajos de biosíntesis y una acumulación reducida de los metabolitos recientemente identificados. Se perfilaron cuatro de los nueve inhibidores enumerados en la Tabla 3 (Figura 19 y Figura 20). En la condición de Bajo 8 AA, se observaron acumulaciones significativamente menores de isovalerato, 3-(4-hidroxifenil)lactato e indol-3-lactato en comparación con la condición HIPDOG de control. Se observó que los niveles de formato eran más altos en la condición Bajo 8 AA el día 10 del cultivo, sin embargo, sobre una base por célula, la cantidad de formato producida fue similar en la condición Bajo 8 AA en comparación con la condición HIPDOG. Las células en condiciones Bajo 8 AA crecieron mejor que las de la condición de control (HIPDOG), alcanzando un máximo en densidades celulares de 40×10^6 células/ml el día 9, mientras que las densidades celulares en las condiciones de control HIPDOG alcanzaron un máximo de alrededor de 32×10^6 células/ml (Figura 18A). Además, el aumento del crecimiento observado en la condición Bajo 8 AA se tradujo en niveles de titulación más altos en comparación con la condición HIPDOG de control (Figura 18B). dicho aumento en el crecimiento celular y la productividad observados en la condición de bajo contenido de aminoácidos se puede explicar como resultado de la biosíntesis y acumulación reducidas del inhibidor (Figuras 19 y 20).

El segundo experimento se realizó para investigar el efecto de controlar los niveles de cuatro aminoácidos (tirosina, fenilalanina, triptófano y metionina) entre 0,5 mM - 1 mM (Bajo 4 AA + HIPDOG) sobre el crecimiento y la productividad de la estirpe celular B, en comparación con la condición HIPDOG de control (Figuras 21-23). Los perfiles de cultivo de aminoácidos no se muestran para este experimento, pero son similares a los observados para las condiciones similares en el Experimento 1 del Ejemplo 5 (Figuras 11 - 14), excepto la tirosina, que no se agotó en este experimento. Dicha limitación de los niveles de aminoácidos en la condición Bajo 4 AA resultó en niveles más bajos de biosíntesis y una acumulación reducida de los metabolitos recientemente identificados. Se perfilaron cuatro de los nueve inhibidores enumerados en la Tabla 3 (Figura 22 y Figura 23). Excepto el isovalerato, los niveles de los otros tres inhibidores fueron más bajos en la condición Bajo 4 AA en comparación con la condición HIPDOG. La leucina no es uno de los aminoácidos que se controlan en niveles bajos en la condición Bajo 4 AA, por lo que su intermediario metabólico isovalerato se acumula en la condición Bajo 4 AA a niveles similares a los observados en la condición HIPDOG de control. Las células en condiciones Bajo 4 AA crecieron mejor, alcanzando un máximo de densidades celulares de 37×10^6 células/ml el día 9 del cultivo, mientras que las densidades celulares en la condición HIPDOG de control alcanzaron un máximo de alrededor de 32×10^6 células/ml (Figura 21A). Además, el aumento del crecimiento observado en la condición Bajo 4 AA se tradujo en niveles de titulación más altos en comparación con la condición HIPDOG de control (Figura 21B). Dicho aumento en el crecimiento celular y la productividad observados en

la condición de bajo contenido de aminoácidos se puede explicar como resultado de la biosíntesis y acumulación reducidas del inhibidor (Figuras 22 y 23).

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

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

Los espectros Raman para todos los aminoácidos se han publicado previamente en la literatura. Los espectros Raman de los metabolitos inhibidores recientemente identificados se caracterizan utilizando una solución de los metabolitos purificados. Se construye un modelo empírico al emplear un conjunto de entrenamiento de datos espectrales generados utilizando concentraciones conocidas de cada uno de los cuatro u ocho aminoácidos o de los inhibidores recientemente identificados, de forma individual. La matriz de muestra (fondo) utilizada para la preparación de muestras de calibración (utilizada como conjunto de entrenamiento) es una mezcla de muestras de medios gastadas tomadas de diferentes puntos de tiempo de diferentes procedimientos de cultivo celular. El modelo desarrollado utilizando dicho conjunto de entrenamiento es más general y se puede aplicar a cualquier otro procedimiento de cultivo celular. Este modelo se utiliza para medir la concentración de los cuatro u ocho aminoácidos o los metabolitos (inhibidores) en el cultivo (en línea) y, de acuerdo con lo anterior, controlar los niveles de aminoácidos a través de estrategias de alimentación con control de retroalimentación.

Ejemplo 8: Supresión de la formación de inhibidores mediante el control de aminoácidos a niveles bajos en cultivos en lote alimentado al utilizar la medición en línea de la concentración de inhibidores

Un procedimiento en lote alimentado está diseñado para reducir la formación de inhibidores a través del control de cuatro (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) a niveles bajos, por ejemplo, entre 0,2-1 mM en el medio de cultivo celular. Dicho control de la producción de inhibidores se logra mediante una estrategia de alimentación que opera como un bucle de retroalimentación en base a la medición en línea de los propios inhibidores. Dichas mediciones en línea se realizan en forma de espectroscopia RAMAN o mediante el uso de tecnología basada en HPLC/UPLC con un muestreador automático que extrae la muestra del reactor y la transfiere al equipo de manera programada. A medida que la concentración de inhibidores aumenta por encima de un nivel especificado (por ejemplo: 0,2 mM), la cantidad de fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina que se carga a las células disminuye hasta que la concentración de inhibidores cae por debajo de un nivel predefinido (por ejemplo, 0,1 mM).

Ejemplo 9: Supresión de la formación de inhibidores a través de la medición y el control en línea o fuera de línea de aminoácidos a niveles bajos en cultivos en lote alimentado

Un procedimiento en lote alimentado está diseñado para reducir la formación de inhibidores mediante el control de los cuatro (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) a niveles bajos (0,2-1 mM). Dicho control de la formación de inhibidores se logra mediante una estrategia de alimentación que funciona como un bucle de retroalimentación en base a la medición en línea de los aminoácidos. Estas mediciones en línea se realizan en forma de espectroscopia RAMAN o a través del uso de tecnología basada en HPLC/UPLC con un muestreador automático que extrae la muestra del reactor y la transfiere al equipo de manera programada. A medida que la concentración de aminoácidos disminuye por debajo de un nivel especificado (ejemplo, 0,5 mM), se agregan cantidades estimadas de medio de alimentación (similar al Medio B) para mantener las concentraciones de los cuatro u ocho aminoácidos.

Alternativamente, las muestras se toman una vez al día y las concentraciones de aminoácidos se miden fuera de línea utilizando un procedimiento UPLC/HPLC. Las concentraciones de aminoácidos obtenidas se utilizan para calcular las tasas de absorción celular específicas de los cuatro (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) entre los dos puntos de tiempo de muestreo anteriores. Suponiendo que las células mantienen la misma tasa específica de consumo de aminoácidos hasta el siguiente punto de tiempo de muestreo, se determina la cantidad de medio de alimentación (ejemplo: Medio B) que se debe agregar hasta el siguiente punto de muestreo y se proporciona a las células, de tal manera que las concentraciones de los aminoácidos estén siempre dentro del rango deseado (0,2 mM-1 mM).

Ejemplo 10: Supresión de la formación de inhibidores a través de alimentación programada para mantener los aminoácidos en niveles bajos en cultivos en lote alimentado

La formación de los inhibidores recientemente identificados en el cultivo se mantiene baja al mantener la concentración de los cuatro (fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina) u ocho aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, leucina, serina, glicina y treonina) en niveles bajos en el cultivo (0,2-1 mM). Esto se logra al diseñar una

estrategia de alimentación programada (utilizando el Medio B modificado) de tal manera que las concentraciones de aminoácidos, en cualquier punto de tiempo dado en el cultivo, estén siempre dentro del rango deseado (0,2 mM-1 mM). Dicha estrategia de alimentación se idea al evaluar las tasas de consumo específicas de aminoácidos en diferentes puntos de tiempo a lo largo del cultivo y modificar la concentración en el medio de alimentación (Medio B) de tal manera que con la estrategia/programa de alimentación definidos anteriormente, se proporcionen cantidades suficientes de aminoácidos al cultivo para mantener las concentraciones de aminoácidos dentro del rango deseado (0,2-1 mM).

Referencias

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

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

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

Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BO (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* **39**: 171-183

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

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

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

Lee HLT, Boccazzi P, Gorret N, Ram RJ, Sinskey AJ (2004) In situ bioprocess monitoring of Escherichia coli bioreactions using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **35**: 131- 137

Lee JS, Lee GM (2012) Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction. *Biotechnology and bioengineering* **109**: 3093- 3102

Li B, Ryan PW, Ray BH, Leister KJ, Sirimuthu NM, Ryder AG (2010) Rapid characterization and quality control of complex cell culture media solutions using raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnology and bioengineering* **107**: 290-301

Morgan HP, O'Reilly FJ, Wear MA, O'Neill JR, Fothergill-Gilmore LA, Hupp T, Walkinshaw MD (2013) M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 5881-5886

Mulukutla BC, Gramer M, Hu WS (2012) On metabolic shift to lactate consumption in fed- batch culture of mammalian cells. *Metabolic engineering* **14**: 138-149

Whelan J, Craven S, Glennon B (2012) In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors.

Biotechnology progress **28**: 1355-1362

Whitehouse S, Cooper RH, Randle PJ (1974) Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *The Biochemical journal* **141**: 761-774

Wlaschin KF, Hu WS (2007) Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *Journal of biotechnology* **131**: 168-176

Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, 3rd, Peters EC, Driggers EM, Hsieh-Wilson LC (2012) Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science* **337**: 975-980

Zhou M, Crawford Y, Ng D, Tung J, Pynn AF, Meier A, Yuk IH, Vijayasankaran N, Leach K, Joly J, Snedecor B, Shen A (2011) Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of biotechnology* **153**: 27-34

Zhu G, Zhu X, Fan Q, Wan X (2011) Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy***78**: 1187- 1195

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cultivo celular que comprende

(i) proporcionar células de mamífero en un medio de cultivo celular para iniciar un procedimiento de cultivo celular, en el que las células de mamífero expresan una proteína recombinante, y,

5 (ii) mantener al menos un metabolito seleccionado de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato por debajo de una concentración C1 en el medio de cultivo celular, en el que C1 es 3 mM, en el que mantener al menos un metabolito por debajo de una concentración C1 en el medio de cultivo celular comprende la etapa de medir la concentración de dicho al menos un metabolito, y, cuando la concentración medida está por encima de un valor predefinido, en el que
10 el valor predefinido es igual a C1 o es 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de C1, la concentración de precursor de dicho al menos un metabolito en el medio de cultivo celular disminuye al reducir la cantidad de precursor proporcionado a las células de mamífero, en el que el cultivo celular es un cultivo en lote alimentado.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que C1 es 1 mM.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 en el que dicha concentración de dicho al menos un metabolito se mide
15 en línea utilizando RMN, HPLC o UPLC.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que,

cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato y/o fenillactato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de fenilalanina disminuye en el medio de cultivo celular y/o,

20 cuando la concentración medida de 3-(4-hidroxifenil)lactato y/o 4-hidroxifenilpiruvato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de tirosina disminuye en el medio de cultivo celular, y/o,

cuando la concentración medida de indollactato y/o ácido indolcarboxílico está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de triptófano disminuye en el medio de cultivo celular y/o,

cuando la concentración medida de homocisteína y/o ácido 2-hidroxibutírico está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de metionina disminuye en el medio de cultivo celular, y/o,

25 cuando la concentración medida de isovalerato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de leucina disminuye en el medio de cultivo celular y/o,

cuando la concentración medida de formato está por encima de dicho valor predefinido, la concentración de serina, treonina y/o glicina disminuye en el medio de cultivo celular.

30 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa (ii) comprende mantener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de 3-(4-hidroxifenil)lactato, 4-hidroxifenilpiruvato, fenillactato, indollactato, ácido indolcarboxílico, homocisteína, ácido 2-hidroxibutírico, isovalerato y formato por debajo de C1 en el medio de cultivo celular.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de cultivo celular comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de valina, isoleucina, prolina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato y asparagina en una concentración por encima de 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM o 5 mM.

35 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se utiliza un sensor de pH para monitorizar el pH del cultivo celular y, en respuesta a un aumento por encima de un valor de pH predeterminado, se carga glucosa al cultivo celular.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células de mamífero son células CHO.

40 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la obtención y purificación de la proteína recombinante producida por las células.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el crecimiento celular y/o la productividad aumentan en comparación con un cultivo de control, dicho cultivo de control es idéntico excepto que no comprende la etapa (ii).

45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el crecimiento celular se determina por la densidad máxima de células viables y aumenta en al menos un 5 % en comparación con el cultivo de control.

12. El procedimiento de la reivindicación 10 u 11, en el que la productividad se determina por el título y aumenta en al menos un 5 % en comparación con el cultivo de control.

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la densidad máxima de células viables del cultivo celular es mayor que 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.

5 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el procedimiento de cultivo celular comprende una fase de crecimiento y una fase de producción y la etapa (ii) se aplica durante la fase de crecimiento.

