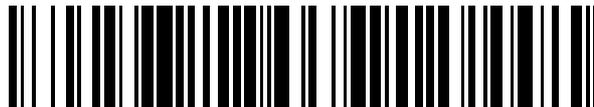


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 701**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08769409 .7**

96 Fecha de presentación: **09.05.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2152856**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **Medios de alimentación mejorados**

30 Prioridad:

**11.05.2007 US 917569 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**13.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**13.12.2012**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)  
ONE AMGEN CENTER DRIVE  
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**MORRIS, ARVIA, ELEANOR;  
VIAJE, AURORA, VILLEGAS y  
PINEDA, ERIKA**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

ES 2 392 701 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**

Medios de alimentación mejorados

**5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

La presente invención reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Nº 60/917.569, presentada el 11 de mayo del 2007.

**10 Campo de la invención**

La invención se encuentra en el campo de los medios y métodos de cultivo celulares.

**Antecedentes de la invención**

15

Los cultivos de alimentación discontinua a gran escala de células de mamífero, especialmente células de Ovario de Hámster Chino (CHO), se utilizan ampliamente para producir proteínas usadas en diversas aplicaciones, tales como para el uso en diagnósticos, terapia e investigación. Se ha prestado una particular atención a las células CHO porque se han caracterizado de manera extendida y las agencias reguladoras han autorizado su uso en la

20 fabricación clínica. Tales cultivos se conservan normalmente durante días, o incluso semanas, al mismo tiempo que las células producen la proteína (o proteínas) deseada. Durante este tiempo, el cultivo puede complementarse con un medio de alimentación que contenga componentes, tales como nutrientes y aminoácidos, que se consumen durante el cultivo. Se ha demostrado que dicha alimentación mejora la producción de proteínas a través de un cultivo de células de mamífero. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.672.502. Incluso, mejoras

25 incrementales en la producción de proteínas pueden ser valiosas, dado el gasto y la dificultad de desarrollar y obtener autorización regulatoria para instalaciones de cultivo comercial a gran escala.

En procedimientos de cultivo de alimentación discontinua frecuentemente se usan medios de alimentación concentrados para mejorar la valoración de las proteínas, el crecimiento y/o la viabilidad celular. Algunos

30 componentes presentes a alta concentración en los medios de alimentación pueden precipitar durante la conservación, especialmente cuando el pH del medio es casi neutro. La precipitación de los componentes del medio durante el almacenamiento antes del uso de un medio es muy indeseable debido a que esto añade un elemento de incertidumbre. Cuando los componentes del medio precipitan, se desconocerá la concentración de los componentes del medio en solución, frente a la concentración en el precipitado. Dado que las concentraciones de diversos

35 componentes del medio pueden influir en la cantidad y calidad de una proteína producida por un cultivo, esto es un elemento de incertidumbre que es muy indeseable en un procedimiento de cultivo comercial, en el que las condiciones de cultivo se controlan, óptimamente, de manera escrupulosa. Además, los procedimientos comerciales pueden someterse a una revisión reguladora rigurosa. Por tanto, medios de alimentación con altas concentraciones de aminoácidos que puedan conservarse durante un período de tiempo sin precipitar, proporcionarían ventajas

40 significativas.

El documento WO 03/10661 describe un medio de cultivo celular para el cultivo de células de mamífero.

**Explicación de la invención**

45

La invención proporciona medios de alimentación estables que contienen piruvato, métodos que, para estabilizar los medios de alimentación, comprenden añadir piruvato a un medio, métodos para el uso de medios de alimentación estables y proteínas producidas por cultivos alimentados con un medio de la invención.

50 En una realización, la invención incluye un método para estabilizar un medio de alimentación concentrado para su uso en la alimentación de un cultivo de células de mamífero que comprende añadir al medio de alimentación piruvato a una concentración de al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mM, en el que el medio de alimentación puede comprender cisteína y/o cistina, en el que la suma de las concentraciones de cisteína y/o cistina puede ser de al menos aproximadamente 7,9 mM, en el que el pH del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 5,8

55 a aproximadamente 7,4, en el que el medio de alimentación puede comprender tirosina a una concentración de no más de aproximadamente 4,4 mM y en el que el medio puede ser estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 1, 2 ó 3 semanas. El piruvato puede ser piruvato sódico. El pH del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2 y/o de al menos aproximadamente 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 ó 6,8 y no más de aproximadamente 7,4. El medio de alimentación puede comprender cisteína a una concentración de al

60 menos aproximadamente 5,0, 6,0, 7,0, 12,0, 21,0, 35,0, 40,0 ó 45,0 mM y/o una concentración de cistina de al menos aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ó 4,0 mM. El medio de alimentación puede comprender una concentración de cisteína de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 16 mM o de aproximadamente 7,5 mM a aproximadamente 13 mM. El medio de alimentación puede comprender tirosina a una concentración de al menos aproximadamente 2, 3 ó 4 mM. El medio de alimentación puede comprender un hidrolizado de proteína y puede ser

65 aséptico. La osmolaridad del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente

1300 mOsm, de aproximadamente 250 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm, de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 500 mOsm, de aproximadamente 500 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm, de aproximadamente 700 a aproximadamente 900 mOsm, de aproximadamente 270 mOsm a aproximadamente 900 mOsm, de aproximadamente 300 mOsm a aproximadamente 830 mOsm, o de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 400 mOsm. El cultivo de células de mamífero puede contener células CHO.

En otra realización, la invención proporciona un método para estabilizar un medio de alimentación que comprende añadir piruvato a un medio de alimentación a una concentración de aproximadamente 30 a 40 mM que puede comprender (a) una concentración de tirosina de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 4,0 mM y (b) una concentración de cisteína de al menos aproximadamente 12 mM y que no comprenda cistina, y en el que el pH del medio de alimentación sea de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4. El pH puede ser de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,4 y/o de al menos aproximadamente 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 ó 6,8 y no más de aproximadamente 7,4. El medio de alimentación puede ser estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 2, 3 ó 4 semanas.

