

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 469**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2011 E 17199357 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3330370**

54 Título: **Procedimiento para el cultivo de células CHO**

30 Prioridad:

26.04.2010 US 327846 P

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

27.10.2021

73 Titular/es:

**NOVARTIS (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel - Suiza , CH**

72 Inventor/es:

**JOOSTEN, CHRISTOPH E.;
LEIST, CHRISTIAN y
SCHMIDT, JÖRG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 870 469 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 para el cultivo de células CHO

5 Campo Técnico de la Invención

Esta invención se refiere al campo general de la biotecnología, en particular al cultivo de células y a su uso para la producción de polipéptidos a escala industrial.

10 La presente invención proporciona procedimientos de cultivo celular tal como se define en la reivindicación 1. Estos procedimientos son adecuados para el cultivo de células con alta viabilidad celular, preferiblemente células de mamífero tales como las células CHO. Los procedimientos de cultivo celular de acuerdo con la presente invención permiten, además, obtener altas productividades de polipéptidos cuando se utilizan para la producción de un polipéptido, en particular mediante expresión recombinante de polipéptidos en sistemas de cultivo de células de mamíferos, en particular a escala industrial.

Antecedentes Técnicos de la Invención

20 La preparación de polipéptidos utilizando tecnología recombinante se ha convertido en un proceso estándar durante las últimas dos décadas. El acceso a polipéptidos recombinantes mediante la clonación de los genes que codifican el polipéptido respectivo, seguido de la transformación posterior de huéspedes de expresión adecuados con el gen a expresar y la producción y purificación finales del producto polipeptídico recombinante obtenido ha proporcionado acceso a una clase completamente nueva de productos biológicamente diseñados y agentes terapéuticos producidos.

25 Los compuestos farmacéuticamente activos se han preparado en cantidades cada vez mayores en la industria farmacéutica utilizando tecnología de ADN recombinante seguida de procedimientos de producción desarrollados en el campo de la bioingeniería.

30 Productos biológicos de este tipo incluyen anticuerpos monoclonales, que se han desarrollado en importantes opciones de tratamiento en diversos campos médicos, incluyendo enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios, inmunosupresión, oncología o similares.

35 El desarrollo de agentes terapéuticos de este tipo de origen biológico requiere la producción a escala industrial, proporcionando así acceso a grandes cantidades de polipéptido recombinante. Sistemas de expresión preferidos son cultivos de células de mamíferos que son superiores a la mayoría de los otros sistemas eucarióticos basados en células de insectos, levaduras o similares, o incluso sistemas de expresión procarióticos tradicionales.

40 Sin embargo, el cultivo de células de mamíferos incluye enormes desafíos, especialmente a escala industrial. Las instalaciones de producción para el cultivo de células de mamíferos requieren una optimización completa de muchas condiciones de procedimiento.

45 En particular, los procedimientos de cultivo celular para la producción de polipéptidos en células de mamíferos requieren una optimización continua de las condiciones de cultivo y su adaptación a líneas celulares o productos específicos con el fin de alcanzar un alto rendimiento volumétrico de producto en combinación con una calidad de producto óptima.

50 Gran parte de los esfuerzos anteriores se han concentrado en los parámetros básicos de los medios de cultivo celular, incluida su composición, en relación, p. ej., con los tipos y concentraciones de iones, aminoácidos, vitaminas u oligoelementos o la osmolalidad del medio. Parámetros importantes adicionales, que han sido objeto de investigación, son, p. ej., la composición de la alimentación o los horarios de alimentación para alcanzar un crecimiento celular óptimo.

55 También se sabe que la temperatura y el pH como parámetros fisiológicos básicos tienen una influencia significativa en el cultivo de células de mamíferos. La temperatura en general afecta considerablemente al estado de crecimiento y la viabilidad de las células. Sin embargo, además de esto, también puede influir más específicamente en el producto polipeptídico y sus características alterando, p. ej., la glicosilación (documentos US 2003/0190710 A1; EP 1 373 547 A1; US 2004/0214289 A1).

60 El pH al que se mantienen el medio de crecimiento y las células también puede influir y alterar el crecimiento celular y la producción de polipéptidos de una manera específica que depende de la línea celular y del producto en particular (Sauer et al. Biotechnology and Bioengineering 2000, Vol 67, págs. 586-597; Yoon et al., Biotechnology and Bioengineering 2004, Vol 89, págs. 346-356; Kuwae et al., Journal of Bioscience and Bioengineering 2005, Vol 100, págs. 502-510).

A lo largo del transcurso del tiempo del cultivo, los requisitos de las células pueden cambiar. Si bien al principio es ventajoso optimizar las condiciones hacia un crecimiento celular mejorado, en etapas posteriores se vuelve importante la supervivencia celular potenciada y el mantenimiento de la densidad celular viable en relación con la obtención de títulos de producto altos. A este respecto, se ha sugerido la introducción de una o más etapas de temperatura durante el cultivo celular (Chen et al., J Biosci Bioeng. 2004; 97 (4):239-43). Para ello, las células de mamífero se cultivan al menos a dos temperaturas diferentes, en las que la primera temperatura más alta se optimiza para el crecimiento celular, mientras que la segunda o tercera temperatura más baja se selecciona para mejorar la productividad de las células (p. ej., Weidemann et al., Cytotechnology. 1994;15(1-3):111-6; documentos WO 00/36092; EP 0 764 719 A2, US 2005/019859, EP 1 575 998, US 2008/081356). Otros documentos describen el uso de etapas de temperatura en combinación con características adicionales específicas de los medios. El documento EP 1 757 700 A2, p. ej., describe una etapa de temperatura en combinación con la presencia de sales butirato como componente del medio, mientras que el documento EP 1 789 571 A1 describe una etapa de temperatura combinado con un contenido definido de aminoácidos.

También se han cambiado otras condiciones de cultivo celular. El documento US 5 856 179 ha introducido un método para producir polipéptidos en un cultivo celular de alimentación en lotes, en el que durante el cultivo la osmolalidad del medio se altera considerablemente de alrededor de 280-330 mOsm en la fase de crecimiento principal a aproximadamente 400-600 mOsm durante la fase de producción.

El documento WO 02/101019 ha examinado muchos componentes de medios específicos, tales como las concentraciones de glutamina y glucosa, incluyendo cambios de temperatura y pH. Sin embargo, se encontró que un desplazamiento del pH en medios con alto contenido de glucosa tiene un impacto negativo en el cultivo y no se recomienda reducir el pH durante la fase de crecimiento o producción.

El documento WO 2006/026445 describe un método para la producción de polipéptidos, en el que las condiciones de cultivo celular se cambian de un conjunto de condiciones de cultivo a un segundo conjunto y en el que este cambio se combina con características de los medios específicos con respecto al contenido de aminoácidos específicos. El cambio de condiciones se relaciona específicamente con desplazamientos de temperatura. Otros cambios en las condiciones, tales como el pH o la osmolalidad, se mencionan generalmente como opciones adicionales, sin embargo, no se especifican ajustes de parámetros particulares.

Considerando los desafíos anteriores y las desventajas existentes, existe una necesidad continua en el campo de la biotecnología industrial de procedimientos de cultivo mejorados que permitan producir polipéptidos recombinantes a escala industrial con rendimientos aún mayores, es decir, productividad específica y general mejorada y calidad del producto incrementada.

Un objetivo técnico específico de los procedimientos de producción de polipéptidos es mantener altas viabilidades celulares y maximizar el rendimiento final de polipéptidos optimizando los parámetros del proceso de cultivo celular en general.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a la combinación de desplazamientos de temperatura y pH en un procedimiento para la producción de polipéptidos recombinantes. Adaptadas a las necesidades de las células recombinantes, en particular las células CHO, las combinaciones específicas de estos dos parámetros conducen a una productividad incrementada de las células, así como a una calidad mejorada del producto de los polipéptidos producidos de forma recombinante. En particular, la presente invención ha encontrado efectos positivos basados en la sincronización y programación particulares del o de los desplazamientos de temperatura y pH en términos absolutos y relativos, así como en relación con la magnitud particular de los desplazamientos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se describe un procedimiento para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende cultivar células CHO en un medio y expresar el polipéptido recombinante, en el que la temperatura y el pH se cambian durante el procedimiento.

En particular, el procedimiento de acuerdo con la presente invención implica el desplazamiento de temperatura y el desplazamiento de pH como se define en la reivindicación 1. En una realización de la presente invención, se lleva a cabo un desplazamiento de una primera temperatura más alta a una segunda más baja después de que las células se hayan primero cultivado y mantenido durante al menos 3 días, alternativamente al menos 4 días, o al menos 5 días a una primera temperatura. La segunda temperatura más baja es aproximadamente 1 a aproximadamente 8°C más baja que la primera temperatura. En otra realización alternativa de la presente invención, el desplazamiento de temperatura es, p. ej., entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5°C, en particular aproximadamente 4°C o aproximadamente 3,5°C. A continuación, la segunda temperatura se mantiene durante al menos dos días. La segunda temperatura se puede mantener hasta la recolección.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la primera temperatura está preferiblemente en el intervalo de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 38°C, y la segunda temperatura está preferiblemente en el intervalo de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C.

5 Además del desplazamiento de temperatura, también se cambia el pH de un primer a un segundo pH. Por tanto, los procedimientos de acuerdo con la presente invención comprenden al menos un desplazamiento de pH. En particular, las células se cultivan a un primer valor de pH durante al menos 2 días y luego el pH se cambia a un segundo valor de pH que está entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1 unidad de pH más bajo que el primer pH y las células se cultivan a dicho segundo valor de pH durante al menos 1 día, alternativamente durante al menos 2 días.
10 En algunas realizaciones, el segundo pH se mantendrá hasta la recolección.