Figura 1A y 1B

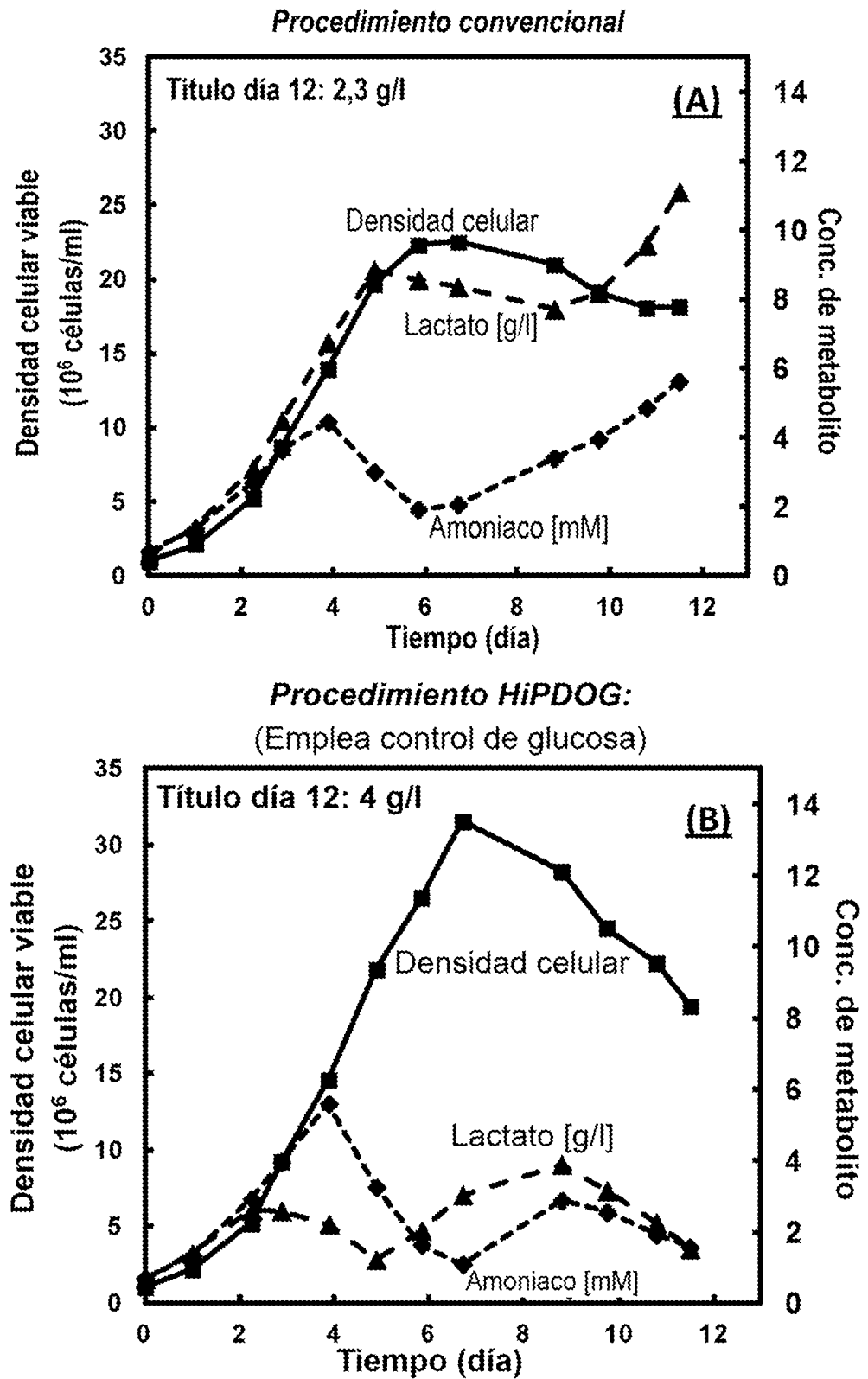


Figura 2

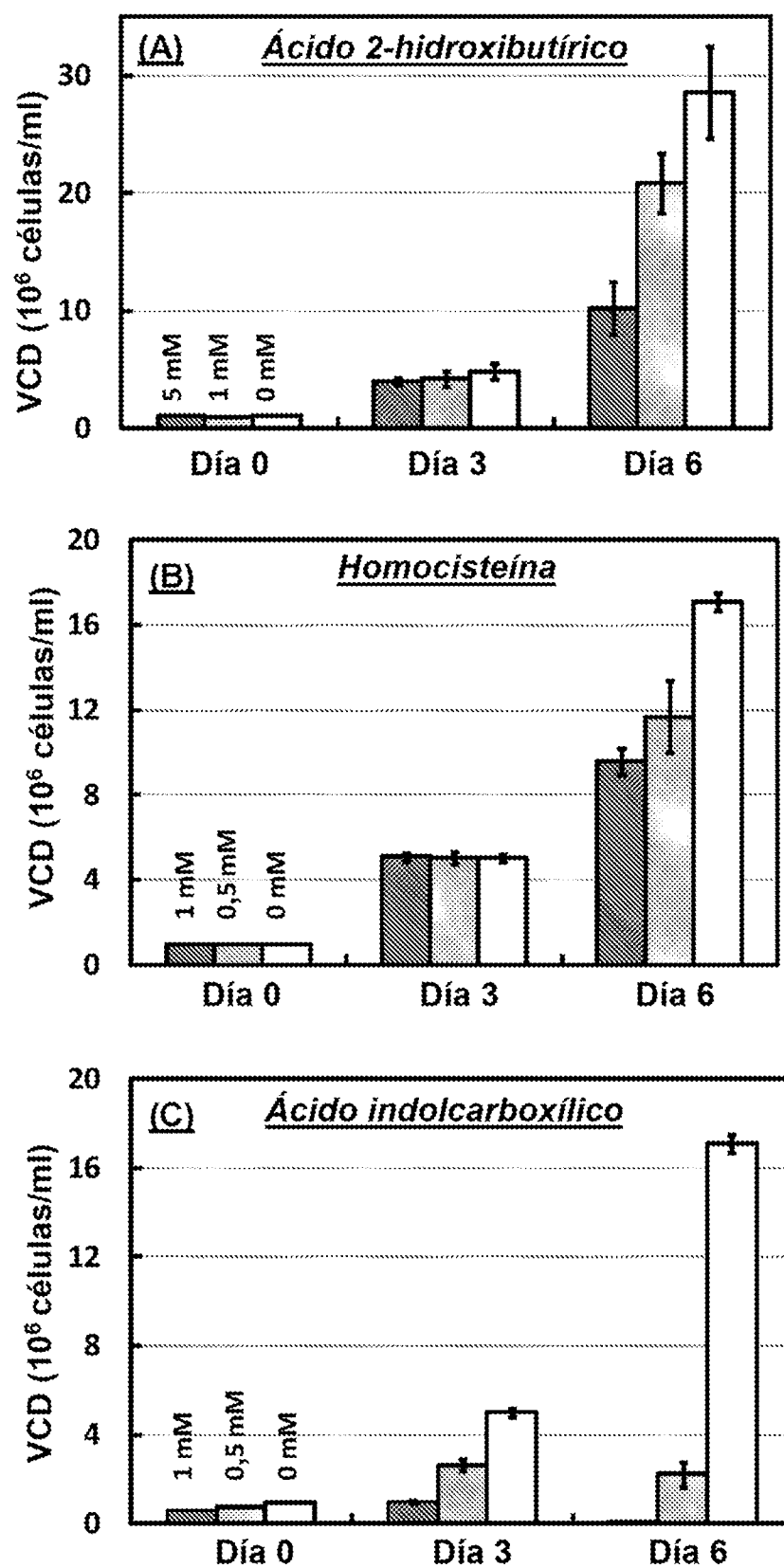


Figura 3

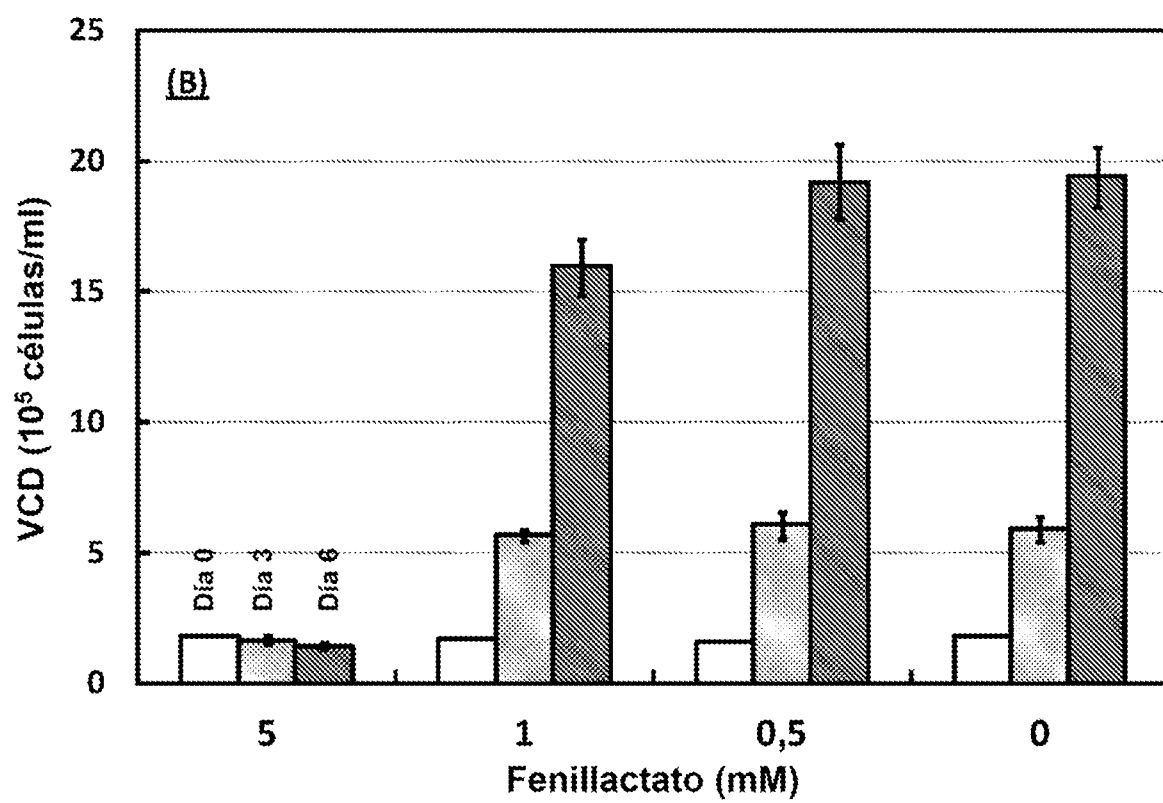
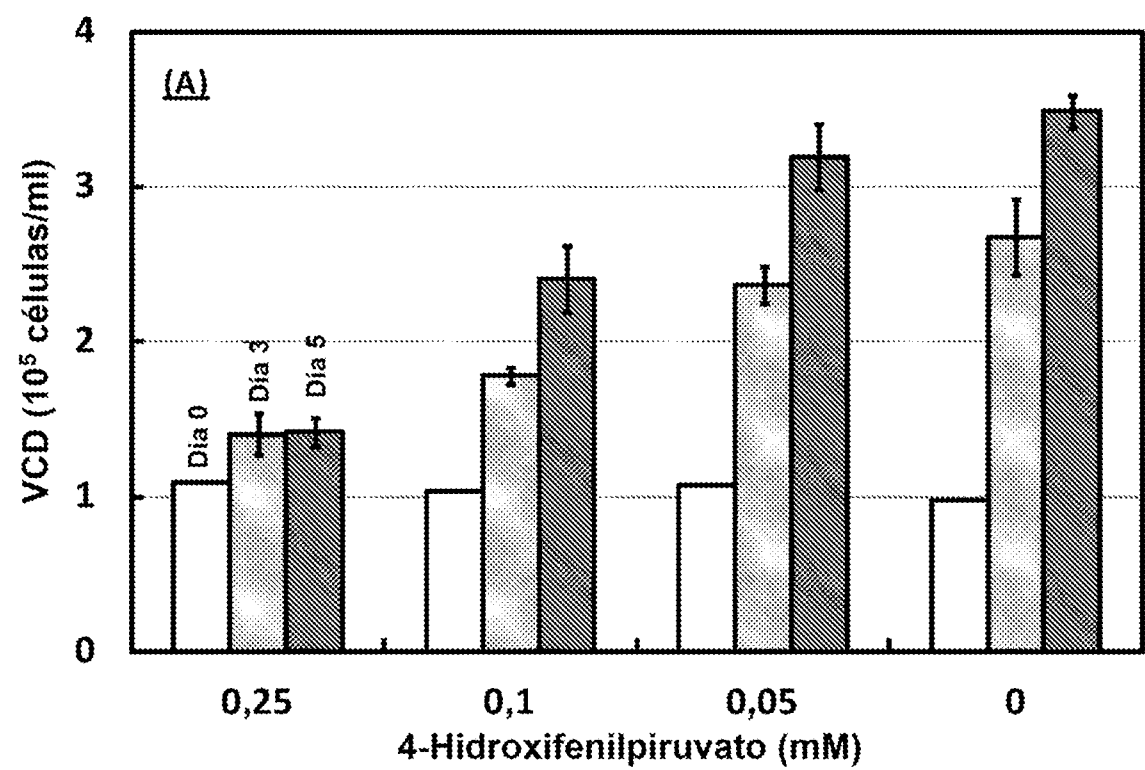