En una realización adicional, la invención comprende un medio de alimentación para un cultivo de células de mamífero que puede comprender piruvato a una concentración de al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 mM y una concentración de cisteína de al menos aproximadamente 5 mM, en el que el pH del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4, en el que el medio de alimentación puede comprender tirosina a una concentración de no más de aproximadamente 4,4 mM, y en el que el medio puede ser estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 1, 2 ó 3 semanas. El piruvato puede ser piruvato sódico. El pH del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2 y/o al menos de aproximadamente 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 ó 6,8 y no más de aproximadamente 7,4. El medio de alimentación también puede comprender una concentración de cisteína de al menos aproximadamente 6, 7, 12, 21, 35, 40 ó 45 mM y puede comprender o no cistina (por ejemplo, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 o 4,0 mM) y la suma de las concentraciones de cisteína y cistina es de al menos aproximadamente 7,9 mM. El medio de alimentación puede comprender tirosina, opcionalmente a una concentración de al menos aproximadamente 2, 3, 4 o 4,2 mM. El medio de alimentación puede comprender un hidrolizado de proteína y puede ser asérico. La osmolaridad del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 1300 mOsm, de aproximadamente 250 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm, de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 500 mOsm, de aproximadamente 500 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm, de aproximadamente 700 mOsm a aproximadamente 900 mOsm, de aproximadamente 270 mOsm a aproximadamente 900 mOsm, de aproximadamente 300 mOsm a aproximadamente 830 mOsm o de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 400 mOsm. El cultivo de células de mamífero puede ser un cultivo de células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

En una realización adicional, la invención incluye un medio de alimentación para un cultivo de células CHO, que puede comprender (1) una concentración de tirosina de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 4,0 mM, (2) cisteína y/o cistina, en el que la suma de las concentraciones de cisteína y/o cistina sea de al menos aproximadamente 7,9 mM y (3) piruvato a una concentración de aproximadamente 30 a 40 mM, en el que el pH del medio de alimentación puede ser de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4 o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,4. El medio de alimentación puede ser estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 1, 2, 3 ó 4 semanas.

En otras realizaciones, la invención proporciona diversos métodos de utilización de los medios de alimentación de la invención. En la presente memoria se describe un método para el cultivo de células que comprende cultivar las células en un medio de base y alimentar el cultivo con un medio de alimentación de la invención. También se describe un método para producir una proteína que comprende cultivar células de mamífero que produzcan la proteína en un medio de base, alimentar el cultivo con un medio de alimentación de la invención y recuperar la proteína del medio de cultivo. La proteína puede ser una proteína recombinante y puede purificarse. El medio de base usado en el cultivo puede ser asérico y las células pueden cultivarse al menos en una fase de crecimiento y al menos en una fase de producción. En otro aspecto incluso, se describe un método para aumentar la producción de una proteína producida por las células de mamífero cultivadas, que pueden ser células CHO, que comprende alimentar las células cultivadas con un medio de alimentación de la invención. La alimentación puede producirse una o más veces durante el cultivo y puede ajustarse para mantener determinados componentes del cultivo dentro de determinados intervalos de concentración.

En la presente memoria también se describe una proteína producida por cualquiera de los métodos de la invención.

## 60 Breve descripción de los dibujos

**Figura 1:** las barras indican las valoraciones de proteína a los 8 días (izquierda) o 10 días (derecha) del cultivo. Las células son células CHO que producen una proteína recombinante. Las células se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1 y se alimentaron con un medio de alimentación como se describe en el Ejemplo 1 y en la Tabla 2.

65

**Figura 2A:** esta figura esta figura se creó usando los datos de 21 días descritos en el Ejemplo 4 y en la Tabla 5 y usando el programa informático JMP® (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte). La fila superior de los cinco recuadros muestra la probabilidad de no tener precipitado "P (día 21 = 0)", y la fila inferior de los cinco recuadros muestra la probabilidad de tener precipitado "P (día 21 = 1)" en el día 21. En el eje vertical y, 1,00 significa 100% de probabilidad y 0,00 significa cero probabilidad. En cada recuadro, las líneas de puntos verticales indican la concentración a la cual se establece el componente en el medio o la temperatura de conservación indicado debajo de cada columna vertical de dos recuadros en las otras columnas de recuadros. En la columna de dos recuadros directamente sobre el componente o la temperatura marcados, la concentración del componente o la temperatura varía en el intervalo mostrado a lo largo del eje x debajo de cada columna vertical de dos recuadros. Las concentraciones indicadas a lo largo del eje x se expresan en unidades milimolares y las temperaturas se expresan en grados centígrados. Por ejemplo, en todos los recuadros, salvo en los dos en los que directamente se indica "piruvato sódico", el piruvato sódico se establece a 34,65 mM. En estos dos recuadros, el piruvato sódico varía de aproximadamente 5 mM a casi 35 mM.

**Figura 2B:** esta figura es la misma que la Figura 2A excepto que el piruvato sódico se establece a 4,9 mM en todas las columnas excepto en la marcada como "piruvato sódico".

**Figura 3A:** esta figura se realizó usando los datos de 21 días descritos en el Ejemplo 5 y en la Tabla 6 usando el programa informático JMP® (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte). Es similar a la Figura 2A, aunque las concentraciones exactas a las cuales se establecen los diversos componentes del medio (marcadas directamente sobre el nombre del componente del medio) difieren algo. El piruvato sódico se establece a 35,11 mM en todas las columnas a excepción de la columna más a la derecha, en la que la concentración del piruvato sódico varía.

**Figura 3B:** esta figura es como la Figura 3A excepto que el piruvato sódico se establece a una concentración de 4,54 mM en todas las columnas a excepción de la columna más a la derecha en la que la concentración del piruvato sódico varía.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona medios de alimentación concentrados para su uso en cultivos de alimentación discontinua de células eucariotas, opcionalmente de mamífero, que pueden ser solubles a temperatura ambiente y pueden conservarse, sin precipitación, durante un tiempo razonable. Para su uso en cultivos de células de mamífero, un medio de alimentación puede tener un pH de tal manera que, cuando se añada al cultivo, no llevará al cultivo fuera un intervalo fisiológico, por ejemplo, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Estos medios de alimentación concentrados, estables, pueden contener altas concentraciones de aminoácidos tales como cisteína y/o tirosina y/o altas concentraciones de piruvato. La invención contribuye así a procedimientos de cultivo de células funcionalmente más ventajosos y sólidos. Los medios de alimentación de la invención son particularmente útiles para cultivos comerciales, a gran escala, de células de mamífero que producen una proteína recombinante, que pueden usarse, por ejemplo, como un reactivo terapéutico, de diagnóstico o de investigación. El medio de alimentación de la invención puede conservarse a temperatura ambiente o a una temperatura de enfriamiento.

El término "**estable**", como se usa en la presente memoria, se refiere a un medio que no precipita después de conservarse durante al menos un período de tiempo especificado, tal como al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. El medio puede conservarse, por ejemplo, a temperatura ambiente (que es de 15-30 °C, como se entiende en la presente memoria) o a una temperatura de enfriamiento (que es de 4-8 °C, como se entiende en la presente memoria). De manera similar, cuando se dice que un medio se ha "**estabilizado**" durante cierto periodo de tiempo, significa que los solutos presentes en el medio no forman un precipitado y aparecen en solución.

"**Piruvato**" incluye la forma libre del ácido pirúvico así como sales ácidas, incluyendo piruvato sódico y otras sales ácidas.