El primer valor de pH está preferiblemente en el intervalo de entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,5. El segundo valor de pH está preferiblemente en el intervalo de entre aproximadamente pH 6,0 y aproximadamente pH 7,1.

15 Por tanto, una realización de la presente invención es un procedimiento para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende cultivar células CHO en un medio y al menos un desplazamiento de pH y expresar el polipéptido recombinante como se define en la reivindicación 1.

20 El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede comprender opcionalmente un segundo desplazamiento de pH, que sigue al primer desplazamiento de pH después de al menos 1 día. Si el primer desplazamiento de pH es seguido por un segundo desplazamiento de pH después de al menos 1 día, entonces el tercer valor de pH es de aproximadamente 0,05 unidades de pH a aproximadamente 1 unidad de pH más alto que el segundo valor de pH. La tercera temperatura se puede mantener hasta la recolección.

25 El procedimiento de cultivo celular de acuerdo con la presente invención incluye desplazamientos de pH activos y/o pasivos, es decir, el pH se altera "activamente" por un cambio en el punto de ajuste del pH a un nuevo valor y/o "pasivamente" al permitir un cambio del pH del medio por acumulación de productos metabólicos, siguiendo así un perfil de pH metabólico específico para el cultivo celular dentro de un intervalo de pH predefinido. En una realización preferida de la invención, el desplazamiento activo se induce añadiendo el o los agentes de cambio y reguladores del pH respectivos conocidos por la persona experta, tales como ácidos, por ejemplo HCl, o bases, por ejemplo NaOH. En una realización preferida adicional del procedimiento, esto se logra definiendo un punto de ajuste de pH y una banda muerta en la que se permite que cambie el pH. A diferencia del desplazamiento activo, el desplazamiento pasivo o cambio de pH no se induce añadiendo el agente o los agentes de cambio de pH respectivos.

35 En un aspecto adicional, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo utilizando un medio libre de proteínas y suero. Preferiblemente, el medio se caracteriza por un contenido total de aminoácidos de entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, alternativamente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mM.

40 Un procedimiento preferido como se define anteriormente se realiza en modo de alimentación por lotes que comprende la alimentación de al menos dos soluciones nutrientes que se añaden al cultivo. En un procedimiento de este tipo, p. ej., una de las soluciones de alimentación añadidas al medio de cultivo es una alimentación que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina. Se prefiere además que la alimentación comprenda el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina en concentraciones respectivas en el intervalo de aproximadamente 6,5 g/l y aproximadamente 8,0 g/l y en el intervalo de aproximadamente 9 g/l y aproximadamente 11 g/l. en una solución acuosa a un pH de carácter básico por encima de 10. En particular, las concentraciones pueden ser de aproximadamente 7,25 g/l para la cistina y de aproximadamente 10,06 g/l para la tirosina. En una realización preferida, la solución de alimentación que comprende cistina y tirosina se añade al medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 0,2 y
45 aproximadamente 0,8% en peso del peso del medio de cultivo inicial por día o, alternativamente, en aproximadamente 0,4% en peso del peso del medio de cultivo celular inicial por día.

50 El procedimiento de acuerdo con la invención se utiliza preferiblemente para la producción de un polipéptido recombinante que está glicosilado. De acuerdo con realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Breve Descripción de los Dibujos

55 La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención.

60 La Fig. 1 es una ilustración de la implementación de cambio escalonado de un desplazamiento de pH activo con un desplazamiento de pH de 7,00 a 6,80.

La Fig. 2A muestra un perfil de pH obtenido mediante una implementación de desplazamiento de pH pasivo. El desplazamiento de pH de 7,00 a 6,80 en el biorreactor de producción se alcanzó estableciendo el punto de ajuste en 6,90 y definiendo una banda muerta de 0,10. Después de un primer desplazamiento de pH a 6,80, el pH se mantiene activamente en 6,80 hasta el final del cultivo.

5 La Fig. 2B muestra un perfil de pH obtenido mediante un segundo desplazamiento de pH. En este ejemplo, no se alcanza el límite de pH superior (anterior).

10 La Fig. 2C muestra un perfil de pH con un segundo desplazamiento de pH, pero aquí el pH vuelve a encontrarse con el límite superior de pH y se mantiene allí.

15 La Fig. 3 muestra el efecto de una temperatura constante frente a un desplazamiento de temperatura de la densidad de células viables de un clon de células CHO productoras de mAb1 como función del tiempo de cultivo en cultivos en matraz de agitación (véase el Ejemplo 1).

La Fig. 4 muestra el efecto de una temperatura constante frente a un desplazamiento de temperatura sobre la viabilidad de un clon de células CHO productoras de mAb1 (véase el Ejemplo 1).

20 La Fig. 5 muestra el título de producto como una función del tiempo de cultivo para cultivos en matraces de agitación de un mAb1 productor del clon de células CHO con y sin un desplazamiento de temperatura (véase el Ejemplo 1).

La Fig. 6 muestra la concentración de lactato a lo largo del tiempo de cultivo en un clon productor de mAb2 (véase el Ejemplo 2).

25 La Fig. 7 muestra la densidad de células viables en función del tiempo de cultivo en un biorreactor de 300 L con un clon de células CHO. Las condiciones de cultivo incluyen una etapa de temperatura (día 5) y dos desplazamientos de pH debidos a la regulación del pH con un punto de ajuste y una banda muerta (véase también el Ejemplo 2).

30 La Fig. 8 muestra el título del producto como una función del tiempo de cultivo en un biorreactor de 300 L con un clon de células CHO. El procedimiento combinó una temperatura con desplazamientos de pH (véanse también la Fig. 7 y el Ejemplo 2).

35 La Fig. 9 muestra para tres experimentos independientes la concentración de mAb3 obtenida mediante un proceso de alimentación por lotes con cultivos de células CHO cultivadas en un biorreactor de vidrio en función de la integral de células viables. Las condiciones de cultivo incluyeron un desplazamiento de temperatura idéntico para los tres experimentos y un desplazamiento de pH adicional en un solo experimento.

Descripción Detallada de la Invención

40 De acuerdo con la presente invención, un procedimiento para la preparación de un polipéptido recombinante comprende cultivar células CHO y expresar el polipéptido recombinante, en el que la temperatura y el pH se cambian durante el procedimiento y en el que el desplazamiento de temperatura se inicia entre 1 y 5 días después del desplazamiento del pH. La presente invención busca mejorar el procedimiento de producción a gran escala de polipéptidos en cultivo de células CHO adaptando dinámicamente las condiciones del cultivo celular a lo largo del transcurso del tiempo de cultivo, incluyendo los desplazamientos de temperatura y pH.

50 La expresión "producción a gran escala" de polipéptidos se refiere a las cantidades típicamente requeridas para la producción industrial de polipéptidos recombinantes utilizadas para la preparación de productos biofarmacéuticos terapéuticamente activos. Los cultivos celulares con medios de cultivo celular con un volumen de al menos 500 L o al menos 1000 L o, alternativamente, de al menos 5000 L o incluso volúmenes mayores, representan típicamente aplicaciones de producción a gran escala.

55 La expresión "medio de cultivo celular", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una solución acuosa de nutrientes que se puede utilizar para hacer crecer las células a lo largo de un período de tiempo prolongado. Típicamente, los medios de cultivo celular incluyen los siguientes componentes: Una fuente de energía, que habitualmente será un compuesto de hidrato de carbono, preferiblemente glucosa, aminoácidos, preferiblemente el conjunto básico de aminoácidos, incluidos todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y/u otros compuestos orgánicos que se requieren a bajas concentraciones, ácidos grasos libres y compuestos inorgánicos, incluyendo oligoelementos, sales inorgánicas, compuestos tampón y nucleósidos y bases.

60 El uso de medios de cultivo celular en el campo de la industria farmacéutica, por ejemplo para la producción de polipéptidos recombinantes terapéuticamente activos, generalmente no permite el uso de material de origen biológico alguno debido a problemas de seguridad y contaminación. Por lo tanto, el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un medio libre de suero y/o proteínas. La expresión «medio libre de suero y/o proteínas» representa un medio completamente definido químicamente, que no contiene aditivos de origen animal

tales como hidrolizados de tejidos, p. ej., suero bovino fetal o similares. Además, las proteínas, especialmente factores de crecimiento, tales como insulina, transferrina o similares, tampoco se añaden preferiblemente al cultivo celular de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención tampoco se complementa con una fuente de proteína hidrolizada tal como peptona de soja, o de trigo o de arroz o hidrolizado de levadura o similares.

La expresión "desplazamiento de temperatura", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un cambio en la temperatura del cultivo en un biorreactor/recipiente de cultivo, alterando activamente el punto de ajuste de la temperatura a un valor más bajo. Primero, la temperatura se controla y estabiliza a una temperatura definida durante un período de tiempo y, después de cambiar el punto de ajuste, se estabiliza a otra temperatura definida durante un período de tiempo. La etapa de temperatura no se refiere a pequeñas fluctuaciones de temperatura espontáneas en el cultivo.

La expresión "desplazamiento de pH", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un cambio en el pH del cultivo en un biorreactor/recipiente de cultivo, alterando activamente el punto de ajuste del pH a un valor más bajo o más alto o permitiendo que se produzca un desplazamiento del pH entre un límite del pH superior e inferior.

Dependiendo del tamaño del recipiente de cultivo/biorreactor y del volumen del cultivo, el desplazamiento en el parámetro respectivo medido en el medio puede tardar de unos minutos a varias horas.

El pH se puede cambiar de dos formas diferentes, mediante un enfoque activo y/o pasivo, tal como se describe con más detalle más adelante.

La expresión "desplazamiento activo" en el pH se define por un cambio en el punto de ajuste del pH a un nuevo valor. En una realización preferida de la invención, el desplazamiento activo se induce añadiendo el o los agentes de cambio y reguladores del pH respectivos conocidos por el experto.