Figura 4

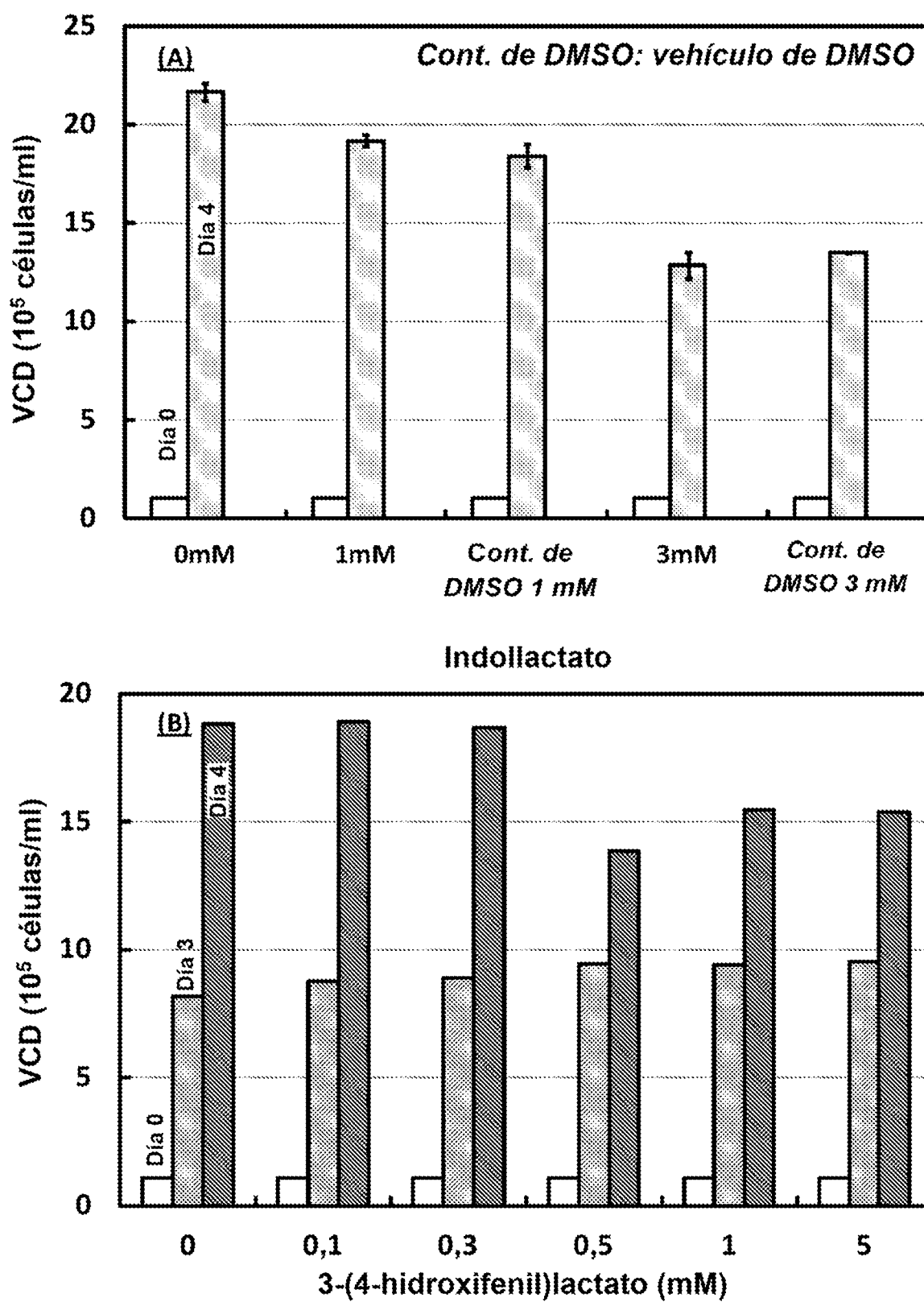


Figura 5

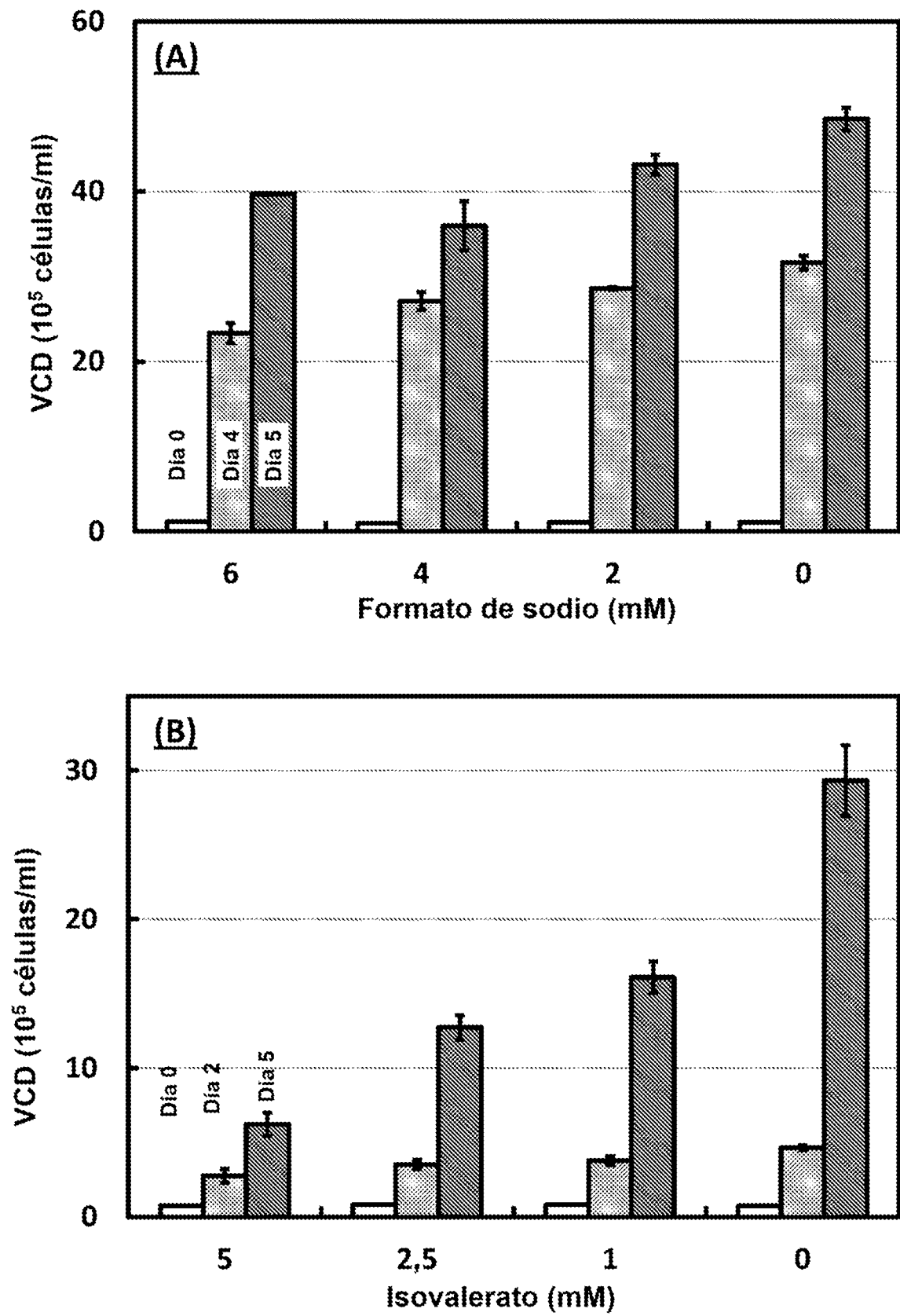


Figura 6

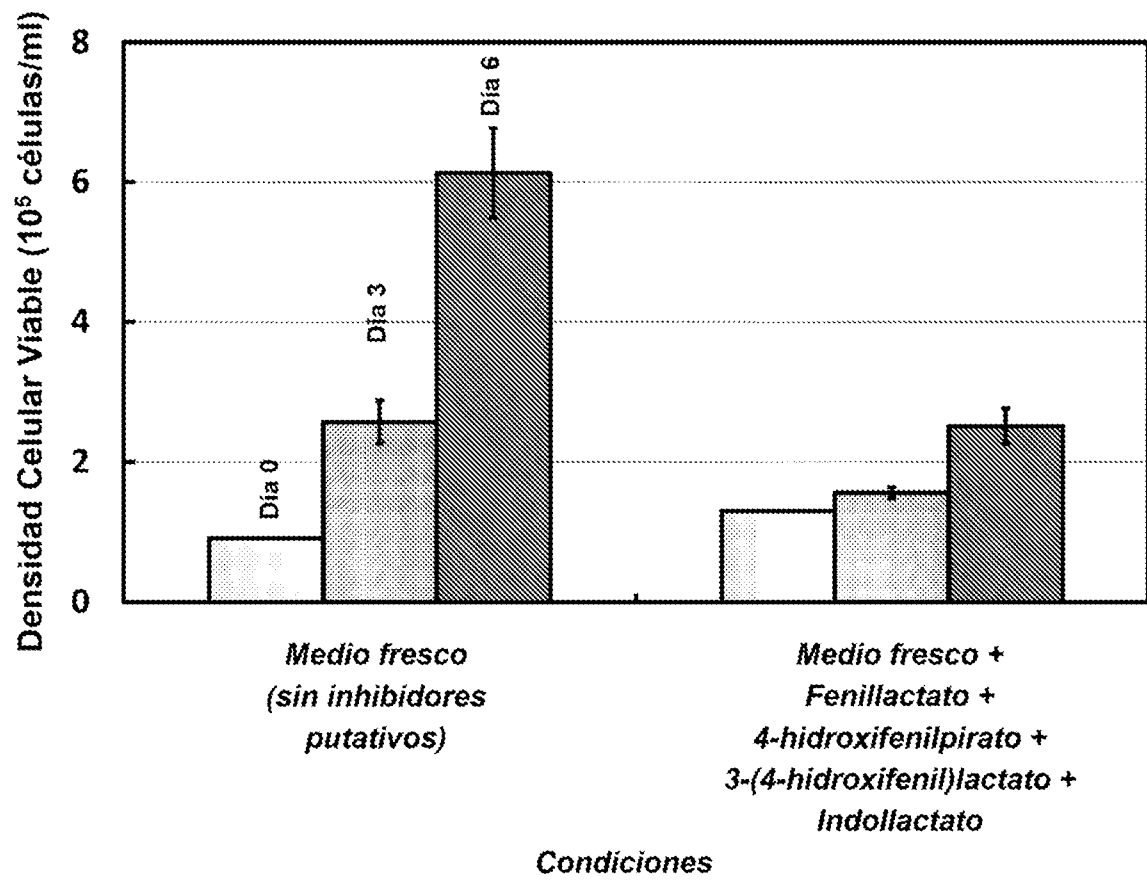


Figura 7

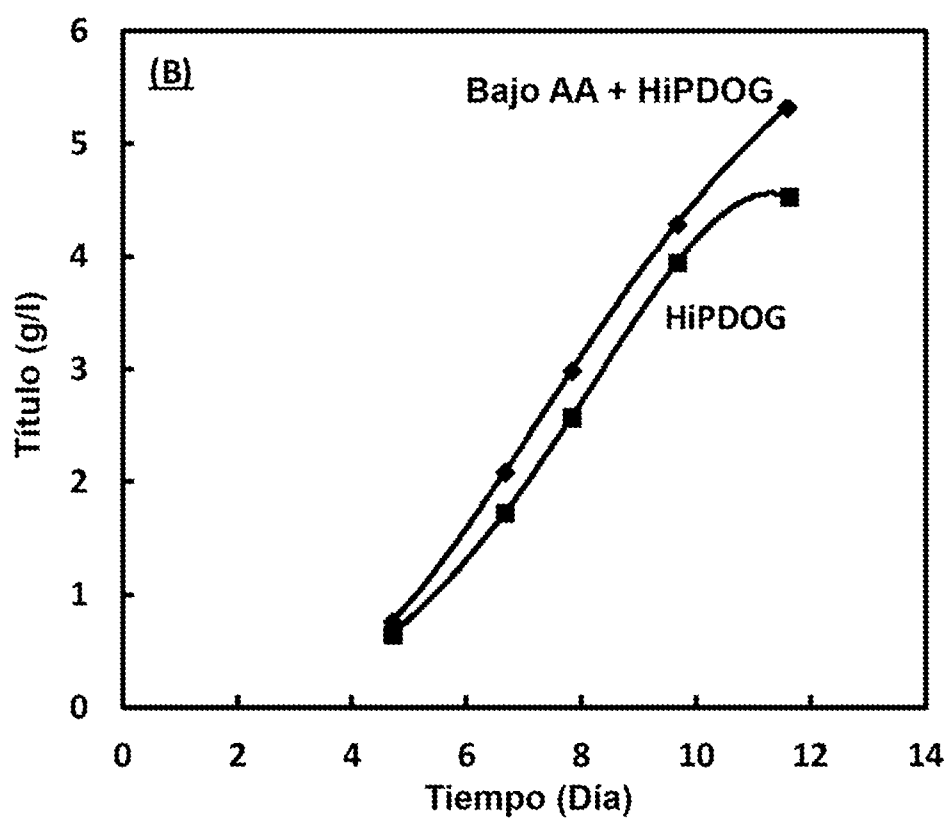
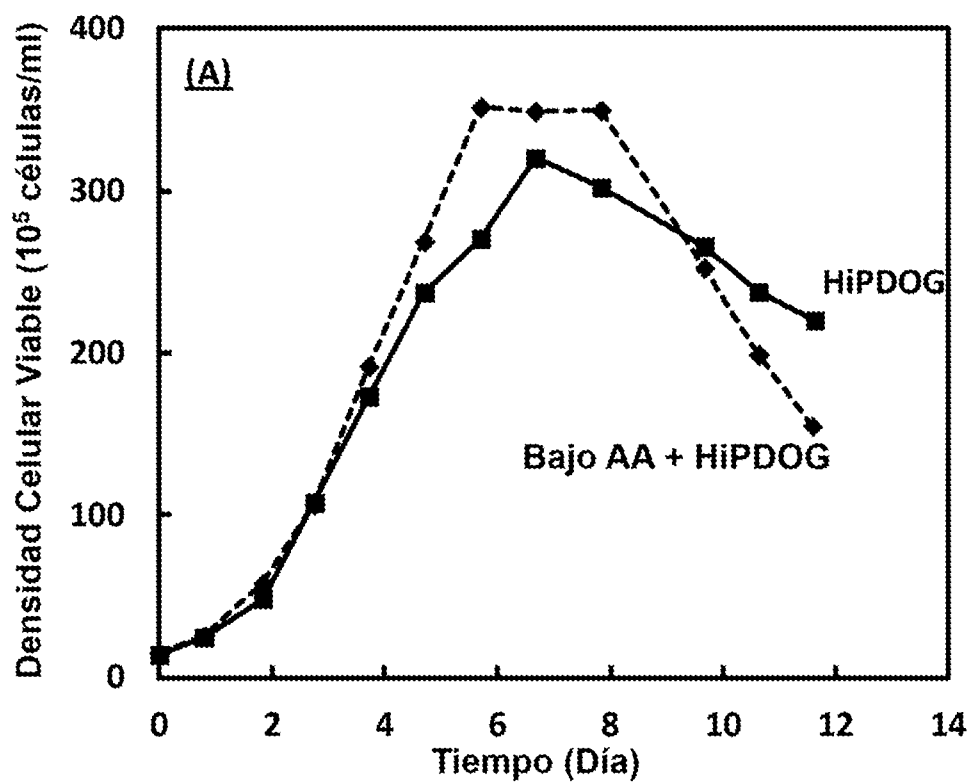