Un "**medio de base**", como se entiende en la presente memoria, es un medio que se usa para el cultivo de células eucariotas que, en sí mismo, se usa directamente para cultivar las células y que no se usa como un aditivo para otros medios, aunque a un medio de base pueden añadirse diversos componentes. Por ejemplo, si se cultivasen células CHO en medio DMEM, un medio bien conocido, disponible en el mercado, para células de mamífero, y periódicamente se alimentase con glucosa o con otros nutrientes, el medio DMEM podría considerarse como el medio de base.

Un "**medio de alimentación**" es un medio que usa como un alimento en un cultivo de células eucariotas, que pueden ser células de mamífero. Al igual que un medio de base, un medio de alimentación se diseña teniendo en cuenta las necesidades de las células particulares que vayan a cultivarse. Por tanto, un medio de base puede usarse como una base para diseñar un medio de alimentación. Como se describe a continuación con más detalle, un medio de alimentación puede tener mayores concentraciones de la mayoría, pero no de todos, los componentes de un medio de cultivo de base. Por ejemplo, en un medio de base, algunos componentes, tales como, por ejemplo,

- nutrientes, incluyendo aminoácidos o carbohidratos, pueden tener concentraciones de aproximadamente 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X o incluso aproximadamente 1000X de sus concentraciones normales. Algunos componentes, tales como sales, pueden mantenerse a aproximadamente 1X de la concentración del medio de base, como se podría mantener la isotonicidad de la alimentación con el medio
- 5 de base. Componentes no utilizados normalmente como nutrientes en medios podrían no estar presentes generalmente a concentraciones aumentadas en medios de alimentación. Por lo tanto, algunos componentes se añaden para mantener la alimentación fisiológica y algunos se añaden porque son nutrientes de reabastecimiento para el cultivo.
- 10 Una **“proteína recombinante”** es una proteína resultante del procedimiento de modificación por ingeniería genética. Las células se han **“modificado por ingeniería genética”** para expresar una proteína específica cuando las secuencias de ácido nucleico recombinante que permiten la expresión de la proteína se han introducido en las células usando métodos de **“modificación por ingeniería genética”**, tales como infección viral con un virus recombinante, transfección, transformación o electroporación. Véase, por ejemplo, Kaufman et al (1990), Meth.
- 15 *Enzymol.* 185:487-511; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds (Wiley & Sons, Nueva York, 1988 y actualizaciones trimestrales). La expresión **“modificación por ingeniería genética”** se refiere a un método de ARN o ADN recombinante usado para crear una célula hospedadora que exprese un gen a niveles elevados o a niveles reducidos, o que exprese una forma mutante del gen. En otras palabras, la célula se ha transfectado, transformado o transducido con una molécula polinucleotídica recombinante y por lo tanto se ha modificado para
- 20 hacer que la célula modifique la expresión de una proteína deseada. Los métodos de **“modificación por ingeniería genética”** también incluyen numerosos métodos que incluyen, pero sin limitación, la amplificación de ácidos nucleicos usando la reacción en cadena de la polimerasa, el ensamblaje de moléculas de ADN recombinante clonándolas en *Escherichia coli*, la digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción, el ligamiento de ácidos nucleicos y la transferencia de bases a los extremos de los ácidos nucleicos, entre otros numerosos métodos bien
- 25 conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Para expresar una proteína de interés, los expertos en la materia conocen bien métodos y vectores para modificar por ingeniería genética células y/o líneas de células. Las técnicas de modificación por ingeniería genética incluyen, pero sin limitación, vectores de expresión, recombinación homóloga dirigida y activación (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.272.071 de Chappel) y transactivación
- 30 de genes por factores de transcripción diseñados (véase, por ejemplo, Segal et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(6): 2758-63). Opcionalmente, las proteínas se expresan bajo el control de un elemento de control heterólogo tal como, por ejemplo, un promotor que en la naturaleza no dirige la producción de esa proteína. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor viral fuerte (por ejemplo, CMV, SV40) que dirige la expresión de una proteína de mamífero. La célula hospedadora puede producir normalmente o no la proteína. Por ejemplo, la célula hospedadora
- 35 puede ser una célula CHO que se ha modificado por ingeniería genética para producir una proteína humana, lo que significa que el ácido nucleico que codifica la proteína humana se ha introducido en la célula CHO. Alternativamente, la célula hospedadora puede ser una célula humana que se ha modificado por ingeniería genética para producir niveles aumentados de una proteína humana normalmente solo presente a niveles muy bajos (por ejemplo, reemplazando el promotor endógeno con un promotor viral fuerte).
- 40 Las proteínas **“sustancialmente similares”** tienen una identidad entre sí de al menos aproximadamente un 90% en la secuencia de aminoácidos y mantienen o alteran, de una manera deseable, la actividad biológica de la proteína no alterada. Como se conoce en la técnica, los cambios en los aminoácidos conservados influyen más probablemente en la función biológica de una proteína. Adicionalmente, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos
- 45 conservativas, en cualquier sitio en una proteína, produzcan cambios funcionales que las sustituciones no conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas, que es poco probable que influyan en la actividad biológica incluyen, sin limitación, las siguientes: Ala por Ser, Val por Ile, Asp por Glu, Thr por Ser, Ala por Gly, Ala por Thr, Ser por Asn, Ala por Val, Ser por Gly, Tyr por Phe, Ala por Pro, Lys por Arg, Asp por Asn, Leu por Ile, Leu por Val, Ala por Glu, Asp por Gly y estos cambios en sentido inverso. Véase, por ejemplo, Neurath et al., The
- 50 Proteins, Academic Press, Nueva York (1979). Además, para los fines de la invención, se considerará que son sustituciones conservativas los cambios de aminoácidos entre miembros de los seis grupos de aminoácidos siguientes. Los grupos son: 1) metionina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cisteína, serina, treonina, asparagina y glutamina; 3) aspartato y glutamato; 4) histidina, lisina y arginina; 5) glicina y prolina; y 6) triptófano, tirosina y fenilalanina. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el
- 55 paquete informático Wisconsin del Grupo Genetics Computer (GCG; Madison, WI), 'GAP' (Devereux et al (1984), *Nucl. Acidos Res.* 12:387) u otros programas informáticos comparables. Los parámetros preferidos por defecto para el programa 'GAP' incluyen: (1) la matriz de comparación ponderada de aminoácidos de Gribskov y Burgess (1986), *Nucl. Acids Res.* 14:6745, como describen Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358 (1979), u otras matrices de comparación comparables;
- 60 (2) una penalización de 8 por cada hueco y una penalización adicional de 2 por cada símbolo en cada hueco para las secuencias de aminoácidos; (3) ninguna penalización para huecos en los extremos y (4) ninguna penalización máxima para huecos alargados.