La expresión "desplazamiento pasivo" indica que durante un desplazamiento pasivo en el pH se permite que las propias células cambien el pH del medio por acumulación de productos metabólicos, siguiendo así un perfil de pH metabólico específico para el cultivo celular dentro de un intervalo de pH predefinido. En una realización del procedimiento, esto se logra definiendo un punto de ajuste de pH y una banda muerta en la que se permite que cambie el pH. A diferencia del desplazamiento activo, el desplazamiento pasivo o cambio de pH no se induce añadiendo el agente o los agentes de cambio de pH respectivos.

Se añaden agentes reguladores del pH a los cultivos con el fin de mantener el pH en un punto de ajuste específico o para cambiar el pH durante un desplazamiento de pH. Agentes reguladores del pH típicos utilizados para propósitos de cultivo celular incluyen soluciones ácidas o base líquidas, tales como NaOH o HCl. Estos agentes reguladores del pH se añaden a los medios en el recipiente de cultivo/biorreactor. Alternativamente, el medio de cultivo celular puede ser gasificado con CO₂ para ajustar el pH.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se describe un procedimiento para la preparación de un polipéptido recombinante, que comprende cultivar células CHO y expresar el polipéptido recombinante, en el que la temperatura y el pH se cambian durante el procedimiento. Más en particular, se lleva a cabo un desplazamiento de una primera temperatura más alta a una segunda más baja después de que las células se hayan primero cultivado y mantenido durante al menos tres días, alternativamente al menos 4 días, o al menos 5 días a una primera temperatura. Esta segunda temperatura más baja es aproximadamente 1 a aproximadamente 8°C más baja que la primera temperatura. En otra realización de la invención, el desplazamiento de temperatura puede ser entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5°C, en algunas implementaciones es aproximadamente 4°C o aproximadamente 3,5°C. A continuación, esta segunda temperatura se mantiene durante al menos dos días. Además del desplazamiento de temperatura, también se cambia el pH de un primer a un segundo pH.

Los parámetros exactos relacionados con el desplazamiento de temperatura y el pH se determinan de antemano y se adaptan en función de las necesidades de la línea celular que ha sido transfectada con una o más construcciones génicas particulares que codifican el polipéptido respectivo que se produce. Alternativamente, las necesidades pueden hacerse dependientes de parámetros metabólicos que se determinan durante el cultivo para la producción a gran escala en un biorreactor.

Un desplazamiento de temperatura de una temperatura más alta a una temperatura más baja es útil porque la primera temperatura es óptima para el crecimiento celular, mientras que la temperatura más baja reduce la tasa de muerte celular. Por lo tanto, una temperatura reducida permitirá un mantenimiento más prolongado de la alta densidad celular viable. La productividad específica para la célula del polipéptido de interés a esta temperatura reducida habitualmente no se reduce drásticamente con respecto a la temperatura inicial, a veces la productividad específica para la célula puede ser la misma o, a veces, incluso superior. Un mantenimiento más prolongado de una alta densidad de células viables puede proporcionar, además, la ventaja de minimizar la formación de un producto de calidad inadecuada. La combinación de estos factores permite una alta productividad volumétrica y la consecución de altos títulos de producto

de interés de adecuada calidad en el momento de la recolección. En una realización, la primera temperatura está en el intervalo de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 38°C. En otro ejemplo, la primera temperatura está entre aproximadamente 36°C y aproximadamente 38°C. La segunda temperatura alcanzada después del desplazamiento de temperatura puede estar en el intervalo de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 37°C, o entre aproximadamente 32 y aproximadamente 34°C o, alternativamente, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 32°C.

El momento del desplazamiento de temperatura es importante para maximizar la productividad. Si el desplazamiento de temperatura se realiza demasiado pronto, no se alcanzará una alta densidad celular o se tardará mucho en alcanzarla. Si el desplazamiento de temperatura se realiza demasiado tarde, es posible que no evite eficazmente una disminución en la densidad de células viables. Preferiblemente, el momento del desplazamiento de temperatura se define en días después de la inoculación del biorreactor utilizado para la producción a gran escala de los polipéptidos recombinantes. En otra realización de la invención, el tiempo se puede definir mediante la densidad celular que se alcanza en el biorreactor de producción a gran escala. Por ejemplo, el desplazamiento de temperatura se inicia durante la fase de crecimiento lineal o logarítmica de las células o cuando se alcanza del 40 al 90% de la densidad celular máxima. Un punto de ajuste dependiente de la densidad celular puede expresarse en términos relativos (% de la densidad celular máxima que se puede alcanzar) o en términos absolutos (células viables/ml). En un ejemplo específico, la densidad celular se elige entre 60 y 90%.

El tiempo entre la inoculación del biorreactor/recipiente de cultivo y el desplazamiento de temperatura puede oscilar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 14 días dependiendo del biorreactor/recipiente de cultivo específico y la línea celular utilizada. Alternativamente, el desplazamiento se produce entre los días 3 y 8. Como una alternativa a un solo criterio como se describe anteriormente, también se puede establecer un criterio doble combinando dos de las variables arriba mencionadas, de modo que deben cumplirse las condiciones seleccionadas con respecto al tiempo y/o la densidad celular.

Si es necesario para un crecimiento y una producción óptimos, también se pueden utilizar más de una etapa de temperatura, p. ej., al menos 2 etapas, cada una de las cuales consiste en un cambio de temperatura de al menos aproximadamente 1°C, alternativamente al menos aproximadamente 2°C, en que cada una de las temperaturas se mantiene durante al menos un día. Por tanto, las temperaturas pueden reducirse incluso más y se puede seguir un perfil de temperaturas más complejo.

De acuerdo con la invención, las células se cultivan a un primer valor de pH antes del desplazamiento de pH durante al menos 2 días, alternativamente durante al menos 3 días, p. ej., durante al menos 4 días o incluso durante al menos 5 días. El pH durante los primeros días después de comenzar el cultivo se elige para que sea favorable para una rápida expansión de la densidad celular en el biorreactor. Durante este tiempo, el pH del biorreactor se controla en un determinado punto de ajuste que es óptimo para el crecimiento celular. Una vez que se alcanza una determinada densidad celular, es conveniente modificar el pH del cultivo. El pH se desplaza después de este primer período de tiempo a un segundo valor de pH que está entre aproximadamente 0,05 - 1 unidades de pH más bajo que el primer pH. Las células se cultivan a dicho segundo pH durante al menos 2 días. En algunas realizaciones de la presente invención, el segundo valor de pH puede ser de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 1 unidad de pH más bajo que el primer pH. Este desplazamiento en el pH generalmente se alcanza cambiando el punto de ajuste del pH del biorreactor/recipiente de cultivo. El segundo valor de pH se selecciona para reducir la muerte celular (p. ej., apoptosis) y para permitir mantener altas tasas de producción específicas para células de polipéptidos de calidad adecuada. Como consecuencia, en una primera realización, el momento del desplazamiento de pH se define en días después de la inoculación del biorreactor que se utiliza para la producción a gran escala del polipéptido recombinante. En una segunda realización, el tiempo se puede definir mediante la densidad celular que se alcanza en el biorreactor a gran escala. De acuerdo con una alternativa adicional, el tiempo también puede depender de parámetros metabólicos específicos que se miden durante el cultivo en el medio de cultivo celular. En un ejemplo no limitante, esta puede ser la concentración de lactato. También se pueden utilizar parámetros no directos que reflejan el estado metabólico del cultivo, tales como, p. ej., la dosis requerida de CO₂ o el control del ácido por unidad de tiempo para mantener el pH en el punto de ajuste de pH superior, o la dosis requerida de NaOH o el control del agente cáustico para mantener el pH en un punto de ajuste de pH más bajo. En lugar de utilizar solo un criterio para el desplazamiento de pH, alternativamente, se puede establecer un criterio combinado combinando parámetros, tales como, p. ej., días después de la inoculación y densidad celular.

Los beneficios de la estrategia de desplazamiento de pH también implican el hecho de que los niveles de dióxido de carbono disuelto y la adición de base pueden reducirse durante el transcurso del cultivo, lo que evita sus efectos negativos. Al comienzo del cultivo, es ventajoso tener un valor de pH más alto (p. ej., 7,0) en el recipiente de cultivo o biorreactor, ya que un valor de pH más bajo (p. ej., 6,8) requeriría niveles más altos de dióxido de carbono para mantener el pH. Sin embargo, estos altos niveles de dióxido de carbono pueden tener efectos negativos en las células y reducir la tasa de crecimiento. Por el contrario, en fases posteriores del cultivo, mantener un pH alto (p. ej., 7,0) requiere más adición de base que mantener un pH bajo (p. ej., 6,8). Esto se debe a que se forma ácido láctico y la acidez resultante debe compensarse mediante la adición de una base. Cuanto mayor sea el punto de ajuste del pH,

mayor será la cantidad de base requerida. La adición de base aumenta la osmolalidad del cultivo, lo que puede ser desfavorable para el crecimiento y mantenimiento de una alta densidad celular viable.

5 Los beneficios potenciales de la estrategia de desplazamiento de pH también se pueden describir desde la perspectiva de minimizar la formación de ácido láctico. Células CHO producen generalmente menos ácido láctico a valores de pH más bajos (p. ej., 6,8) que a valores más altos (p. ej., 7,0). Una menor producción de ácido láctico da como resultado una menor adición de base, lo cual es beneficioso como se describió anteriormente.

10 En una realización, el primer pH se selecciona para que esté en el intervalo entre pH 6,8 y 7,5. En otra realización, el primer pH se selecciona para que esté en el intervalo entre pH 6,8 y 7,2. En una realización adicional, el primer pH se selecciona para que sea como máximo pH 7 o, alternativamente, por debajo de pH 7. El segundo valor de pH que se alcanza después del desplazamiento de pH está en el intervalo de entre pH 6,0 y pH 7,5, o entre pH 6,5 y 6.8.