Figura 8

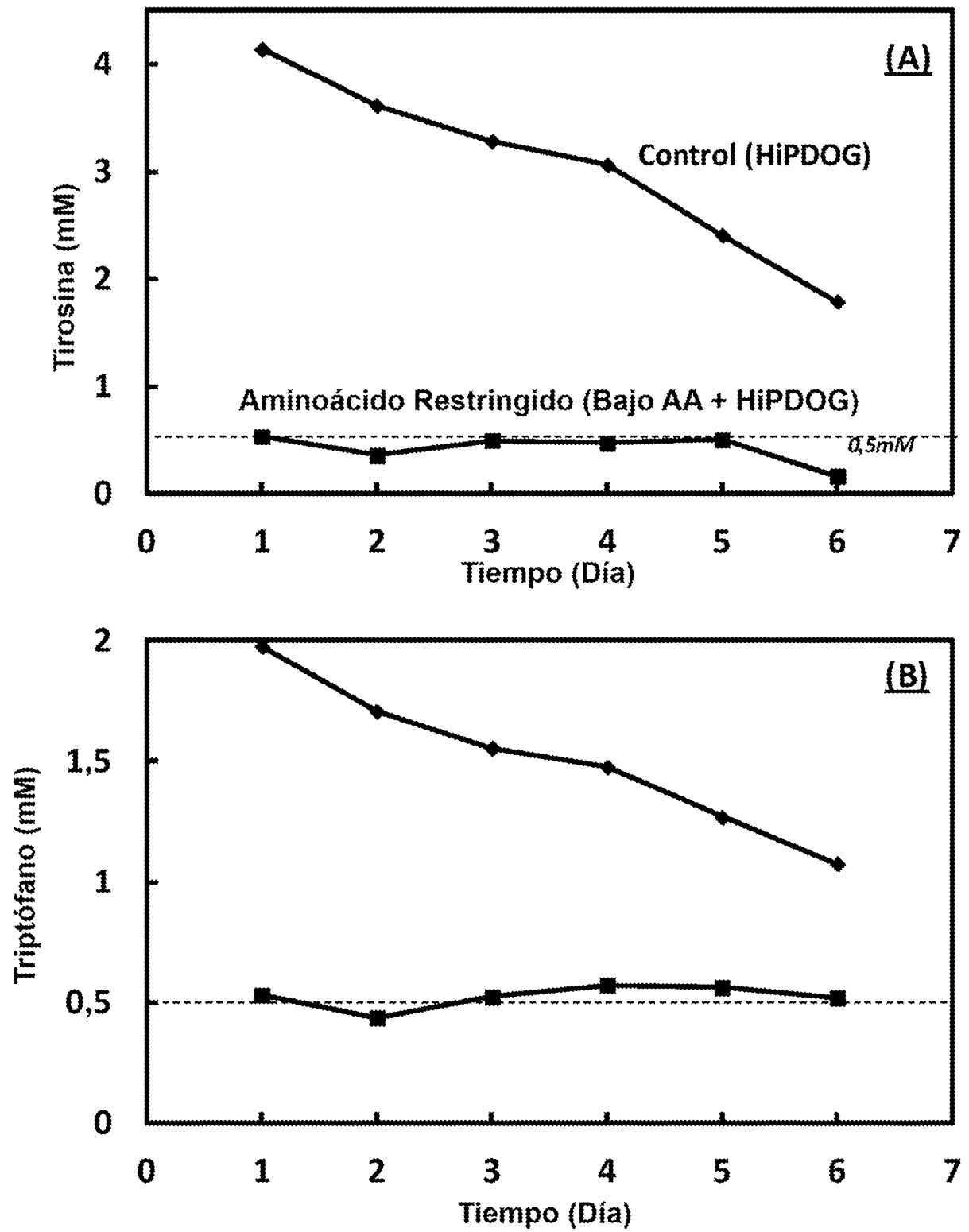


Figura 9

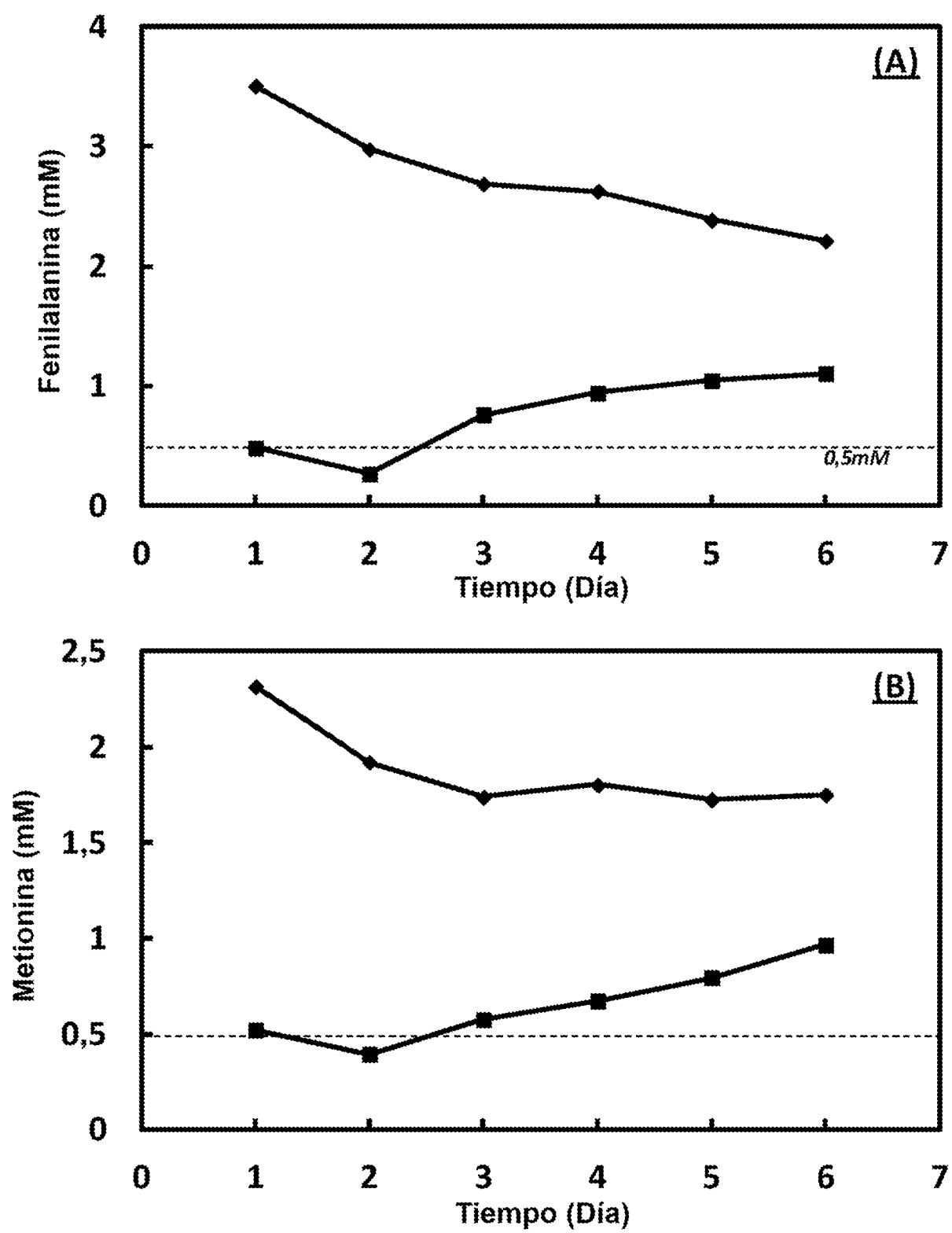


Figura 10

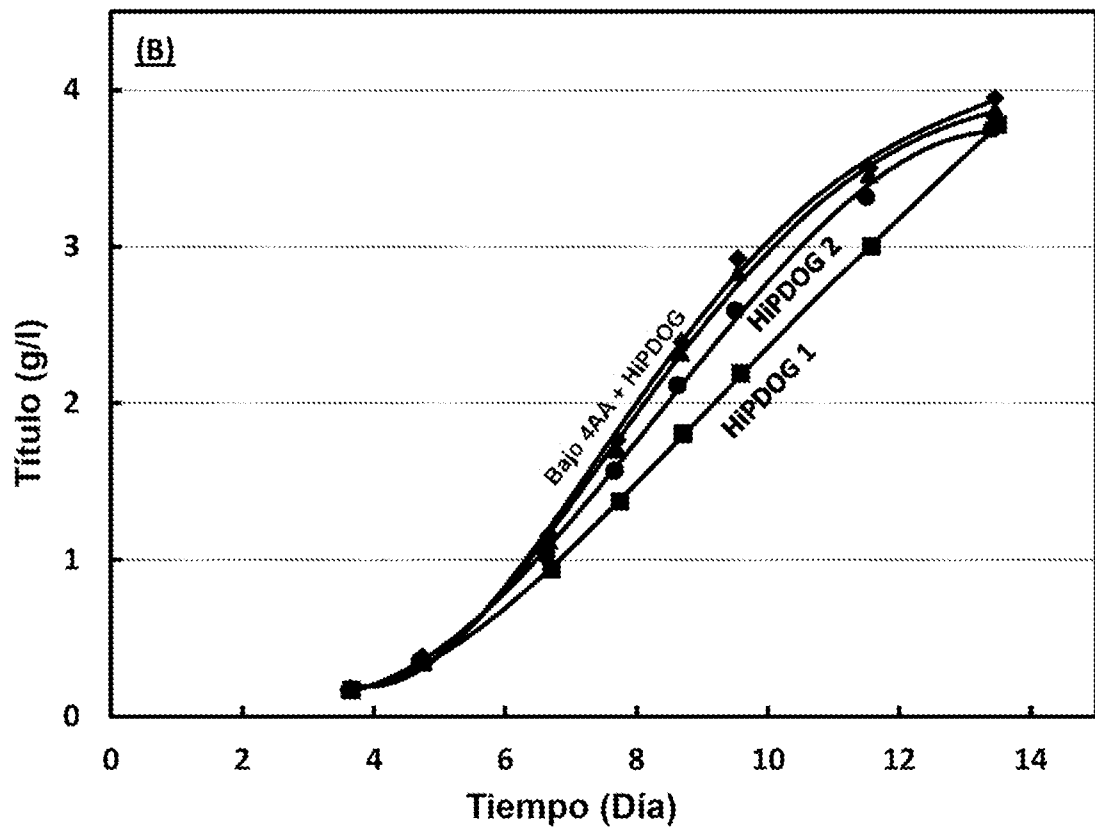
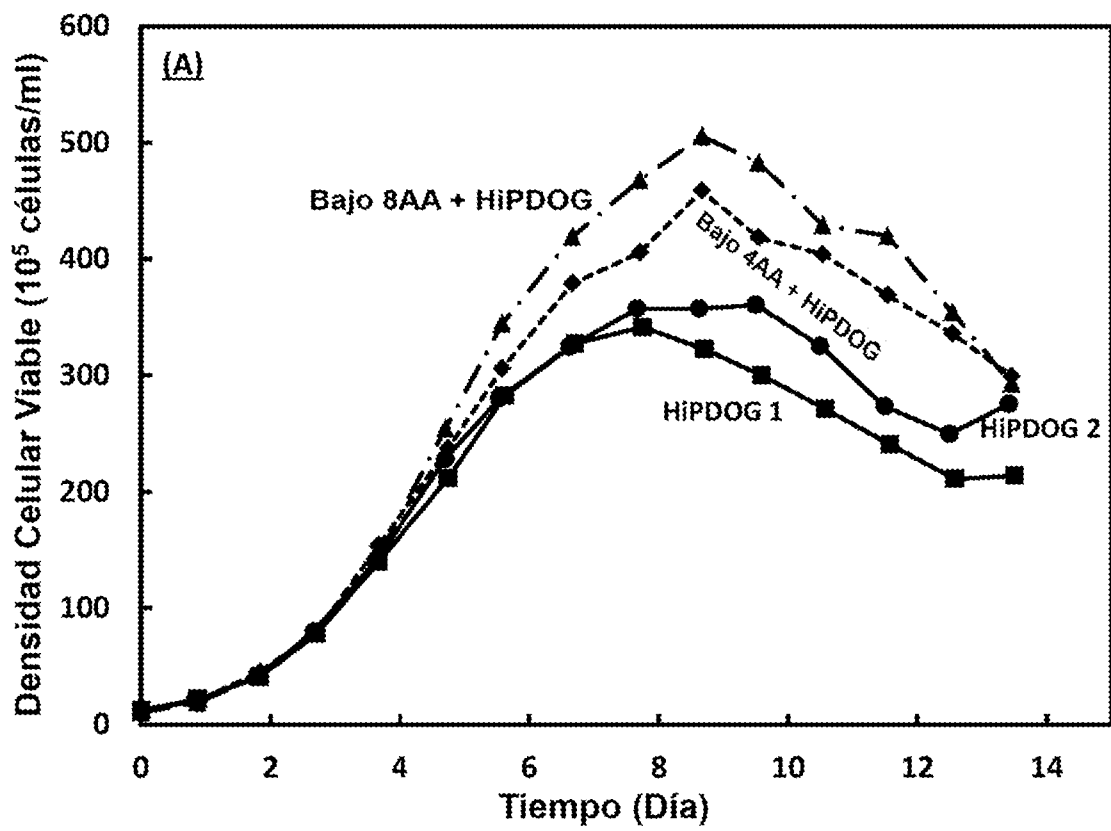