El cultivo de alimentación discontinua es un método de cultivo llevado a la práctica ampliamente para la producción a gran escala de proteínas de células de mamífero. Véase, por ejemplo, Chu y Robinson (2001), *Current Opin.*

Biotechnol. 12:180-87. Un cultivo de alimentación discontinua de células de mamífero es un cultivo en el que el cultivo se alimenta, de manera continua o periódica, con un medio de alimentación que contiene nutrientes. La alimentación puede producirse sobre un programa predeterminado, por ejemplo, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, etc. Alternativamente o adicionalmente, el cultivo puede controlarse con respecto a los componentes específicos del medio, por ejemplo, glucosa y/o glutamina y/o cualquier aminoácido y las alimentaciones pueden ajustarse de tal manera que se mantengan uno o más de estos componentes dentro de un intervalo deseado. Cuando se compara con un cultivo discontinuo, en el que no se produce alimentación, un cultivo de alimentación discontinua puede producir mayores cantidades de proteína. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.672.502.

10

Generalmente, un medio de alimentación de la invención contendrá nutrientes que se agotarán durante el cultivo celular. Típicamente, un medio de alimentación de la invención contendrá la mayoría de los componentes de un medio de cultivo celular de base de mamífero típico, pero con algunos componentes, tales como aquellos generalmente considerados como nutrientes, a altas concentraciones para impedir la excesiva dilución del cultivo. Particularmente en cultivos usados para la producción de proteínas, es ventajoso aumentar lo menos posible el volumen del cultivo con medios de alimentación para maximizar la cantidad de proteína producida por volumen unitario. A gran escala, un incremento, por ejemplo, del cincuenta por ciento en volumen, puede crear problemas de manipulación significativos. Un medio de alimentación de la invención puede contener muchos de los aminoácidos encontrados en un medio de cultivo pero, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X o incluso aproximadamente 1000X de su concentración usual en un medio de base. Los aminoácidos pueden incluir alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, cistina, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Como se indica en este documento, dichos aminoácidos son los estereoisómeros "L" normalmente encontrados en la naturaleza, en lugar de estereoisómeros "D", que normalmente no se encuentran en los sistemas vivos terrestres. Por ejemplo, la "cisteína" se refiere a la L-cisteína en lugar de a la D-cisteína. Al medio de alimentación de la invención también pueden añadirse carbohidratos tales como glucosa o manosa, galactosa, fructosa, sacarosa o glucosamina, etc. o puede añadirse un cultivo por separado. Las vitaminas, proteínas, suero, agentes tamponantes, sales e hidrolizados de soja, caseína y levadura pueden o no formar parte de un medio de alimentación de la invención. Estos medios de alimentación pueden ser asépticos. Los medios de alimentación de la invención pueden contener, o no, factores de crecimiento, tales como IGF-I o insulina. Los medios de alimentación de la invención pueden ser aprotéicos y/o definirse químicamente, es decir, ser aprotéicos, no contener hidrolizados y asépticos.

Con respecto a las sales, tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, la concentración usada en un medio de alimentación de la invención puede calcularse de tal manera que la osmolaridad del cultivo no esté fuera de un intervalo óptimo de desde aproximadamente 270 mOsm a aproximadamente 550 mOsm o de aproximadamente 270 mOsm a aproximadamente 450 mOsm. En algunas realizaciones, la osmolaridad del cultivo puede variar de aproximadamente 250 mOsm a aproximadamente 650 mOsm, o de aproximadamente 260 mOsm a aproximadamente 600 mOsm. El propio medio de alimentación puede tener un intervalo de osmolaridad más amplio ya que se diluye después de la adición al cultivo. Por tanto, un medio de alimentación puede tener una osmolaridad de desde aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 1300 mOsm, de aproximadamente 250 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm, de aproximadamente 500 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm, de aproximadamente 700 mOsm a aproximadamente 900 mOsm, de aproximadamente 270 mOsm a aproximadamente 900 mOsm, de aproximadamente 300 mOsm a aproximadamente 830 mOsm, de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 500 mOsm, o de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 400 mOsm. La adición de un hidrolizado proteico a un medio de alimentación puede contribuir a una mayor osmolaridad. Algunas sales pueden omitirse por completo de un medio de alimentación. Por tanto, durante el cultivo celular generalmente son los nutrientes (tales como aminoácidos y carbohidratos) los que se consumen, en lugar de las sales, tampones o protectores de cizalla, que están presentes en altas concentraciones en un medio de alimentación.

50

Las células de mamífero, que generalmente crecen en cultivos, pueden cultivarse a pH casi neutros, tal como a un pH de aproximadamente 6,5 a un pH de aproximadamente 7,5. Por tanto, aunque los medios de alimentación de la invención pueden estar algo fuera de este intervalo, la adición del medio de alimentación preferentemente no llevará al pH de todo el cultivo fuera de este intervalo. Por tanto, los medios de alimentación pueden tener un pH de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 8,0, o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,8, o de aproximadamente 6,1 a aproximadamente 7,5, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,4, de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4, o de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2. En algunas realizaciones, el pH de un medio de alimentación puede ser de aproximadamente 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 ó 7,2.

La mayoría de los componentes de un medio de alimentación de cultivo de células de mamífero comúnmente usados son fácilmente solubles en agua. Sin embargo, algunos aminoácidos tienen solubilidad limitada en agua. Por ejemplo, la L-cistina, una forma oxidada de cisteína con frecuencia utilizada en medios de cultivo, es soluble a una concentración de hasta únicamente 0,112 g/l en agua a 25 °C, y la L-tirosina es soluble a una concentración de hasta únicamente 0,045 g/100 g de agua (equivalente a 0,45 g/l) a 25 °C. THE MERCK INDEX, duodécima Ed., Budavari et al., eds., Merck & Co., Inc., 1996, páginas 471 y 9.971. En soluciones acuosas neutras o ligeramente

65

alcalinas la cisteína se oxida de inmediato para formar cistina. Referencia anterior, páginas 470-71. Por tanto, aún cuando la propia cisteína, sea fácilmente soluble en agua, puede contribuir a la insolubilidad y/o precipitación de un medio en su forma oxidada, la cistina. La tirosina es soluble en soluciones alcalinas y la cistina es bastante soluble en soluciones por debajo de un pH de 2 o por encima de un pH de 8. Referencia anterior, páginas 470 y 9971. Dado que un medio de alimentación tiene generalmente un pH casi neutro, de acuerdo con los requisitos de las células de mamífero, incluso concentraciones moderadas de tirosina y/o de cistina pueden presentar problemas con la estabilidad del medio. Adicionalmente, dado que en presencia de aire la cisteína puede oxidarse a cistina en una solución neutra, la cisteína puede ocasionar precipitación, aun cuando la propia cisteína sea bastante soluble en soluciones acuosas. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos que estabilicen los medios de alimentación, que con frecuencia contienen altas concentraciones de aminoácidos tales como cistina, tirosina y cisteína y tienen un pH aproximadamente neutro.