15 El tiempo relativo de desplazamiento de temperatura y pH se selecciona para lograr el resultado más óptimo. La sincronización óptima de la temperatura y el desplazamiento de pH se eligen sobre una base específica para el procedimiento y dependen del estado de crecimiento o del estado metabólico del cultivo. El desplazamiento de temperatura se inicia entre 1 y 5 días después del desplazamiento de pH.

20 En un aspecto adicional de la presente invención, el pH se cambia activa o pasivamente entre dicho primer y dicho segundo valor de pH. Existe un cierto número de formas posibles de controlar el pH de los cultivos y de implementar un desplazamiento de pH. En un aspecto de la invención, el pH se desplaza activamente de un primer valor a un segundo valor de pH cambiando el punto de ajuste de pH (sin banda muerta) del controlador de pH a un nuevo valor.

25 Como resultado, el desplazamiento del primer valor de pH al segundo valor de pH es casi inmediato (desplazamiento escalonado) en el cultivo. La Fig. 1 ilustra una implementación de desplazamiento escalonado del desplazamiento de pH de este tipo, con un desplazamiento de pH 7,00 a 6,80 en este ejemplo particular. En esta implementación de la invención, el pH se mantiene primero en un valor de pH superior dosificando agentes reguladores de pH en consecuencia (p. ej., CO₂ o NaOH) y luego se cambia a un valor más bajo cambiando activamente el punto de ajuste (sin una banda muerta). El pH del punto de ajuste más bajo se puede alcanzar mediante la dosificación/adición activa de un agente acidificante al cultivo, dando como resultado un cambio rápido u omitiendo un agente que mantiene el pH en el primer pH de carácter más básico. En base al tamaño del biorreactor y del método arriba mencionado para influir en el pH, el cambio de pH puede completarse en el espacio de unos minutos hasta 24 horas.

35 En un aspecto adicional de la invención, se permite que el pH se desplace (derive) pasivamente de un primer a un segundo valor de pH correspondiente a un límite de pH superior e inferior y así seguir un perfil metabólico específico de cultivo celular. Como resultado, el cambio del primer valor de pH al segundo valor de pH es gradual. Esta forma alternativa de controlar el pH del medio de cultivo celular e implementar un desplazamiento de pH se logra programando el controlador de pH del biorreactor con un punto de ajuste y una banda muerta. Esto define un intervalo de pH permisible para el procedimiento, en el que el controlador de pH no realiza acción alguna. Por ejemplo, un valor de referencia de pH de 6,90 con una banda muerta de 0,10 unidades de pH definirá el pH 7,00 como límite superior de pH y el pH 6,80 como límite inferior de pH. En un biorreactor de producción de cultivo celular, el pH estará típicamente en el límite alto al comienzo del cultivo (primeros días), en que el controlador evita que el pH aumente mediante la dosificación de dióxido de carbono en el cultivo. Debido a la acumulación progresiva de ácido láctico producido por las células, el pH disminuirá finalmente de forma continua, p. ej., de 7,00 a 6,80, típicamente en unas pocas horas. Una vez que se alcanza el límite inferior de pH de, p. ej., 6,80, el controlador evita que el pH disminuya más allá de este pH dosificando la solución base en el cultivo. En base al tamaño del biorreactor, la línea celular específica, la densidad celular o las condiciones del medio, el cambio gradual de pH puede ocurrir en unas pocas horas o durar hasta un día.

50 En un aspecto adicional de la invención, el segundo pH del cultivo se mantiene activamente después del desplazamiento del pH al segundo pH durante el resto del tiempo de cultivo hasta la recolección. Esto se logra cambiando el punto de ajuste del pH a dicho segundo valor de pH y dosificando los agentes reguladores del pH en consecuencia.

55 En un aspecto adicional de la invención, el primer desplazamiento de pH va seguido de un segundo desplazamiento. El segundo desplazamiento de pH se produce al menos 1 día después del primero y el tercer valor de pH que se alcanza es al menos 0,05 unidades de pH más alto que el segundo pH.

60 En un aspecto adicional de la invención, el segundo desplazamiento de pH también puede producirse de forma activa o pasiva para alcanzar dicho tercer valor de pH. En la primera realización, esto se puede hacer cambiando activamente el punto de ajuste de pH como ya se ha descrito para el primer desplazamiento de pH (véase arriba). El momento del segundo desplazamiento de pH se puede definir en días después del primer desplazamiento de pH y/o puede volver a depender de parámetros metabólicos tales como, por ejemplo, la concentración de lactato. Un desplazamiento de este tipo puede ocurrir típicamente entre 1 y 10 días después del primer desplazamiento de pH.

Un desplazamiento activo se inicia cambiando el punto de ajuste de pH del cultivo. Los agentes reguladores del pH se dosificarán en consecuencia.

En la segunda realización, también se puede permitir que el pH cambie pasivamente y siga su perfil de pH metabólico. Esto se puede implementar, p. ej., definiendo un límite de pH superior e inferior como ya se ha esbozado arriba. En este caso, el límite de pH superior puede corresponder al mismo límite de pH superior que el definido para el primer desplazamiento de pH o puede modificarse a un nuevo valor inferior o superior. Preferiblemente, un límite de pH inferior y superior de este tipo puede lograrse programando el controlador de pH del biorreactor con un punto de ajuste y una banda muerta. Un cambio pasivo de este tipo en el pH se puede producir por remetalización del ácido láctico tardío en cultivo por las células, lo que hace que el pH aumente de nuevo a valores por encima de dicho límite inferior del intervalo de pH. En algunos casos es posible que el pH alcance nuevamente el límite superior del intervalo, en otros casos también puede permanecer por debajo de ese límite. La magnitud del segundo desplazamiento de pH puede incluir valores entre 0,05 y 1 unidades de pH. La duración de un desplazamiento de pH pasivo de este tipo no está exactamente definida, ya que la velocidad del desplazamiento/cambio depende de la actividad metabólica y de la remetalización del ácido láctico por parte de las células. Por lo general, puede llevar de 0,5 a 2 días alcanzar el límite superior de pH, pero en caso de un desplazamiento pasivo, el pH también puede permanecer por debajo del umbral superior definido hasta el final del cultivo.

La elección de la estrategia de implementación dependerá de múltiples factores, tales como la sensibilidad de las células al CO₂ y el pH óptimo para la formación del producto. Se pueden obtener diferentes perfiles de pH definiendo dos o más puntos de ajuste específicos durante el transcurso del cultivo o simplemente definiendo un punto de ajuste y una banda muerta (que opcionalmente también podrían cambiarse durante el cultivo). Los diferentes perfiles de pH que se pueden obtener estableciendo un punto de ajuste y una banda muerta se ilustran en la Fig. 2, para un punto de ajuste de pH 6,90 con una banda muerta de 0,10 como valores de ejemplo.

En un aspecto adicional de la invención, la cantidad total del polipéptido producido mediante un procedimiento que comprende una temperatura y uno o más desplazamientos de pH es mayor que sin combinar un desplazamiento de temperatura con uno o más desplazamientos de pH. La combinación de al menos un desplazamiento de temperatura con al menos un desplazamiento de pH que se adaptan en términos de tiempo y tamaño de las etapas a las necesidades de la línea celular transfectada particular ha conducido a un rendimiento de producto mucho mejor.

En aún otro aspecto de la invención, un procedimiento que comprende una temperatura y uno o más desplazamientos de pH tiene el potencial de conducir a un producto de calidad mejorada en comparación con la calidad obtenida sin combinar el desplazamiento de temperatura con uno o más desplazamientos de pH. Una posible razón del efecto beneficioso de un desplazamiento de pH a valores de pH más bajos en el cultivo durante la fase de producción puede ser la siguiente: el amoníaco se acumula típicamente en el medio de cultivo celular con el tiempo de cultivo y se sabe que afecta potencialmente a la glicosilación del producto, con el posible resultado de la disminución de la calidad del producto. Se supone que el amoníaco penetra en las células en forma de NH₃, donde puede influir en el pH intracelular al capturar iones H₃O⁺. El aumento resultante del pH intracelular puede afectar a la glicosilación. Desplazar el pH de un cultivo a un valor más bajo disminuirá la concentración de NH₃ extracelular a través de un aumento en la protonación de NH₃ en NH₄⁺, al cual las células son impermeables.

El procedimiento de cultivo celular de acuerdo con la presente invención, tal como se define en la reivindicación 1, se puede llevar a cabo utilizando diversos medios de cultivo celular. Medios de cultivo de células comúnmente utilizados que pueden utilizarse son, p. ej., D-MEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), D-MEM/F-12, MEM α , medio de Fischer, RPM I 1640BME, BGJb, pero no se limita a estos ejemplos. Estos medios pueden complementarse adicionalmente con componentes adicionales tales como, p. ej., nutrientes, vitaminas o hidratos de carbono.

Medios adecuados que están optimizados principalmente para el crecimiento celular contienen preferiblemente concentraciones iniciales de aminoácidos de acuerdo con los siguientes intervalos.