Figura 11

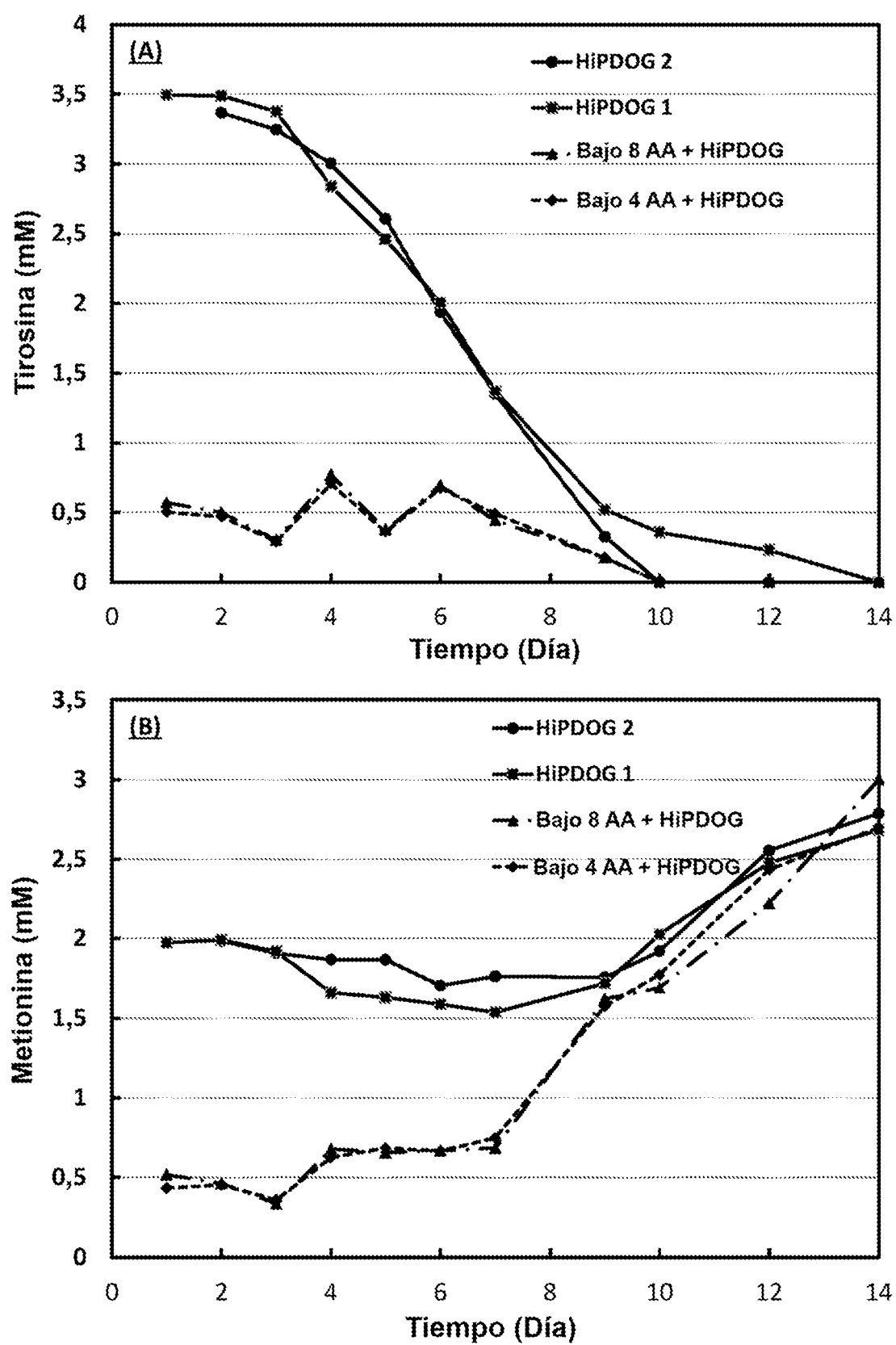


Figura 12

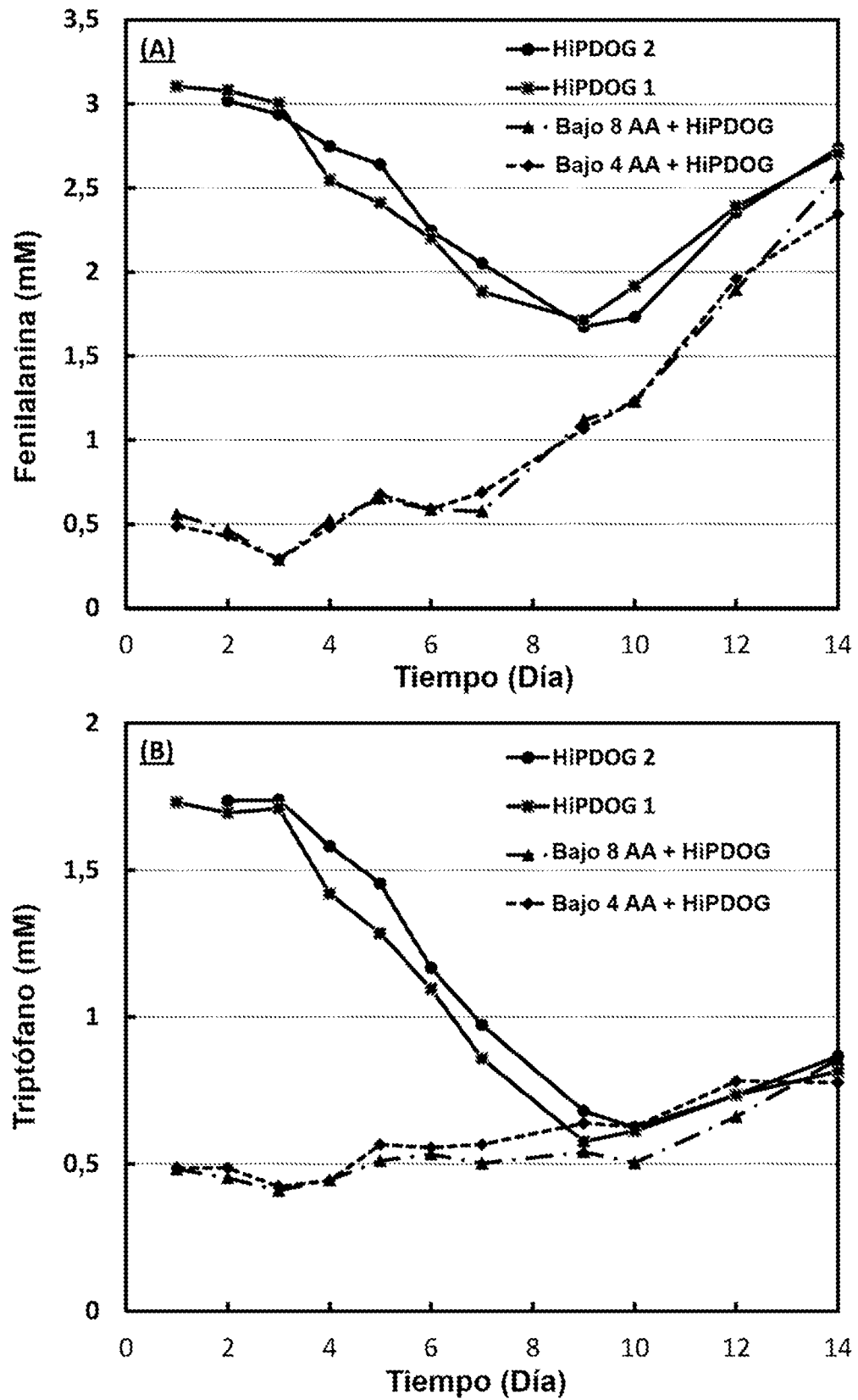


Figura 13

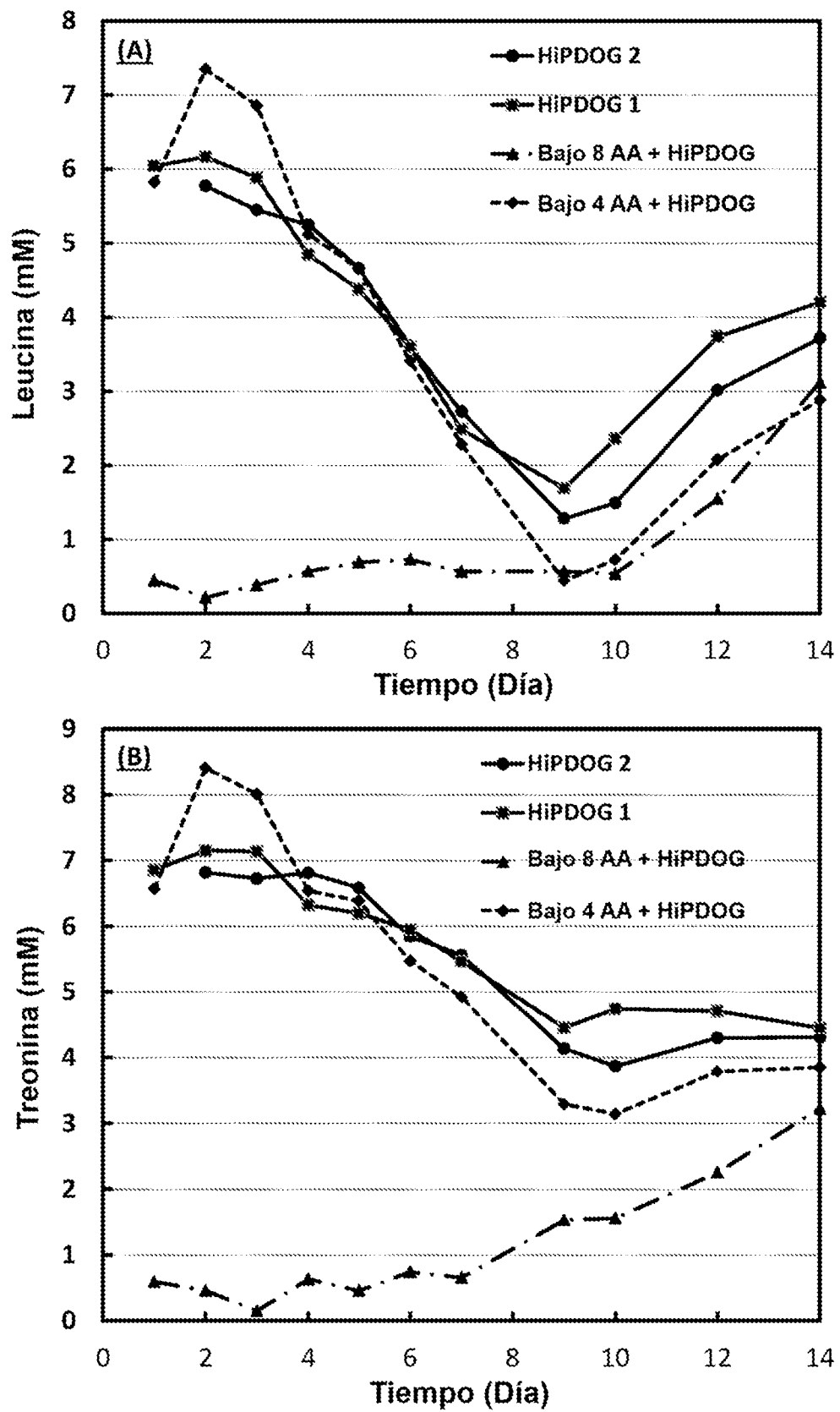