La concentración de piruvato usada en los medios de alimentación y en los métodos de la invención puede ser al menos aproximadamente de 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 mM de piruvato y no más de aproximadamente 40, 45, 50, 100, 200 ó 315 mM de piruvato. Alternativamente, los medios de alimentación de la invención pueden contener una concentración de piruvato de aproximadamente 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 ó 45 mM. La concentración de piruvato de los medios de alimentación puede variar de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 315 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 45 mM, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 40 mM ó de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM. El piruvato puede ser piruvato sódico.

En un medio de alimentación de la invención la concentración de cisteína puede ser al menos aproximadamente de 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 9,0 10,0, 11,0, 12,0, 14,0, 16,0, 18,0 ó 20,0 mM. Por ejemplo, la concentración de cisteína añadida a un medio de alimentación de la invención puede ser de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 35 mM, de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 25 mM o de aproximadamente 7,5 mM a aproximadamente 15 mM o de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 mM.

En un medio de alimentación de la invención la cistina puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,5 mM, de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 1,2 mM ó aproximadamente 1 mM ó 1,1 mM. Alternativamente, la cistina puede añadirse a una concentración de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 ó 1,0 mM y/o no más de 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 2, 3, 5 ó 10 mM. Reconociendo que cierta cantidad de cisteína añadida a un medio puede oxidarse para formar cistina o que cierta cantidad de cistina añadida a un medio puede reducirse para formar cisteína, los números proporcionados anteriormente para estas concentraciones se refieren a la concentración de cisteína o de cistina que se añade realmente al medio sin determinación posterior de qué proporción de esta puede oxidarse o reducirse.

Tanto la cisteína, cistina o tirosina pueden omitirse de un medio de alimentación de la invención. La tirosina puede estar presente a una concentración menor o igual a aproximadamente 4,4, 4,3, 4,2 ó 4,1 mM. La tirosina puede estar presente a una concentración de al menos aproximadamente 3,0, 3,5 ó 4,0 mM. Si la tirosina se encuentra presente, puede estar a una concentración mayor de aproximadamente 1 mM y menor de aproximadamente 4,4 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 4,4 mM, de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 4,0 mM, de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 4,4 mM o de aproximadamente 4,0 mM a aproximadamente 4,4 mM. Alternativamente, en los medios de alimentación de la invención la tirosina puede estar presente a aproximadamente 3, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 3,9, 4,0, 4,2 ó 4,4 mM.

Un medio de alimentación de la invención contiene piruvato, el cual puede estabilizar el medio. Como se ha explicado anteriormente, un medio de alimentación también puede contener componentes tales como cistina, cisteína y tirosina, los cuales pueden desestabilizar el medio. En un medio de alimentación de la invención también pueden incluirse otros componentes que sean relativamente insolubles en agua, siempre que se encuentren a concentraciones de tal manera que el medio sea estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 1, 2 ó 3 semanas. Algunos componentes relativamente insolubles pueden formar una fase no acuosa, distinta, y dichos componentes pueden incluirse, o no, en un medio de alimentación de la invención.

La Tabla 1 (más adelante) proporciona un listado ejemplar de los componentes que pueden incluirse en un medio de alimentación de la invención y los intervalos de concentración en los que puede utilizarse cada componente. Dependiendo de las necesidades de las células, no es preciso que todos estos componentes estén presentes. Alternativamente, un componente puede estar presente en una concentración fuera de los intervalos indicados en la Tabla 1. Además, en un medio de alimentación de la invención pueden incluirse otros componentes distintos de los enumerados en la Tabla 1. Dichos componentes adicionales en el medio pueden incluir, por ejemplo, alanina, aspartato, glutamato, rojo fenol, o diversas vitaminas incluyendo vitaminas A, D2 o B12 o ácido ascórbico (vitamina C) o alfa tocoferol fosfato, entre muchos otras.

Tabla 1: Composición de Medios de Alimentación Ejemplares

Componente de los Medios de Alimentación	Intervalo de Concentración (mM)
L-Arginina	1,0-57,0
L-Asparagina	8,0-200,0
Biotina (B7)	0,0003-0,05
Cloruro de Cálculo	0,09-9,0
D-Pantotenato de Calcio	0,02-2,1
Cloruro de Colina	0,008-55,0
Sulfato Cúprico	0,00012-0,0012
Cianocobalamina (B12)	0,01-0,6
L-Cisteína	5,0-105,0
L-Cistina	0,3-5,0
Nitrato Férrico	0,7-7,5
Ácido Fólico	0,02-2,3
D-Glucosa	Alimentación según se necesite
L-Glutamina	8,2-206,0
Glicina	1,2-80,0
L-Histidina	0,6-67,0
Hipoxantina	0,3-19,0
i-Inositol	0,1-59,0
L-Isoleucina	1,6-80,0
L-Leucina	2,2-115,0
Ácido Linoléico	0,003-0,04
Ácido DL-Alfa-Lipóico	0,01-1,0
L-Lisina	2,4-165,0
Cloruro de Magnesio	0,10-6,3
Sulfato de Magnesio	0,81-12,5
L-Metionina	0,6-31,0
Niacinamida (B3)	0,05-2,5
L-Fenilalanina	0,7-46,0
Cloruro de Potasio	4,0-40,0
Fosfato Potásico monobásico	0,3-37,0
Fosfato Potásico dibásico	0,8-58,0
L-Prolina	2,6-130
Putrescina	0,019-0,53
Piridoxal, HCl	0,02-2,2
Piridoxina, HCl	0,0005-0,2
Riboflavina (B2)	0,002-0,16
L-Serina	1,1-143,0
Bicarbonato Sódico	0-30,0
Cloruro Sódico	Según se necesite
Fosfato Sódico Dibásico Anhidro	0,4-71,0
Fosfato Sódico Monobásico	0,3-66,0
Piruvato Sódico	3,0-454,0
Tiamina (B1)	0,003-1,4
L-Treonina	2,5-126,0
Timidina	0,004-1,9
L-Triptófano	0,2-11,0
L-Tirosina	0,3-4,4
L-Valina	2,5-128,0
Sulfato de Zinc	0,03-1,6

Las proteínas que van a expresarse en las células cultivadas pueden ser fármacos basados en proteínas, conocidos también como compuestos biológicos. Las proteínas pueden secretarse como productos extracelulares. La proteína que va a producirse puede comprender parte o toda la proteína que es idéntica o sustancialmente similar a una proteína de origen natural y/o puede ser, o no, una proteína de fusión recombinante. Opcionalmente, la proteína puede ser una proteína humana, o un fragmento de la misma, o una proteína sustancialmente similar que tenga una longitud de al menos 15 aminoácidos. Esta puede comprender una proteína que no es un anticuerpo y/o un anticuerpo. Puede producirse intracelularmente o secretarse en el medio de cultivo a partir del cual puede recuperarse. Puede ser, o no, una proteína soluble.