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	4,0 - 6,0, preferiblemente 4,5 - 5,5
Asparagina monohidrato	3,0 - 6,0, preferiblemente 4,0 - 5,5
Ácido aspártico	2,5 - 4,0, preferiblemente 3,0 - 3,6
Glicina	0,3 - 0,8, preferiblemente 0,5 - 0,7
Histidina, HCl H ₂ O	0,6 - 1,0, preferiblemente 0,7 - 0,9
Isoleucina	2,0 - 5,0, preferiblemente 3,0 - 4,0

Leucina	3,0 - 7,0, preferiblemente 3,5 - 6,0
Lisina HCl	2,0 - 4,0, preferiblemente 2,5 - 3,5
Metionina	1,0 - 1,5, preferiblemente 1,2 - 1,4
Fenilalanina	1,0 - 2,0, preferiblemente 1,3 - 1,8
Prolina	2,5 - 6,0, preferiblemente 3,0 - 5,5
Serina	3,0 - 8,0, preferiblemente 4,0 - 7,0
Treonina	2,0 - 3,5, preferiblemente 2,5 - 3,1
Triptófano	0,4 - 1,0, preferiblemente 0,5 - 0,8
Valina	2,5 - 5,0, preferiblemente 3,0 - 4,5
Tirosina	1,0 - 2,0, preferiblemente 1,2 - 1,8
Cistina	0,5 - 1,0, preferiblemente 0,6 - 0,8
Glutamina	5,5 - 9,5, preferiblemente 6,2 - 8,2

Medios que contienen aminoácidos tal como se define en la tabla anterior pueden utilizarse favorablemente en los procedimientos mejorados de cultivo celular de acuerdo con la presente invención.

- 5 Un aspecto adicional de la invención incluye el uso de medios de producción diseñados para la producción a gran escala de polipéptidos recombinantes. Estos medios de producción pueden contener opcionalmente cantidades incrementadas de componentes, por ejemplo, aminoácidos. En una realización preferida de la invención, se utiliza un contenido inicial de aminoácidos en estos medios en un intervalo de entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, alternativamente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mmol/L. En una realización alternativa de la invención, medios de producción de este tipo contienen concentraciones iniciales de aminoácidos de acuerdo con los siguientes intervalos.
- 10

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	4,0 - 6,0, preferiblemente 4,5 - 5,5
Asparagina monohidrato	9,0 - 11,0, preferiblemente 9,5 - 10,5
Ácido aspártico	2,5 - 4,0, preferiblemente 3,0 - 3,6
Glicina	0,3 - 0,8, preferiblemente 0,5 - 0,7
Histidina, HCl H ₂ O	1,0 - 1,5, preferiblemente 1,1 - 1,3
Isoleucina	5,5 - 7,0, preferiblemente 6,0 - 6,8
Leucina	8,0 - 10,0, preferiblemente 9 - 9,2
Lisina HCl	3,0 - 6,0, preferiblemente 4,0 - 5,0
Metionina	1,5 - 2,5, preferiblemente 1,5 - 2,0
Fenilalanina	2,0 - 3,5, preferiblemente 2,5 - 3,0
Prolina	7,5 - 9,0, preferiblemente 8,0 - 8,5
Serina	10,5 - 13,0, preferiblemente 11,0 - 11,9
Treonina	3,5 - 5,5, preferiblemente 4,0 - 5,0
Triptófano	0,9 - 2,0, preferiblemente 1,0 - 1,4
Valina	5,5 - 7,5, preferiblemente 6,0 - 6,8
Tirosina	1,0 - 3,0, preferiblemente 2,0 - 2,5
Cistina	0,5 - 2,0, preferiblemente 1,0 - 1,3
Glutamina	5,5 - 9,5, preferiblemente 6,2 - 8,2

Ácido glutámico	0,5 - 2,5, preferiblemente 1,0 - 1,2
-----------------	--------------------------------------

Medios de producción que contienen aminoácidos tal como se define en la tabla anterior pueden utilizarse favorablemente en los procedimientos mejorados de cultivo celular de acuerdo con la presente invención.

5 El cultivo de células se puede llevar a cabo en cultivo adherente, por ejemplo en cultivo en monocapa o preferiblemente en cultivo en suspensión.

10 El cultivo de células a gran escala se puede utilizar, por ejemplo, mediante los diversos procedimientos de fermentación establecidos en la biotecnología industrial. Pueden utilizarse procedimientos de cultivo celular continuos y discontinuos utilizando el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención. También se pueden utilizar otras tecnologías de reactor conocidas, p. ej., tecnologías de perfusión o similares. Los procedimientos por lotes son una realización preferida.

15 El cultivo celular por lotes incluye el cultivo por lotes alimentado o el cultivo por lotes simple. El cultivo celular por lotes alimentado se refiere al cultivo celular en el que las células de mamífero y el medio de cultivo celular se suministran al recipiente de cultivo inicialmente y los nutrientes del cultivo adicionales se alimentan de forma continua o en incrementos discretos al cultivo durante el proceso de cultivo con o sin recolección periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo. El cultivo por lotes simple se refiere a un procedimiento en el que todos los componentes para el cultivo celular, incluidas las células de mamífero y el medio de cultivo celular, se suministran al
20 recipiente de cultivo al comienzo del proceso de cultivo.

25 En un aspecto adicional de la invención, la alimentación del cultivo se realiza en un procedimiento por lotes alimentado, consistiendo la alimentación en dos soluciones nutritivas que se añaden al cultivo. Ambas soluciones nutritivas se añaden al recipiente de cultivo en base a un programa predeterminado, determinado para la línea celular particular y el producto o de acuerdo con las necesidades metabólicas que se determinan midiendo el consumo de, p. ej., glucosa o aminoácidos en el recipiente de cultivo. Ambas soluciones de nutrientes se pueden añadir de forma independiente, ya sea como una alimentación de bolo o de forma continua. Típicamente, las soluciones de alimentación nutritivas comprenden aminoácidos, al menos un hidrato de carbono como fuente de energía, oligoelementos, vitaminas o iones
30 específicos. Es particularmente ventajoso utilizar soluciones de alimentación concentradas para evitar un gran aumento de volumen y la dilución del producto. En algunas realizaciones, también puede ser útil tener al menos dos soluciones de alimentación diferentes. Esto permite la dosificación independiente de dos o más grupos diferentes de nutrientes y componentes a las células y, por lo tanto, un mejor ajuste de las condiciones de alimentación con respecto al suministro óptimo de determinados nutrientes.

35 En una realización adicional de la invención, una de las dos soluciones de alimentación añadidas al medio de cultivo celular es una alimentación concentrada que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina en concentraciones respectivas en el intervalo de aproximadamente 6,5 g/l y aproximadamente 8,0 g/l y en el intervalo de aproximadamente 9 g/l y aproximadamente 11 g/l en una solución acuosa a un pH básico por encima de 10. En una realización particular, la alimentación concentrada comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina a
40 concentraciones respectivas de 10,06 g/l de L-tirosina y 7,25 g/l de cistina a un pH superior a 10.

45 El medio de alimentación que comprende cistina y tirosina como se describió arriba se puede añadir en base al consumo medido de los respectivos aminoácidos o de acuerdo con un programa fijo, p. ej., aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,8% en peso del peso del medio de cultivo celular inicial al día, o a aproximadamente 0,4% en peso del peso del medio de cultivo celular inicial al día.

50 En algunos ejemplos, la otra solución de alimentación contiene todos los demás aminoácidos que también están presentes en el medio de carácter básico, excepto tirosina y cistina. En algunos ejemplos, esta solución de alimentación adicional puede consistir en componentes seleccionados particulares, tales como, por ejemplo, aminoácidos o hidratos de carbono. En una realización adicional de la invención, este medio de alimentación concentrado contiene preferiblemente aminoácidos seleccionados de acuerdo con los siguientes intervalos de concentraciones.

Aminoácidos	Medio de Alimentación Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	12,0 - 17, preferiblemente 13,5 - 16,0
Histidina, HCl H ₂ O	5,5 - 7,5, preferiblemente 5,9 - 7,0
Isoleucina	21 - 28,0, preferiblemente 22,0 - 27
Leucina	32 - 42, preferiblemente 34,5 - 40,0
Lisina HCl	17,0 - 22,0, preferiblemente 17,5 - 21,5
Metionina	5,5 - 8,0, preferiblemente 6,0 - 7,5

Fenilalanina	8,5 - 12,0, preferiblemente 9,0 - 10,5
Prolina	18,0 - 24, preferiblemente 18,5 - 22,0
Serina	39,0 - 49,0, preferiblemente 39,5 - 46,5
Treonina	14,5 - 19,0, preferiblemente 15,0 - 18,5
Triptófano	3,0 - 5,0, preferiblemente 3,5 - 4,9
Valina	23,0 - 29,0, preferiblemente 23,8 - 27,5
Glutamina	175,0 - 220,0, preferiblemente 176,0 - 201

Preferiblemente, también se añaden hidratos de carbono, tales como glucosa, a este medio de alimentación concentrado, estando las concentraciones preferidas entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 1400 mmol/l o, alternativamente, entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 1395 mmol/l.

5 El medio de alimentación como se acaba de describir, que incluye preferiblemente un hidrato de carbono, tal como glucosa, se puede añadir en base al consumo medido de los aminoácidos respectivos o de acuerdo con un programa fijo, p. ej., aproximadamente de 1 a 4% en peso del peso del medio de cultivo celular inicial por día, p. ej., a aproximadamente 2% en peso del peso del medio de cultivo celular inicial por día.

10 Los polipéptidos que se pueden producir a partir de los cultivos celulares y los medios de cultivo celular de acuerdo con la presente invención no están limitados. Los polipéptidos pueden ser recombinantes o no recombinantes. El polipéptido puede ser homólogo a la célula huésped o, preferiblemente, puede ser de origen exógeno. El término polipéptido, tal como se utiliza en esta memoria, abarca moléculas compuestas por una cadena de más de dos aminoácidos unidos por enlaces peptídicos; moléculas que contienen dos o más de cadenas de este tipo; moléculas que comprenden una o más cadenas de este tipo se modifican adicionalmente, p. ej., mediante glicosilación. El término polipéptido pretende abarcar proteínas. El polipéptido de interés puede ser de cualquier origen. Polipéptidos de interés preferidos son de origen humano y, más preferiblemente, las proteínas de interés son proteínas terapéuticas.