Figura 14

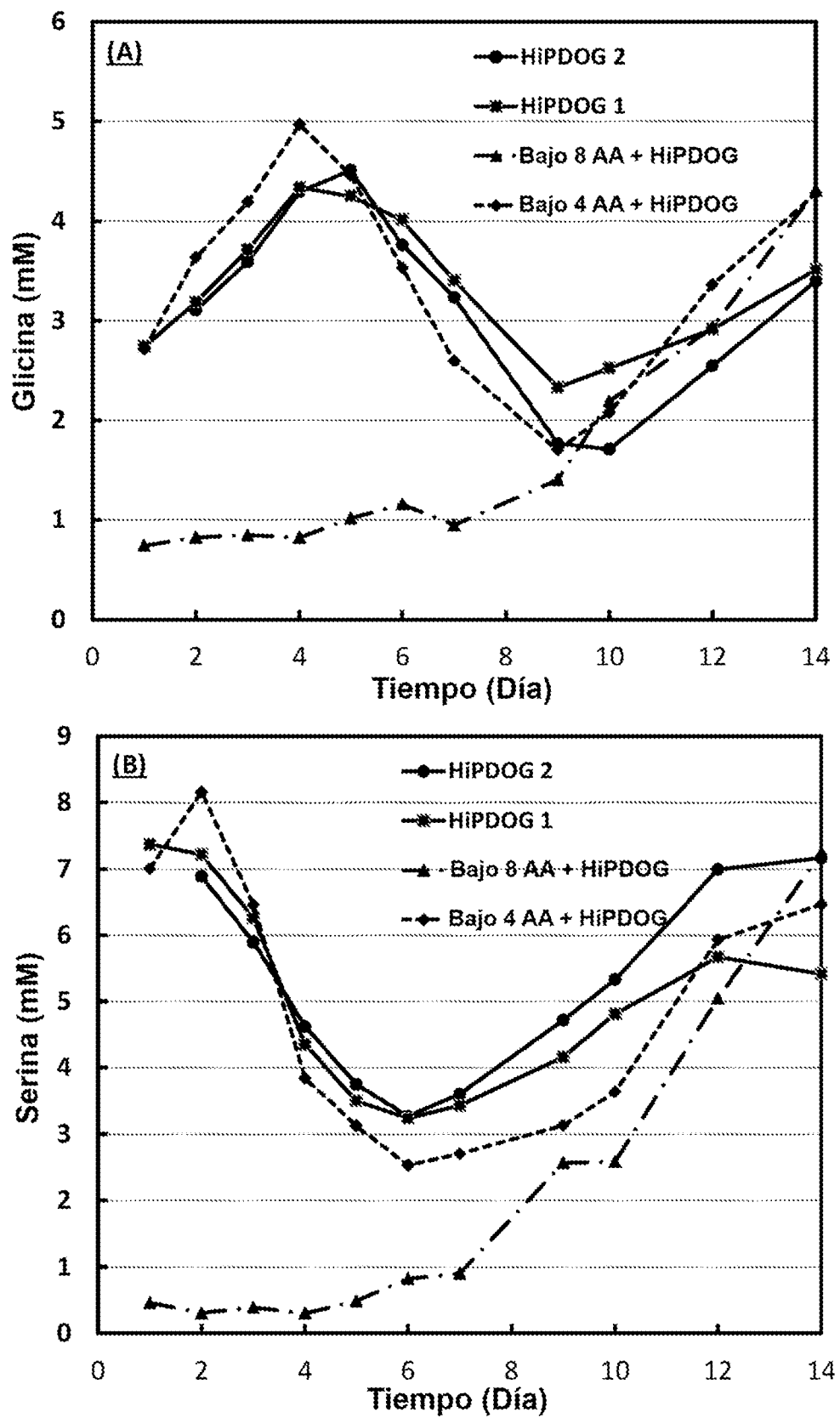


Figura 15

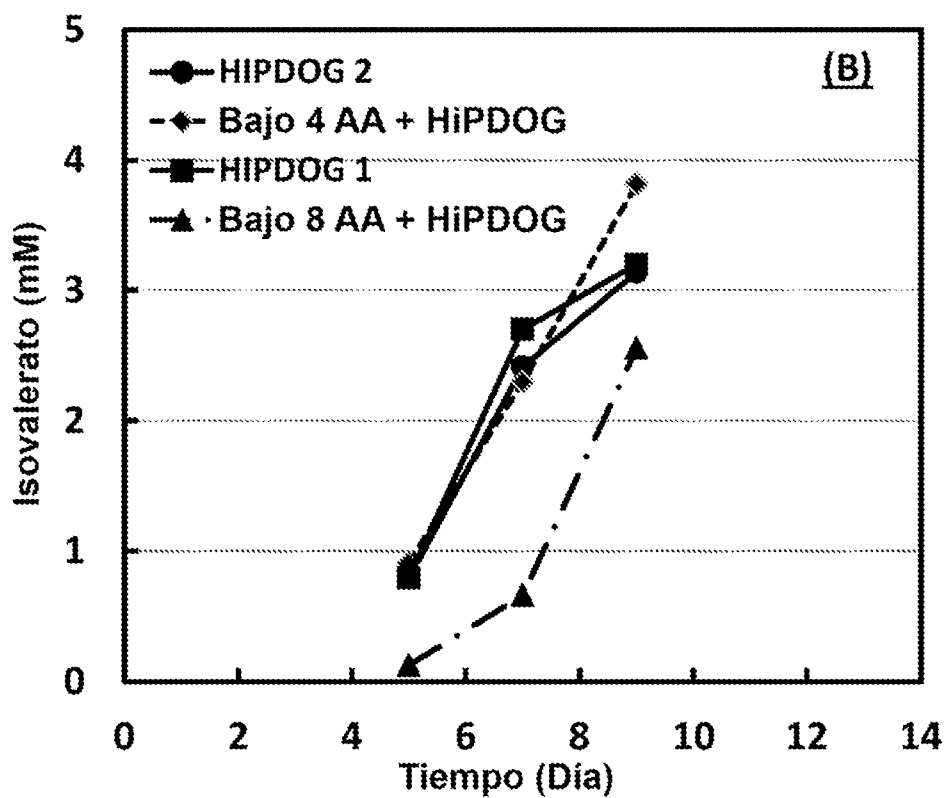
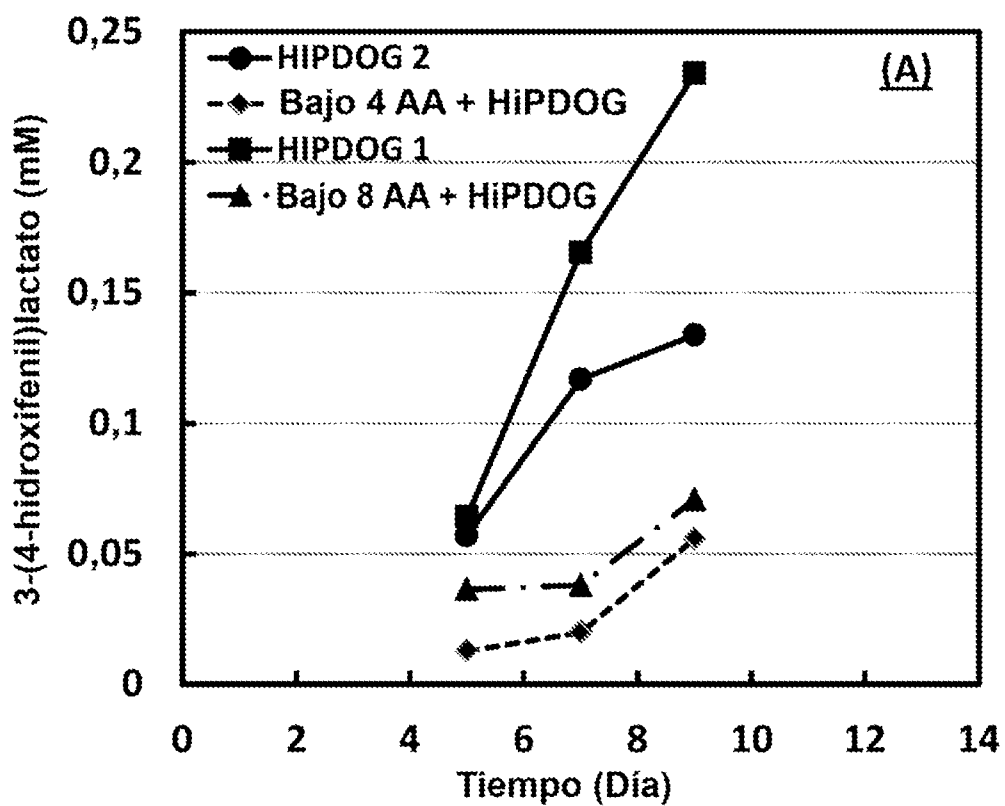