La proteína que va a producirse puede comprender parte o toda la proteína que es idéntica o sustancialmente similar a una proteína de origen natural y/o puede ser, o no, una proteína de fusión recombinante. Una proteína de fusión recombinante es un polipéptido que es una fusión de parte de las dos proteínas diferentes. Por ejemplo, como se entiende en la presente memoria, la región extracelular de un receptor fusionado a la región Fc de un anticuerpo es una proteína de fusión recombinante. Puede comprender una proteína que no es un anticuerpo y/o un anticuerpo. Puede producirse intracelularmente o secretarse en el medio de cultivo a partir del cual puede recuperarse.

Los medios y métodos de la invención pueden usarse para producir casi cualquier proteína y son particularmente ventajosos para proteínas cuya expresión se encuentra bajo el control de un promotor fuerte, tal como, por ejemplo, un promotor viral y/o proteínas que están codificadas sobre un mensaje que tiene un elemento líder tripartito adenoviral. Son ejemplos de vectores de expresión útiles, que pueden usarse para producir proteínas, los descritos en la Solicitud de Internacional WO 01/27299 y en McMahan et al., (1991), EMBO J. 10: 2821, que describe el vector pDC409. Generalmente se entiende que una proteína tiene al menos aproximadamente 10 aminoácidos, opcionalmente aproximadamente 25, 75 ó 100 aminoácidos.

Los medios y métodos de la invención son útiles para producir proteínas recombinantes. Algunas proteínas que pueden producirse con los métodos de la invención incluyen proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas a sustancialmente similares a toda o parte de una de las siguientes proteínas: un ligando flt3 (como se describe en la Solicitud Internacional WO 94/28391), un ligando CD40 (como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.087.329), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, leptina, IL-2, angiopoyetina-2 (como describen Maisonnier et al., (1997), Science 277(5322): 55-60), el ligando Fas, ligando para el activador de receptores de NF-kappa B (RANKL, como se describe en la Solicitud Internacional WO 01/36637), el ligando de inducción de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, como se describe en la Solicitud Internacional WO 97/01633), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, como se describe en la Patente Australiana Nº 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (descrito, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento queratinocítico, factor de crecimiento y de desarrollo megacariótico, RANTES, proteína 2 similar al fibrinógeno humano (FGL2; número de acceso NCBI NM\_00682; Rüegg y Pytela (1995), Gene 160: 257-62) hormona del crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento insulínicos, hormona paratiroidea, interferones, incluyendo  $\alpha$  interferones,  $\gamma$  interferón e interferones consenso (como los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas 1 a 18, factores estimulantes de colonias, linfotoxina- $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de leucemia, oncostatina-M y diversos ligandos para moléculas de la superficie celular, ELK y Hek (tales como los ligandos para quinasas relacionadas con eph o LERKS). Las descripciones de las proteínas que pueden producirse de acuerdo con los métodos de la invención pueden encontrarse, por ejemplo, en Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, Vol. II (Aggawal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, Ma, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Lcigh, eds. Oxford University Press Inc., Nueva York, (1993); y The Cytokine Handbook (A. W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1991).

Otras proteínas que pueden producirse usando los medios y métodos de la invención incluyen proteínas que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista para dicho receptor o cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y/o proteínas sustancialmente similares a dichos receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, denominadas p55 y p75, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.395.760 y en la Patente de Estados Unidos Nº 5.610.279), receptores de interleucina-1 (IL-1) (tipos I y II; descritos en la Patente EP Nº 0 460 846, Patente de Estados Unidos Nº 4.968.607 y Patente de Estados Unidos Nº 5.767.064), antagonistas de receptores de IL-1 (tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 6.337.072), antagonistas o inhibidores de IL-1 (tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.981.713, 6.096.728 y 5.075.222), receptores de IL-2, receptores de IL-4 (como se describe en la Patente EP Nº 0 367 566 y en la Patente de Estados Unidos Nº 5.856.296), receptores de IL-15, receptores de IL-17, receptores de IL-18, receptores de Fc, receptores del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, receptor del factor de estimulante de colonias de granulocitos, receptores de oncostatina M y factor inhibidor de leucemia, receptores de activadores de NF-kappa B (RANK, descrito en el documento WO 01/36637 y en la Patente de Estados Unidos Nº 6.271.349), osteoprotegerina (descrita, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 6.015.938), receptores de TRAIL (incluyendo receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4) y receptores que comprenden dominios letales, tales como Fas o Receptores Inductores de Apoptosis (RIA).

Otras proteínas que pueden producirse usando los medios y métodos de la invención incluyen proteínas que comprenden toda o parte de las secuencias de aminoácidos de antígenos de diferenciación (denominadas proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de estos. Dichos antígenos se describen en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japón, 1996). En seminarios posteriores se describen proteínas CD similares. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 y ligandos de los mismos (ligando CD27, ligando CD30, etc.).

Varios de los antígenos CD son miembros de la familia de receptores de TNF, que también incluyen 41BB y OX40. Los ligandos son frecuentemente miembros de la familia de TNF, como lo son el ligando 41BB y el ligando OX40. Por consiguiente, usando la presente invención también pueden purificarse los miembros de las familias de TNF y TNFR.

5

Usando los medios y métodos de la invención también pueden producirse proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos. Los ejemplos incluyen proteínas que comprenden toda o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a una de estos: miembros de la familia de desintegrinas-metaloproteinasas, diversas quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador tisular del plasminógeno, factor VIII, factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas y antagonistas de IL-2, antitripsina alfa-1, enzima convertidora de TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente y numerosas otras enzimas y sus ligandos.