20 La clase preferida de polipéptidos producidos por cultivos celulares y el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención son anticuerpos recombinantes.

25 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos modificados con nanocuerpos, subunidades de anticuerpos, derivados de anticuerpos, anticuerpos artificiales, combinaciones de anticuerpos con proteínas y fragmentos de anticuerpos suficientemente largos para mostrar la actividad biológica deseada. Los anticuerpos monoclonales como se utilizan en esta memoria pueden ser anticuerpos humanos.

30 Sin embargo, también se pueden producir polipéptidos distintos de los anticuerpos utilizando cultivos celulares y medios de cultivo celular de acuerdo con la presente invención, p. ej., polipéptidos tales como proteínas transmembrana, receptores, hormonas, factores de crecimiento, proteasas, proteínas coagulantes y anticoagulantes, proteínas inhibitoras, interleuquinas, factores de transporte, proteínas de fusión y similares.

35 Los productos obtenidos de procedimientos de cultivo celular de este tipo se pueden utilizar para la preparación de preparaciones farmacéuticas. Además, la o las proteínas de acuerdo con la invención se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, receptores, soportes, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

45 En los Ejemplos descritos a continuación se utilizan medios de cultivo celular químicamente definidos 1 y 2 que tienen la composición que se detalla en la Tabla 1 siguiente. Los componentes individuales de estos medios de cultivo celular están disponibles de fuentes comerciales estándares.

Tabla 1

Componentes	Medio 1 Conc. final (mg/l)	Medio 2 Conc. final (mg/l)
CaCl ₂ , anhidr.	131	133,2

ES 2 870 469 T3

KCl, anhidr.	800	800
MgCl ₂ , anhidr.	155	250,4
NaCl	850,6	500
Hidrógeno-fosfato disódico, anhidr.	710	1065
Hidrógeno-carbonato sódico, anhidr.	2500	2000
L-arginina, base libre	871	871
L-asparagina, H ₂ O	616	1501
Ácido L-aspártico	461	461
L-cistina	200,1	304,5
Sal de Na del ácido L-glutámico hidrato	-	182
Ácido L-glutámico	-	-
L- Histidina, HCl - H ₂ O	168	268
L-isoileucina	394	894
L-leucina	499	1199
L-lisina, HCl	621	821
L-metionina	179	279
L-fenilalanina	264	464
L-prolina	368	968
L-serina	432	1232
L-treonina	333	533
L-triptófano	102	252
L-valina	375	775
L-tirosina	277,7	422,5
Glicina	38	38
L-glutamina	1169,2	1169,2
Biotina	0,4	0,4
D-pantotenato de Ca	4	4
Ácido fólico	5	5
mio-inositol	40	140
Nicotinamida	4	4
Piridoxina, HCl	2	2
Riboflavina	0,4	0,4
Vitamina B12	2	2
Tiamina, HCl	4	4
Putrescina, 2HCl	10	110
Cloruro de colina	40	240
Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₃)	0,03	0,03
Cloruro de manganeso tetrahidrato	0,3	0,3
Molibdato de amonio tetrahidrato	0,3	0,3
Cloruro de zinc, anhidr.	3	3
Cloruro cúprico dihidrato	0,3	0,3
Cloruro de cobalto hexahidrato	0,3	0,3
Etanolamina	10	100
Monotioglicerol	2	-

HEPES, forma ácida	17870	4766
Citrato tri-sódico dihidrato	911,7	1235,2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	54,1	54,1
Pluronic F68	1000	1000
D-glucosa, anhidr.	10000	10000
HCl	-	327,6
NaOH	799,2	339,9

La Tabla 2 que figura a continuación muestra la composición de un medio de alimentación concentrado que contiene L-tirosina y cistina. El medio de alimentación se puede añadir basándose en el consumo medido de los aminoácidos respectivos o de acuerdo con un programa fijo, p. ej., al 0,4% en peso por día.

5

Tabla 2

Componentes	Medio de Alimentación (g/l)
NaOH al 32%	18,7 mL
L-tirosina	10,06
Cistina	7,25

La Tabla 3 que figura a continuación muestra la composición de un medio de alimentación concentrado ejemplar. El medio de alimentación se puede añadir basándose en el consumo medido de los aminoácidos o de acuerdo con un programa fijo, p. ej., al 2% en peso por día.

10

Tabla 3

Componentes	Medio de Alimentación (g/l)
L-arginina, base libre	2,72
L-Histidina, HCl - H ₂ O	1,44
L-isoleucina	3,44
L-leucina	5,20
L-lisina, HCl	3,72
L-metionina	1,08
L-fenilalanina	1,72
L-prolina	2,44
L-serina	4,76
L-treonina	2,08
L-triptófano	0,88
L-valina	3,16
L-glutamina	29,23
D-glucosa-monohidrato	275,00
HCl al 25%	8,25 ml
NaOH al 32%	5,6 ml

Para los experimentos de los ejemplos se utiliza una línea celular CHO parental que se deriva de la línea celular dhfr (+) CHO-K1 ATCC CCL-61 (Kao et. al., Genetics, 1967, 55, 513-524; Kao et. al., PNAS, 1968, 60, 1275-1281; Puck et. al., J. Exp. Med., 1958, 108, 945-959) mediante adaptación a condiciones de medios libres de proteínas, libres de suero. Se transfectan tres partes alícuotas de esta línea celular parental para expresar tres anticuerpos monoclonales diferentes mAB1, mAB2, mAB3, respectivamente.

15

20

Ejemplo 1 (Ejemplo de Referencia)

5 En el Ejemplo 1, dos cultivos en matraz de agitación que contienen medio 1 se inoculan en paralelo con un clon de CHO productor de mAb1. Los cultivos en matraz de agitación se incuban en una incubadora de dióxido de carbono a 37°C. El día 3, un matraz de agitación se transfiere a una incubadora de dióxido de carbono a 33°C. Ambos matraces de agitación se alimentan de manera similar con dos soluciones de alimentación. La alimentación se complementó de acuerdo con un programa fijo, con la adición de 0,4% de la primera solución de alimentación (Tabla 2) y 2% de la segunda alimentación (Tabla 3) por día comenzando el día 5 y durando hasta el final del cultivo.

10 El desplazamiento de temperatura a 33°C permite un mantenimiento más prolongado de la densidad de células viables y la viabilidad del cultivo con el tiempo (Fig.3 y 4) y el logro de un título de producto más alto (Fig. 5), en comparación con el cultivo que se mantiene a 37°C durante toda la duración del experimento. Este ejemplo ilustra el beneficio de implementar un desplazamiento de temperatura a 33°C durante un procedimiento de producción de cultivo celular basado en una línea de células huésped CHO.

15 Ejemplo 2

20 En este ejemplo, un biorreactor de 300 L que contiene medio 2 se inocula con un clon CHO productor de mAb2. El día 5, la temperatura del biorreactor se desplaza de 36,5°C a 33°C. El punto de ajuste de pH es 6,90 y la banda muerta es 0,10. Como resultado, el cultivo comienza a pH 7,00, el pH desciende a 6,80 entre el día 2 y el día 4, y luego regresa progresivamente a 7,00 debido al consumo de ácido láctico por parte de las células (Fig. 6). El desplazamiento a pH 6,80 permite reducir la adición de base en comparación con un escenario con un pH constante de 7,00. El retorno a pH 7,00 permite reducir la concentración de CO₂ en el medio en comparación con un escenario en donde el pH se deja en 6,80 después del primer desplazamiento. En este procedimiento que combina desplazamientos de temperatura y pH, se alcanza una alta densidad de células viables y se minimiza la disminución de la densidad de células viables a lo largo del tiempo (Fig.7), permitiendo alcanzar el día 14 un título alto (Fig.8) de producto. de calidad adecuada. La alimentación se aplica de manera similar al Ejemplo 1.

Ejemplo 3 (Ejemplo de Referencia)

30 En este ejemplo, se llevan a cabo tres procesos de cultivo por lotes alimentados independientes en un biorreactor de vidrio utilizando un clon de células CHO productor de mAb3 y medio 2 (véase la Tabla 1). Se aplica de nuevo el esquema de alimentación del Ejemplo 1. Dos cultivos independientes incluyen un desplazamiento de temperatura sin un desplazamiento de pH adicional, es decir, el pH en ambos cultivos celulares se mantiene a un valor de pH 7,0 a lo largo de todo el cultivo. El tercer experimento de cultivo difiere de los dos primeros experimentos.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende cultivar células CHO en un medio y expresar el polipéptido recombinante, en el que
- 5 - las células se cultivan a una primera temperatura durante al menos 3 días y la temperatura se desplaza a una segunda temperatura que es entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8°C más baja que la primera temperatura y las células se mantienen a dicha segunda temperatura durante un periodo de al menos otros 2 días;
- 10 - las células se cultivan a un primer valor de pH durante al menos 2 días y luego el pH se desplaza a un segundo valor de pH que es entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1 unidad de pH más bajo que el primer pH y las células se cultivan a dicho segundo valor de pH durante al menos 1 día, en el que el desplazamiento de temperatura se inicia entre 1 y 5 días después del desplazamiento de pH.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH se cambia activamente entre dicho primer y dicho segundo valor de pH.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH se cambia pasivamente entre dicho primer y dicho segundo valor de pH.
- 25 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera temperatura está en el intervalo de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 38°C.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la segunda temperatura está en el intervalo de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el valor de pH está en el intervalo de entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,5.
- 35 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo valor de pH está en el intervalo de entre aproximadamente pH 6,0 y aproximadamente pH 7,1.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho segundo pH se mantiene activamente hasta el final del cultivo.
- 40 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el primer desplazamiento de pH es seguido por un segundo desplazamiento de pH después de al menos 1 día, siendo el tercer valor de pH de aproximadamente 0,05 unidades de pH a aproximadamente 1 unidad de pH más alto que el segundo valor de pH.
- 45 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el pH se cambia activamente de dicho segundo a dicho tercer valor de pH.
- 50 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el pH se cambia pasivamente de dicho primer a dicho tercer valor de pH.
- 55 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio está libre de proteínas y de suero y se caracteriza por un contenido total de aminoácidos de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 mM.
- 60 13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo se realiza en modo de alimentación por lotes que comprende alimentar al menos dos soluciones nutrientes que se añaden al cultivo.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que una de las soluciones de alimentación añadidas al medio de cultivo es una alimentación que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la alimentación comprenda el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina en concentraciones respectivas en el intervalo de aproximadamente 6,5 g/l y aproximadamente 8,0 g/l y en el intervalo de aproximadamente 9 g/l y aproximadamente 11 g/l. en una solución acuosa a un pH de carácter básico por encima de 10.
16. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, en el que la cantidad de la solución de alimentación que comprende cistina y tirosina se añade al medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,8% en peso del peso del medio de cultivo inicial por día.

17. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido producido está glicosilado.

5 18. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Fig. 1

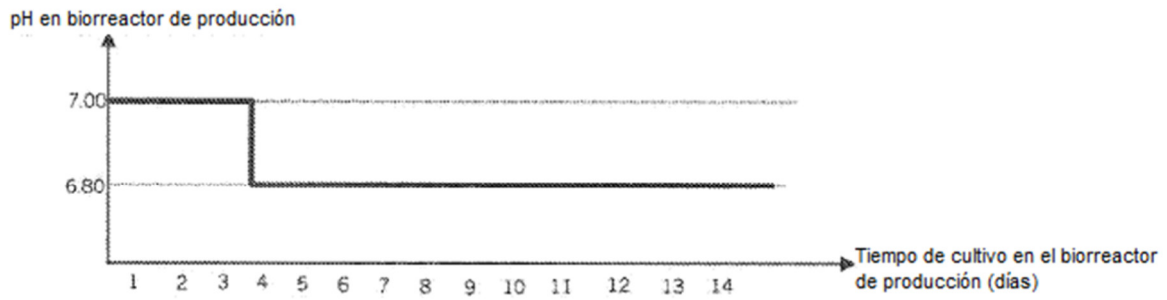


Fig. 2A

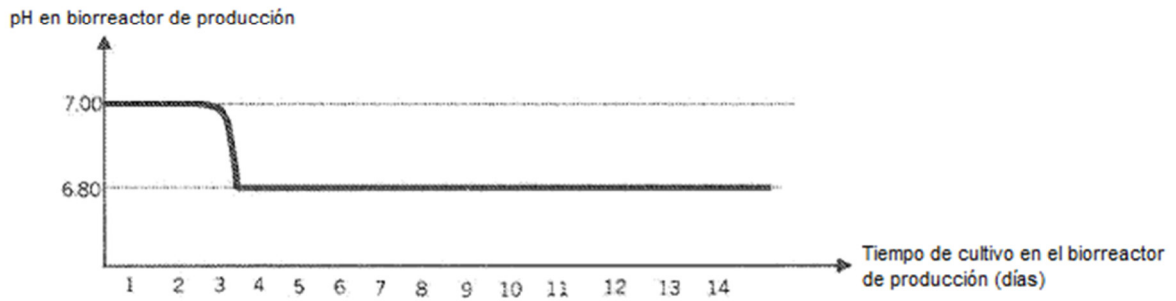


Fig. 2B

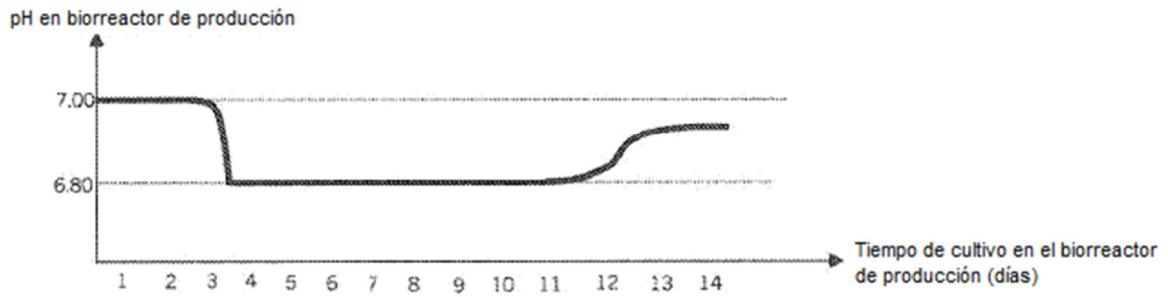


Fig. 2C

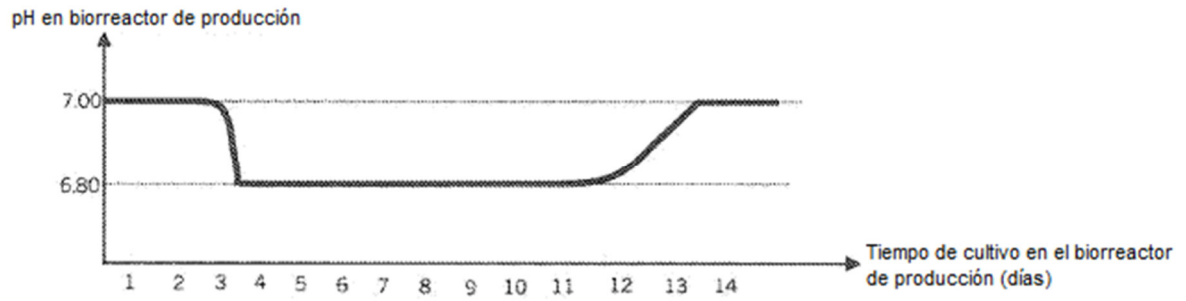


Fig. 3

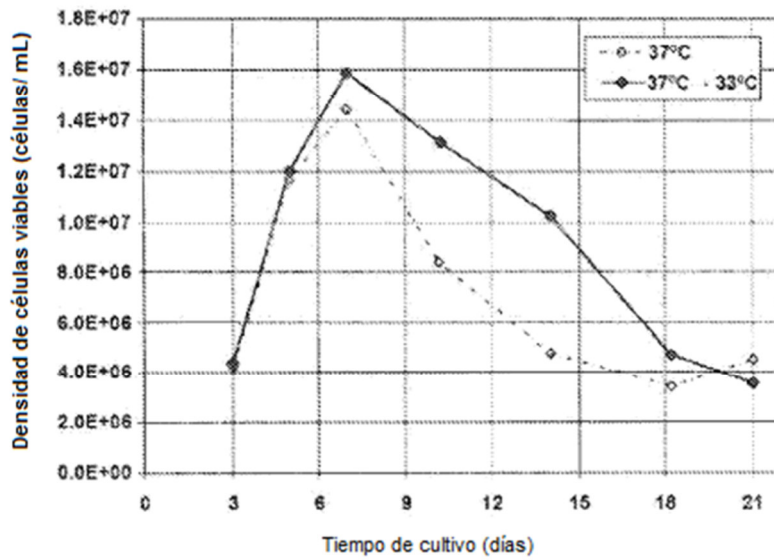


Fig. 4