Figura 16

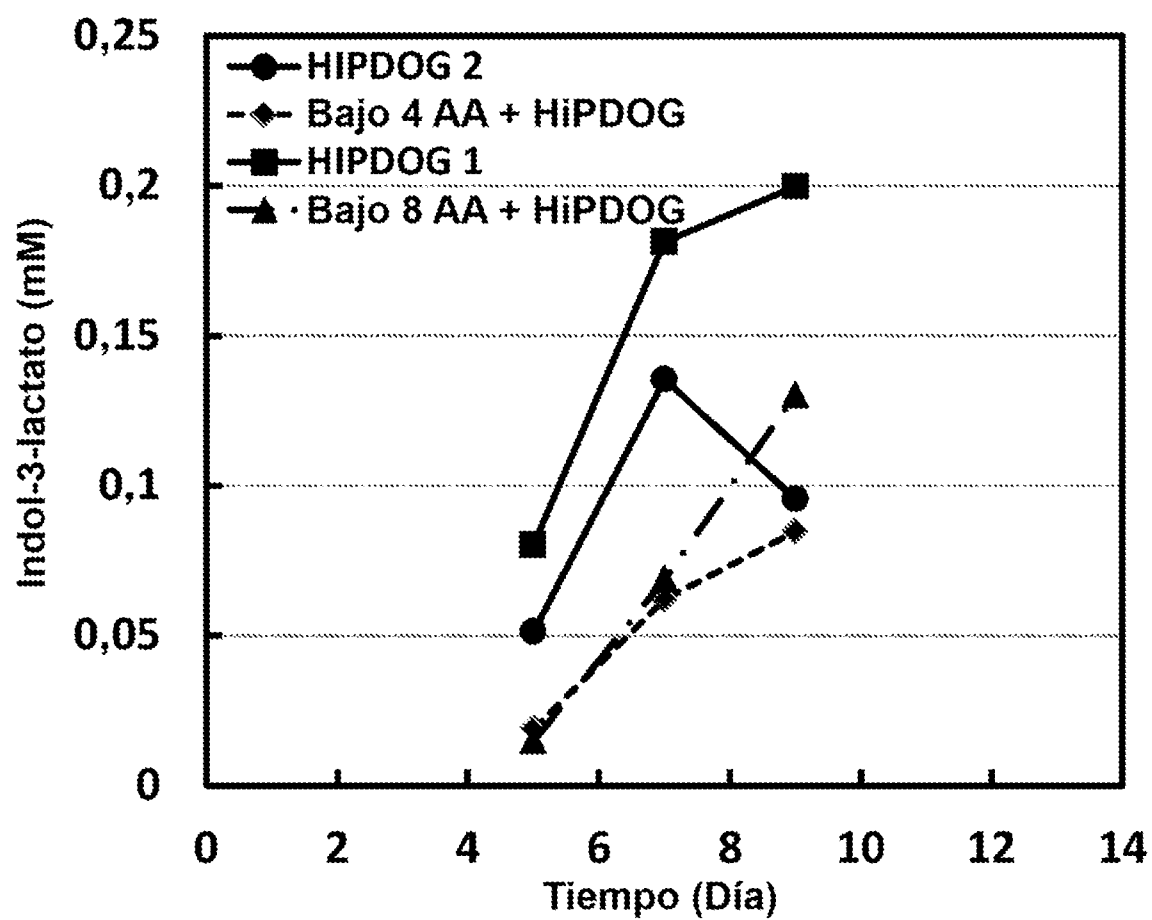


Figura 17

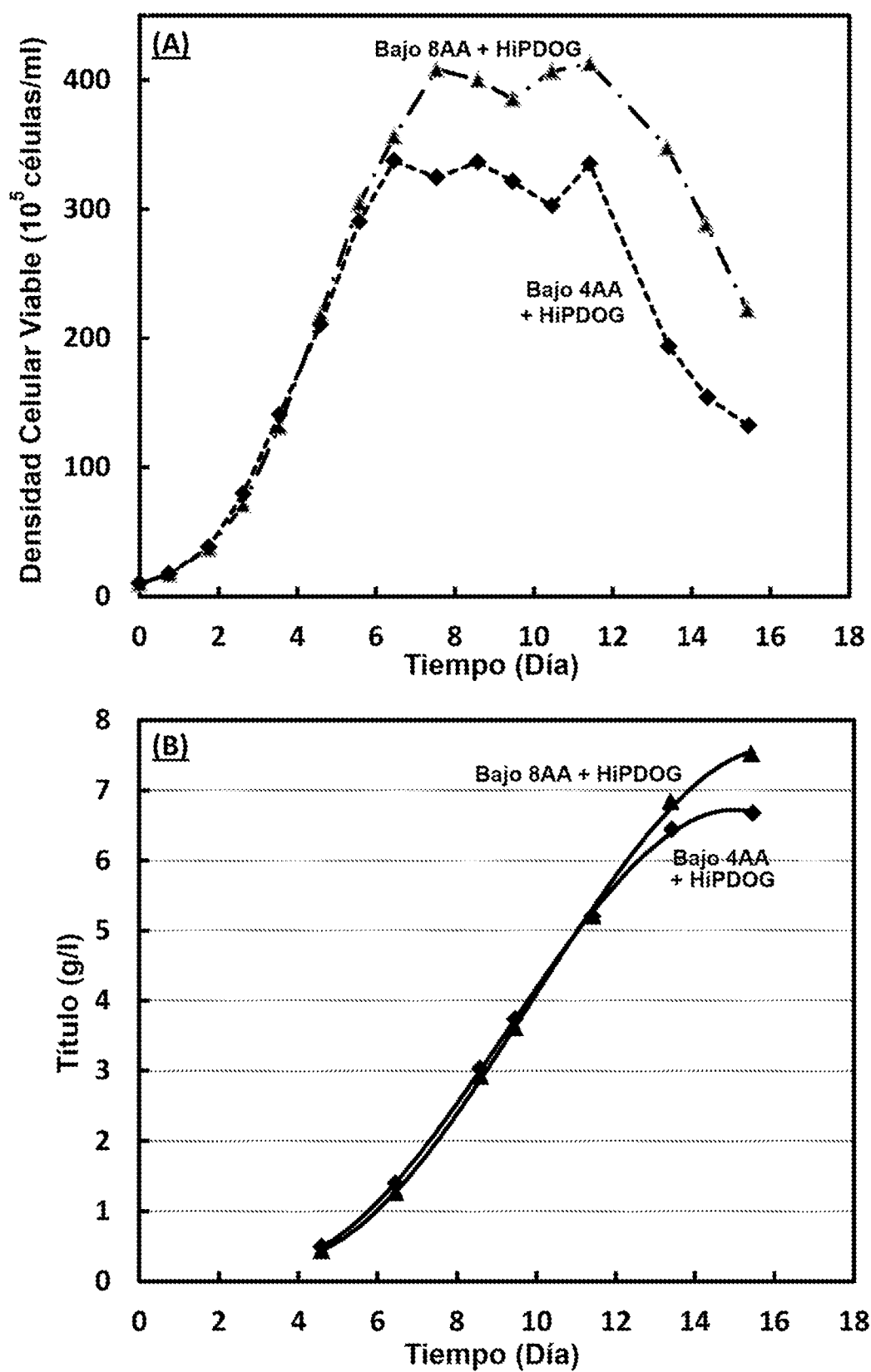


Figura 18

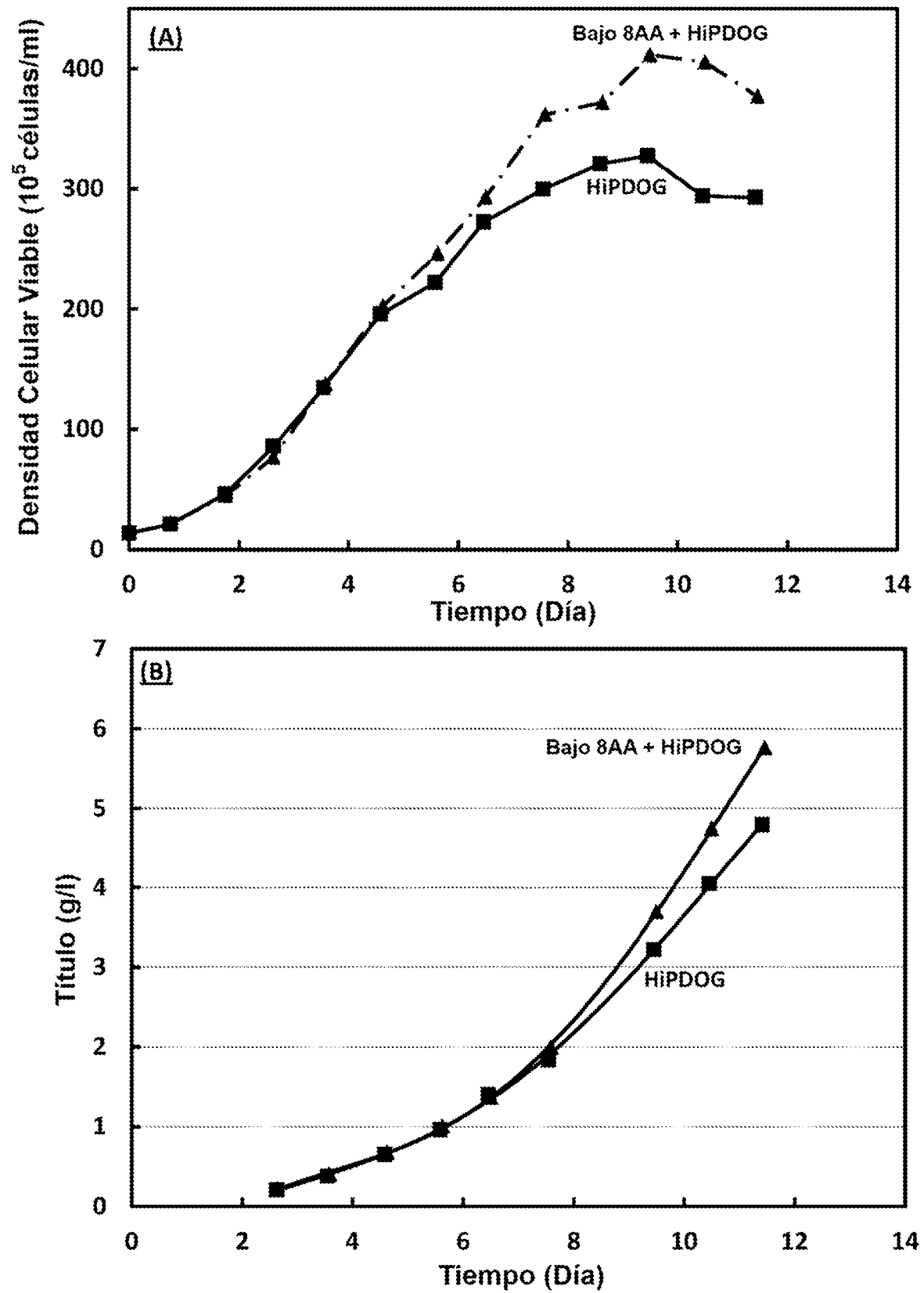


Figura 19

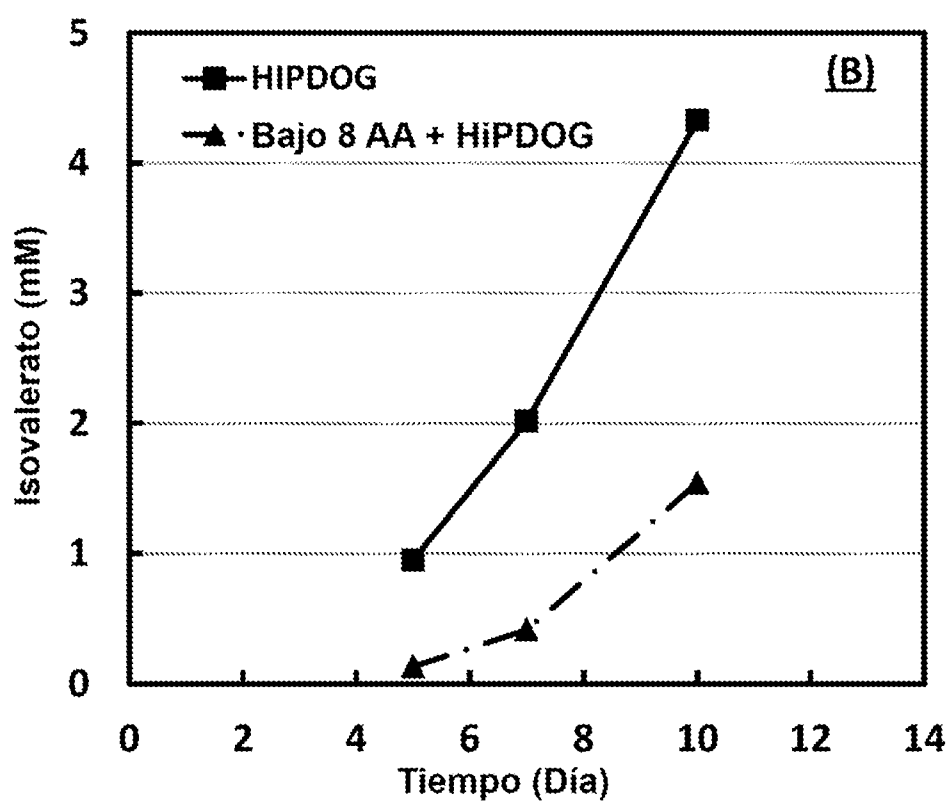
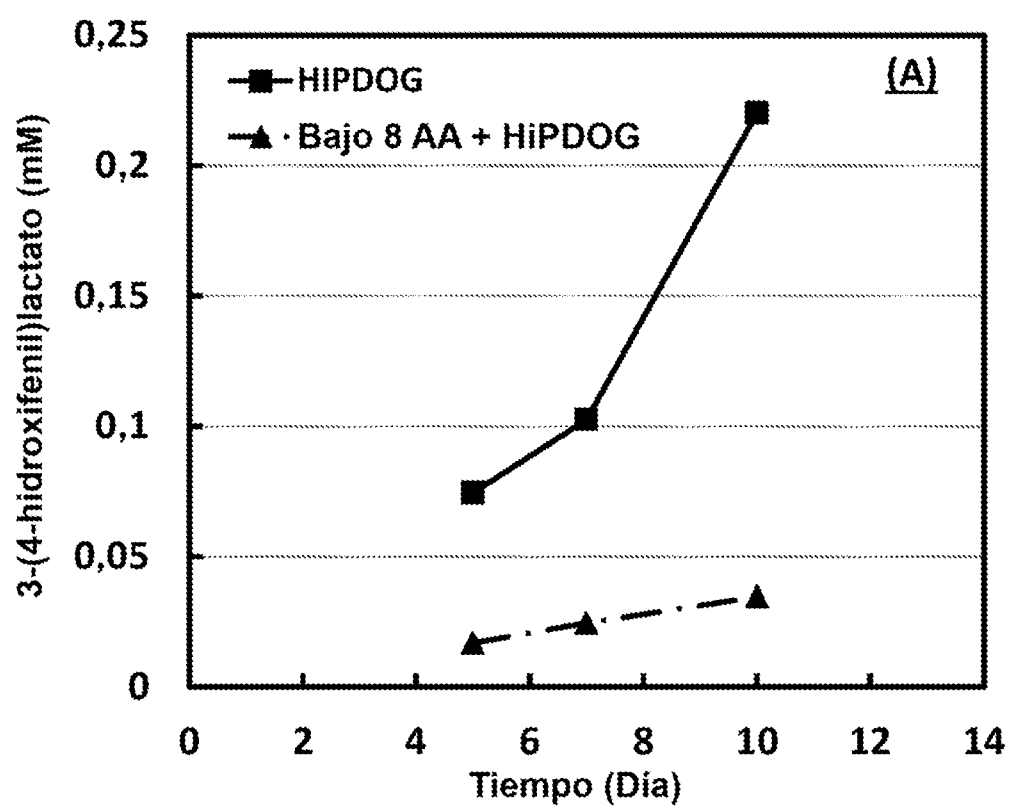