Los medios y métodos de la invención también pueden usarse para producir anticuerpos, incluyendo anticuerpos humanos, o partes de los mismos y anticuerpos quiméricos o humanizados. Los anticuerpos quiméricos tienen dominios de inmunoglobulina de anticuerpo constante humano acoplados a uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpo variable murino, fragmentos de los mismos, o proteínas sustancialmente similares. Los anticuerpos humanizados contienen regiones variables que comprenden partes marco conservadas de origen humano y partes CDR de una fuente no humana. El método de la invención también puede usarse para producir conjugados que comprenden un anticuerpo y una sustancia citotóxica o luminiscente. Dichas sustancias incluyen: derivados de maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como una enterotoxina estafilocócica); isótopos de yodo (tales como yodo-125); isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tales como, Cy5.5.18); y proteínas inactivadoras de ribosomas (tales como bouganina, gelonina o saporina-S6). La invención también puede usarse para producir proteínas quiméricas seleccionadas *in vitro* para unirse a una proteína diana específica y modificar su actividad tal y como se describe en la Solicitudes Internacionales WO 01/83525 y WO 00/24782. Los ejemplos de anticuerpos, proteínas quiméricas seleccionadas *in vitro* o conjugados de anticuerpo/citotoxina o anticuerpo/luminóforo que pueden producirse mediante los métodos de la invención incluyen aquellos que reconocen una cualquiera o una combinación de proteínas que incluyen, pero sin limitación, las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, subunidades del receptor de IL-18, FGL2, PDGF- $\beta$  y análogos de los mismos (tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.272.064 y 5.149.792), VEGF, TGF, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 1, receptores de EGF (incluyendo los descritos en la Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.235.883), receptores de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligandos de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulador de linfocitos B (BlyS, conocido también como BAFF, THANK, TALL-1 y zTNF4; véase el documento Do y Chen-Kiang (2002), Cytokine Grow Factor Rev. 13(1): 19-25), complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con el cáncer de pulmón), HER-2, una glucoproteína asociada con el tumor TAG-72, el antígeno SK-1, epítomos asociados con tumores que están presentes a niveles elevados en el suero de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos asociados con cáncer o proteínas expresadas en células de cáncer de mama, colon, célula escamosa, próstata, pancreático, pulmón y/o riñón y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores 1, 2, 3 y 4 TRAIL, RANK, ligando RANK, TNF- $\alpha$ , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión de célula epitelial (EpCAM), molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glicoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, la cadena pesada de la miosina cardiaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor tisular del factor VIIa), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado con el linfocito T citotóxico), receptor de Fc- $\gamma$ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno de HLA-DR, L-selectina, Virus Sincitial Respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

50

Los medios y métodos de la invención también pueden usarse para producir toda o parte de un anticuerpo anti-idiotópico o una proteína sustancialmente similar, incluyendo anticuerpos anti-idiotópicos contra: un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp72; un anticuerpo contra gangliósido GD3; un anticuerpo contra el gangliósido GD2 o anticuerpos sustancialmente similares a éstos.

55

Los medios y métodos de la invención también pueden usarse para producir proteínas de fusión recombinantes que comprenden cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, usando los métodos de la invención pueden producirse proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas mencionadas anteriormente más un dominio de multimerización, tal como la cremallera de leucina, una espiral enrollada, una parte Fc de un anticuerpo o una proteína sustancialmente similar. Véanse, por ejemplo, los documentos WO94/10308; Lovejoy et al (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al., (1994), Nature 371:80-83; Hakansson et al. (1999), Structure 7:255-64. Especialmente incluidas entre dichas proteínas de fusión recombinantes se encuentran las proteínas en las que una parte del TNFR o RANK se fusiona con una parte Fc de un anticuerpo (TNFR:Fc o RANK:Fc). La fusión TNFR:Fc comprende la parte Fc de un anticuerpo fusionada a

60

un dominio extracelular del TNFR, que incluye secuencias de aminoácidos sustancialmente similares a los aminoácidos 1-163, 1-185 o 1-235 de la Figura 2A de la Patente de Estados Unidos N° 5.395, 760. La fusión RANK: Fc se describe en la Solicitud Internacional WO 01/36637.

- 5 Preferentemente, las proteínas se expresan bajo el control de un elemento de control heterólogo tal como, por ejemplo, un promotor que en la naturaleza no dirige la producción de esa proteína. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor viral fuerte (por ejemplo, CMV, SV40) que dirige la expresión de una proteína de mamíferos. La célula hospedadora puede producir normalmente, o no, la proteína. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula CHO que se ha modificado por ingeniería genética para producir una proteína humana, lo que significa  
10 que el ácido nucleico que codifica la proteína humana se ha introducido en la célula CHO. Alternativamente, la célula hospedadora puede ser una célula humana que se ha modificado por ingeniería genética para producir niveles aumentados de una proteína humana normalmente sólo presente a niveles muy bajos (por ejemplo, sustituyendo el promotor endógeno con un promotor viral fuerte). Para la producción de proteínas recombinantes, puede transferirse un vector de expresión que codifique la proteína recombinante, por ejemplo, por transfección o infección viral, en un  
15 cultivo sustancialmente homogéneo de células hospedadoras. El vector de expresión, que puede construirse usando los métodos de modificación por ingeniería genética, pueden incluir ácidos nucleicos que codifiquen la proteína de interés unida operativamente a secuencias reguladoras adecuadas.

Las secuencias reguladoras derivan típicamente de genes de mamíferos, microbios, virus y/o insectos. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores y potenciadores transcripcionales, un sitio de unión al ribosoma (véase, por ejemplo, Kozak (1991), J. Biol. Chem. 266: 19867-19870), secuencias apropiadas para el control transcripcional e inicio y terminación de la traducción, señales de poliadenilación (véase, por ejemplo, McLauchlan et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16: 5323-33) y sitios de unión de matrices y armazón (véase, Phi-Van et al. (1988), Mol. Cell. Biol. 10: 2302-07; Stief et al. (1989), Nature 341: 342-35; Bonifer et al. (1990). EMBO J. 9:  
25 2843-38). Las secuencias de nucleótidos están unidas operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia codificante de la proteína. Por tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente a una secuencia codificante de la proteína si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia codificante. Generalmente, para facilitar la identificación de las células recombinantes en el vector de expresión se incorpora un gen que codifica un marcador de selección.

30 Las secuencias de control transcripcionales y traduccionales para los vectores de expresión de las células hospedadoras de mamífero pueden escindirse de genomas virales. Las secuencias promotoras y potenciadoras comúnmente usadas derivan del virus de polio, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Por ejemplo, puede usarse el promotor/potenciador del CMV humano del gen 1 temprano inmediato. Véase, por ejemplo, Patterson et al. (1994), Applied Microbiol. Biotechnol. 40: 691-98. Para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula hospedadora de mamífero pueden usarse secuencias de ADN derivadas del genoma viral del SV40, por ejemplo, origen, promotor temprano y tardío del SV40, potenciador, corte y empalme y sitios de poliadenilación. Los promotores tempranos y tardíos virales son particularmente útiles porque ambos se obtienen fácilmente, como un fragmento, de un genoma viral, que también  
40 puede contener un origen de replicación viral (Fiers et al. (1987), Nature 273: 113; Kaufman (1990), Meth. in Enzimol. 185: 487-511). También pueden usarse fragmentos del SV40 más pequeños o más grandes, siempre que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *HindIII* hacia el sitio *BglI* localizado en el origen de replicación viral del SV40.