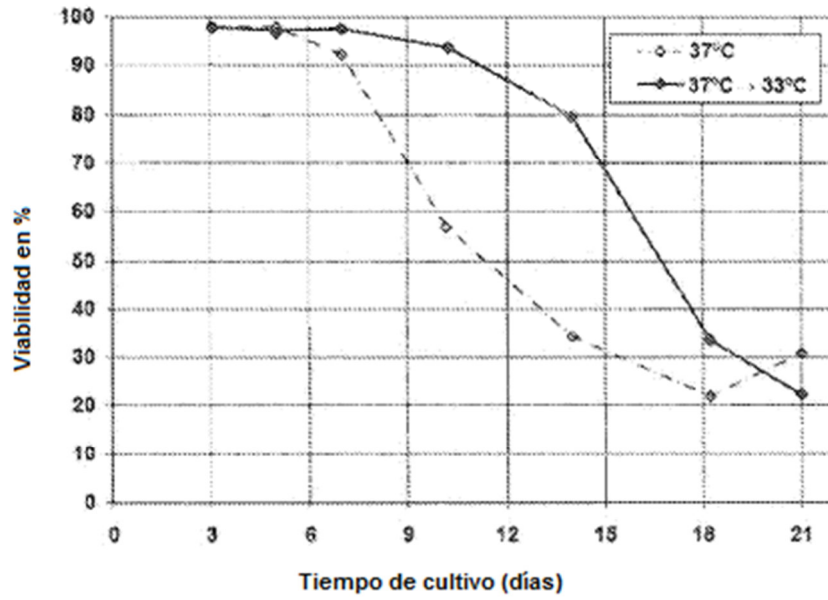


Fig. 5

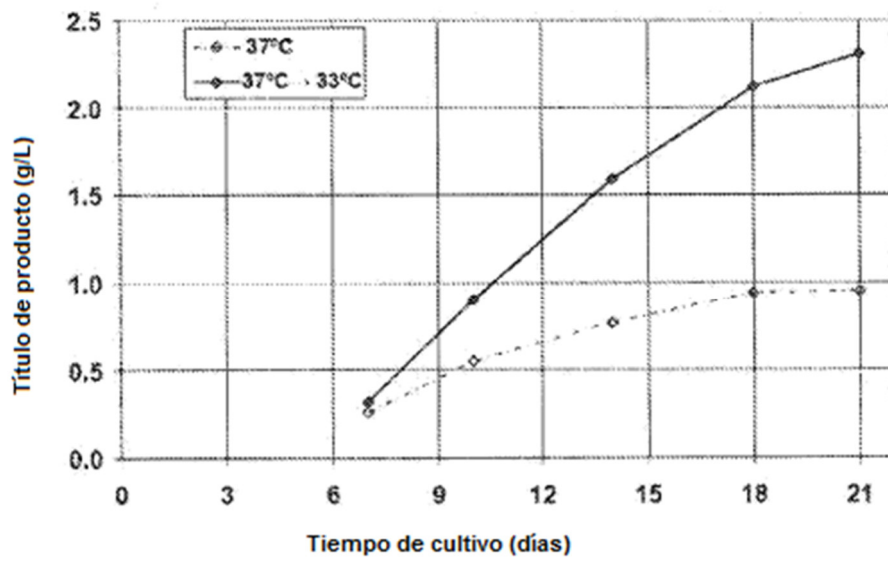


Fig. 6

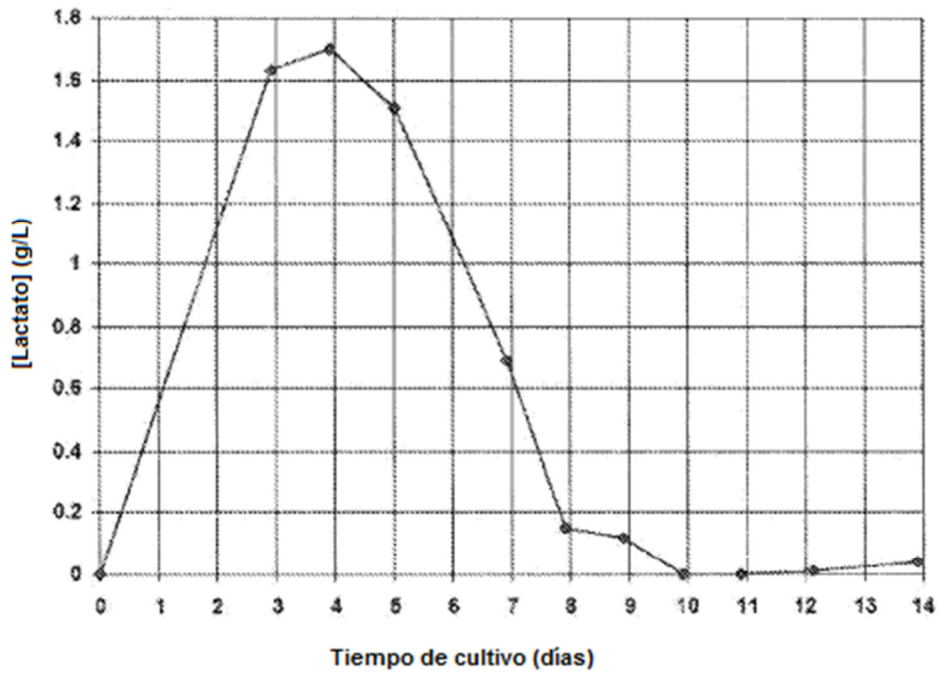


Fig. 7

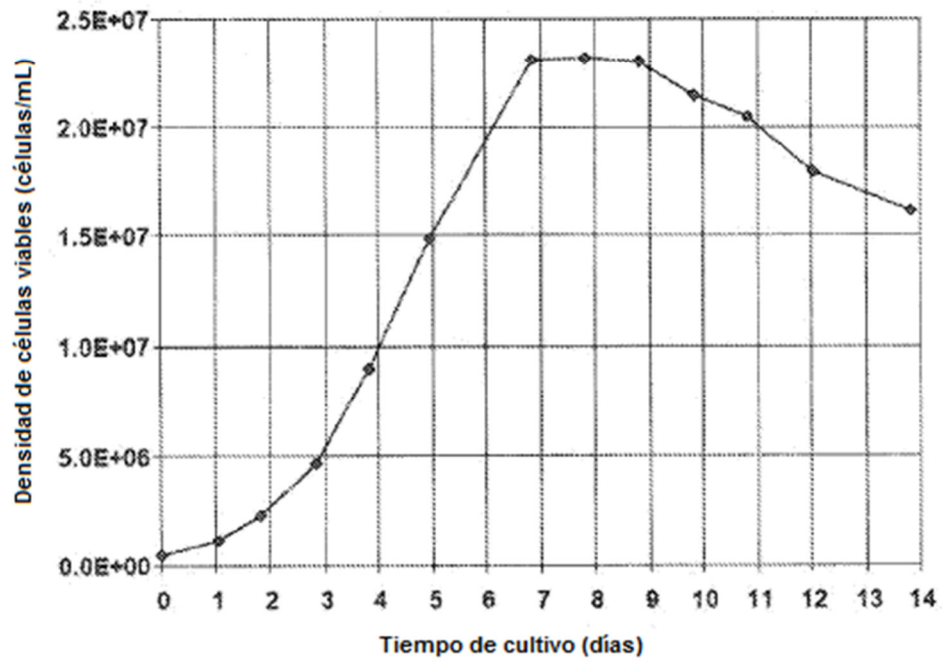


Fig. 8

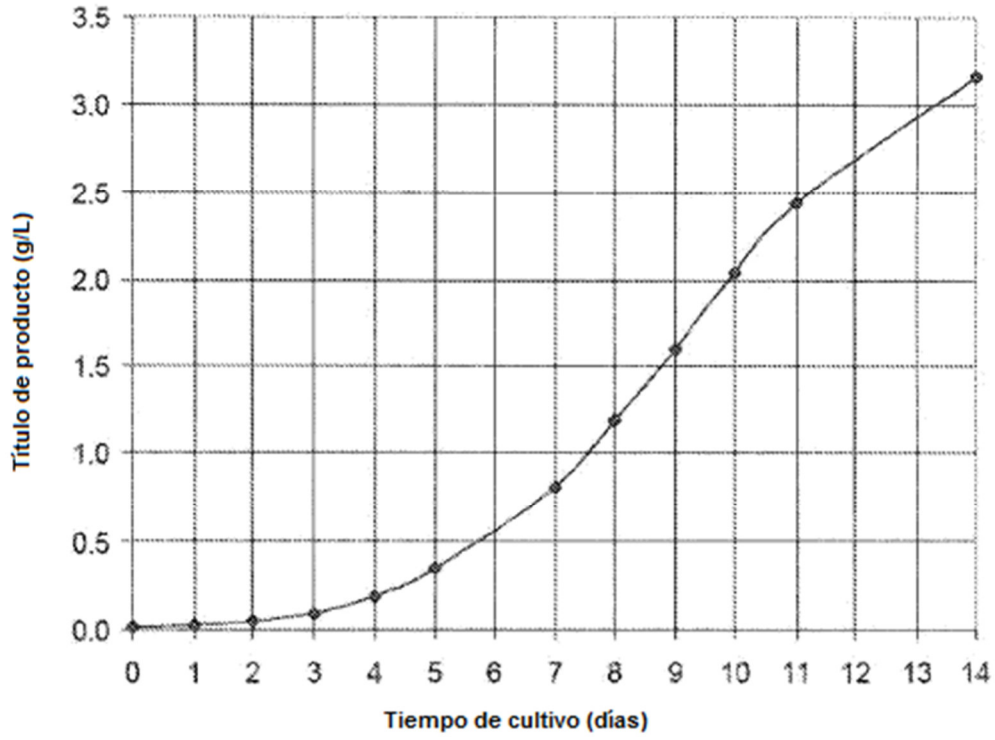
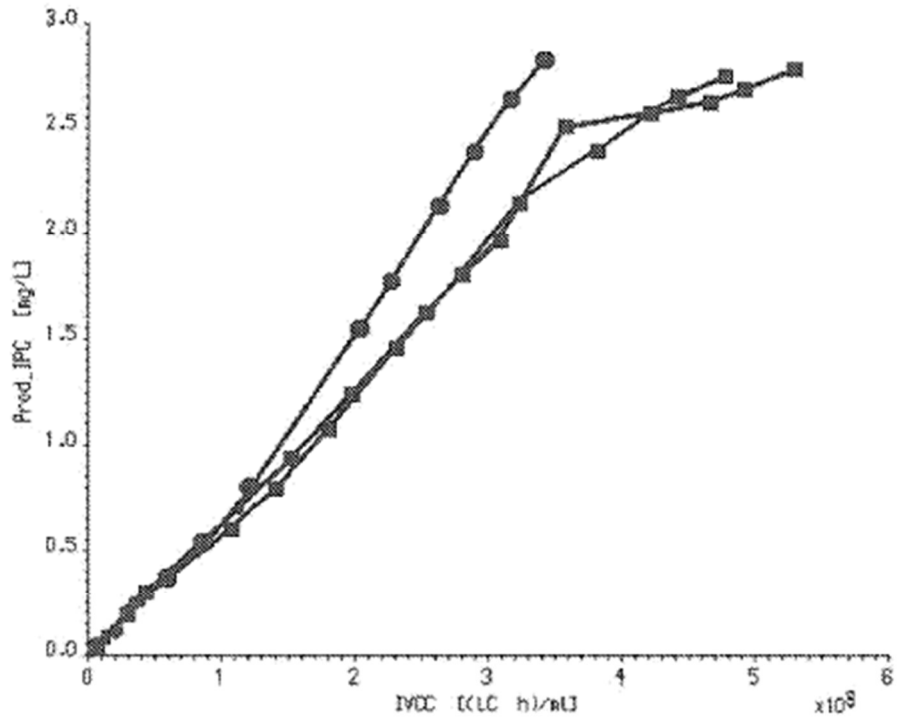


Fig. 9



- Experimento 1 (con desplazamiento de pH)
- Experimento 2 (sin desplazamiento de pH)
- ▲ Experimento 3 (sin desplazamiento de pH)