Figura 20

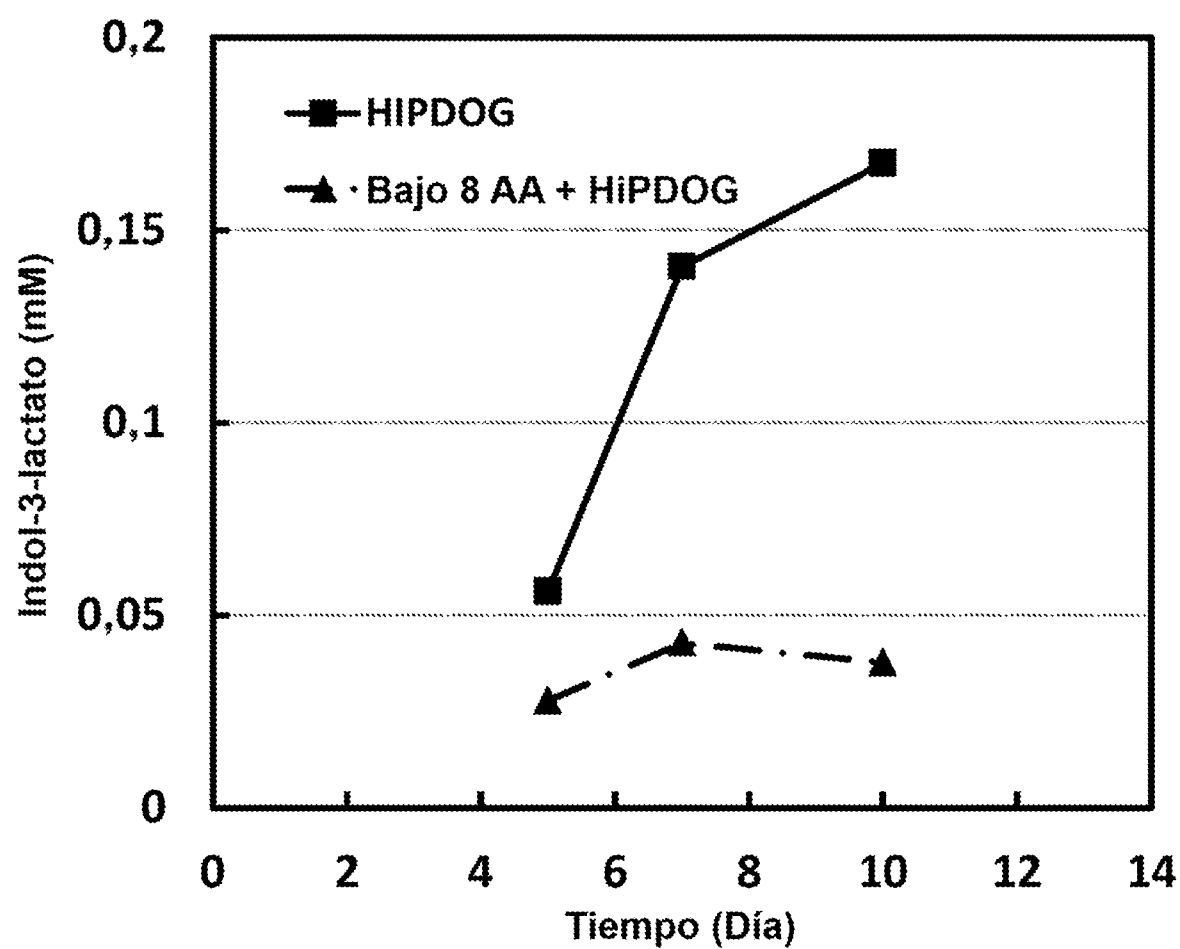


Figura 21

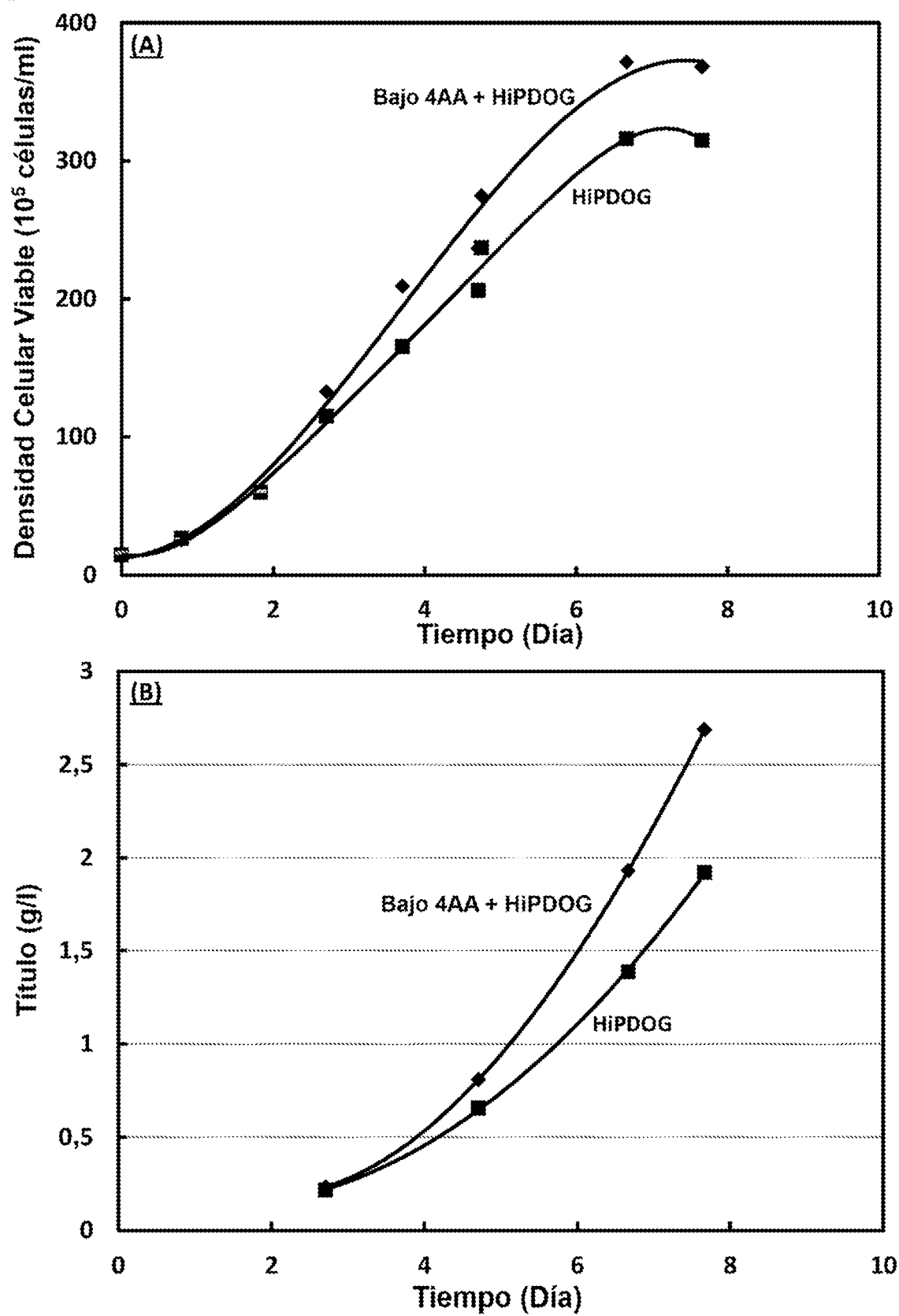


Figura 22

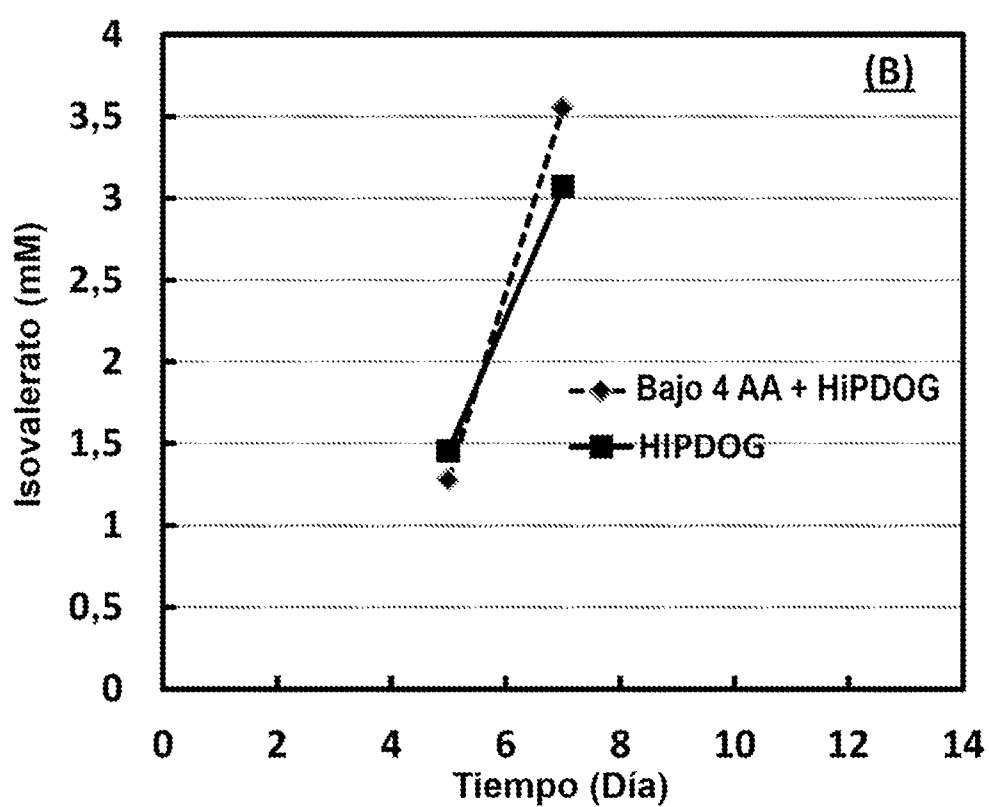
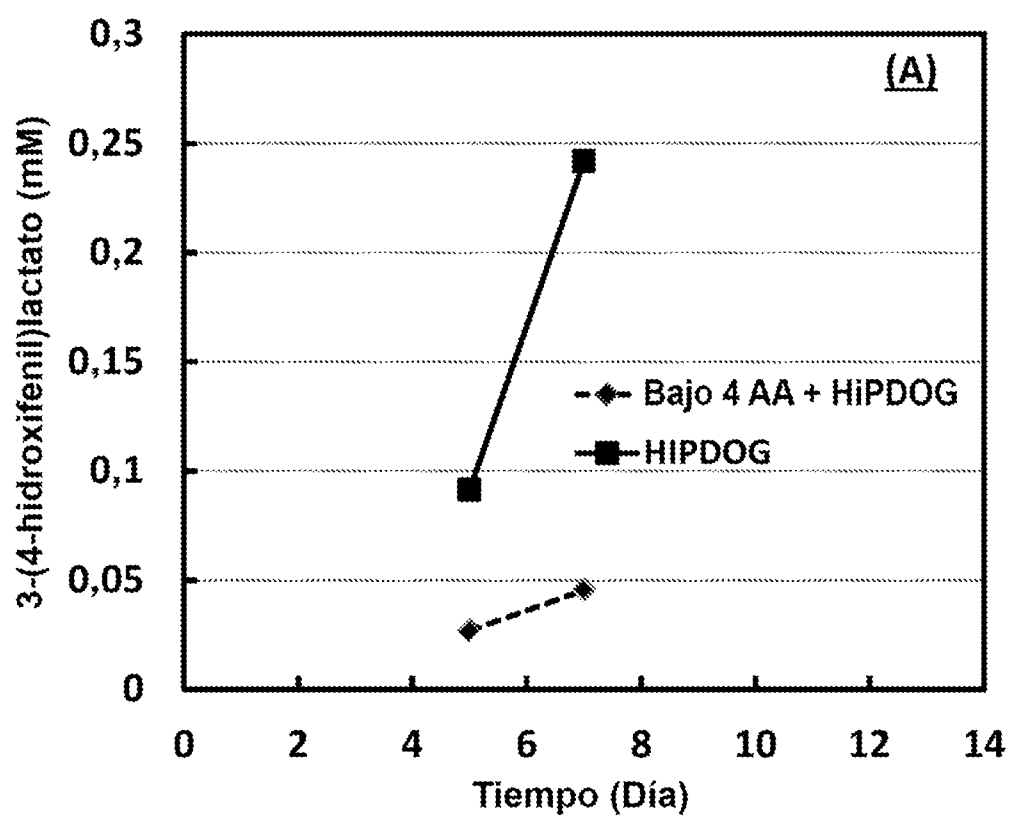


Figura 23