45 Además, para promover la secreción extracelular de la proteína recombinante, en el vector de expresión puede incorporarse una secuencia que codifique un péptido de señal natural o heterólogo apropiado (secuencia líder). El péptido de señal se escindiría de la proteína recombinante después de la secreción a partir de la célula. La elección del péptido de señal o líder depende del tipo de células hospedadoras en las que va a producirse la proteína recombinante. Son ejemplos de péptidos de señal, que son funcionales en células hospedadoras de mamífero, los  
50 que incluyen la secuencia de señal para la interleucina-7 (IL-7), descrita en la Patente de Estados Unidos N° 4.965.195, la secuencia de señal para el receptor de interleucina-2, descrita en Cosman et al. (1984), Nature 312: 768; el péptido de señal del receptor de la interleucina-4 descrito en la Patente EP N° 367.566; el péptido de señal del receptor de la interleucina-1 de tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos N° 4.968.607; y el péptido de señal del receptor de la interleucina-1 de tipo II descrito en la Patente EP N° 0 460 846.

55 Se han descrito métodos establecidos para la introducción de ADN en células de mamífero. Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, páginas 15-69. Para transfectar células pueden usarse protocolos adicionales que utilizan reactivos comercialmente disponibles, tales como los reactivos lípidos catiónicos LIPOFECTAMINE™, LIPOFECTAMINE™-2000 o LIPOFECTAMINE™-PLUS (que pueden adquirirse en Invitrogen). Felgner et al. (1987),  
60 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417. Adicionalmente, para transfectar células de mamífero puede usarse la electroporación o el bombardeo con microproyectiles revestidos con ácidos nucleicos usando procedimientos, tales como los descritos en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y Fitzpatrick-McElligott (1992), Biotechnology (NY) 10(9): 1036-40. La selección de transfectantes estables puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo,  
65 resistencia a fármacos citotóxicos. Kaufman et al. ((1990), Meth. in Enzymology 185: 487-511), describen diversos

esquemas de selección, tales como resistencia a la dihidrofolato reductasa (DHFR). Una cepa hospedadora adecuada para la selección por DHFR puede ser la cepa DX-B11 de CHO, que carece de DHFR. Urlaub y Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220. En la cepa DX-B11 puede introducirse un plásmido que exprese el ADNc de DHFR, y solamente las células que contienen el plásmido pueden cultivarse en los medios selectivos  
5 apropiados. Otros ejemplos de marcadores de selección que pueden incorporarse en un vector de expresión incluyen los ADNc que confieren resistencia a antibióticos, tales como G418 e higromicina B. Pueden seleccionarse células que contengan el vector basándose en la resistencia a estos compuestos.

Las secuencias de control adicionales que demuestran que mejoran la expresión de genes heterólogos, a partir de  
10 vectores de expresión de mamífero, incluyen elementos tales como los elementos de secuencia que aumentan la expresión (ESAE) derivados de células CHO (Morris et al., en *Animal Cell Technology*, páginas 529-534 (1997); Patentes de Estados Unidos N° 6.312.951 B1, 6.027.915 y 6.309.841 B1) y la secuencia líder tripartita (LTP) y los ARN del gen VA de Adenovirus 2 (Gingeras et al. (1982), *J. Biol. Chem.* 257: 13475-13491). Las secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) de origen viral permiten que los ARNm dicistrónicos se traduzcan eficazmente (Oh y Sarnow (1993), *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 295-300; Ramesh et al. (1996), *Nucleic Acids Research* 24: 2697-2700). Se ha demostrado que la expresión de un ADNc heterólogo como parte de un ARNm dicistrónico seguido por el gen para un marcador de selección (por ejemplo, DHFR) mejora la transfectabilidad del hospedador y la expresión del ADNc heterólogo (Kaufman (1990), *Methods in Enzymol.* 185: 487-511). Los vectores de expresión ejemplares que emplean ARNm dicistrónicos son pTR-DC/GFP descritos por  
20 Mosser et al., *Biotechniques* 22: 150-161 (1997), y p2A5I descrito por Morris et al., en *Animal Cell Technology*, páginas 529-534 (1997).

Mosley et al. ((1989), *Cell* 59: 335-348), describieron un vector de expresión muy útil, pCAVNOT. Pueden construirse otros vectores de expresión para su uso en células hospedadoras de mamífero como describen Okayama y Berg  
25 ((1983), *Mol. Cell. Biol.* 3: 280). Puede construirse un sistema útil para la expresión a nivel altamente estable de los ADNc de mamíferos en células epiteliales mamarias murinas C127 sustancialmente como describen Cosman et al. ((1986), *Mol. Immunol.* 23: 935). Un vector de expresión muy útil, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman et al. ((1984), *Nature* 312: 768), se ha depositado como ATCC 39890. En la Patente EP N° -A-0 367 566 y en el documento WO 01/27299 A1 se describen otros vectores de expresión de mamífero útiles. Los vectores pueden derivar de retrovirus.  
30 Adicionalmente, pueden usarse otros vectores, tales como los descritos por Aldrich et al. (*Biotechnol. Prog.* 19: 1433-38 (2003)) o por Bianchi y McGrew (*Biotechnol. Bioeng.* 84: 439-44 (2003)).

En lugar de la secuencia de señal natural, puede usarse una secuencia de señal heteróloga, tal como una de las siguientes secuencias: la secuencia de señal para IL-7 descrita en la Patente de Estados Unidos N° 4.965.195; la  
35 secuencia de señal para el receptor de IL-2 descrita en Cosman et al. ((1984), *Nature* 312: 768); el péptido de señal de IL-4 descrito en la Patente EP N° 0 367 566; el péptido de señal de receptores de IL-1 de tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos N° 4.968.607 y péptido de señal de receptores de IL-1 de tipo II descrito en la Patente EP N° 0 460 846.

Las proteínas pueden producirse de manera recombinante en células eucariotas y pueden secretarse por células hospedadoras adaptadas al crecimiento en cultivos celulares. Opcionalmente, las células hospedadoras para su uso en la invención son células de mamífero. Las células también pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un gen de interés, pueden ser células de producción de mamífero adaptadas al crecimiento en cultivo celular y/o pueden ser líneas celulares homogéneas. Ejemplos de dichas células, comúnmente usadas en la  
45 industria, son VERO, BHK, HeLa, CV1 (incluyendo Cos), MDCK, 293, 3T3, líneas celulares de mieloma (por ejemplo, NSO, NS1), PC12, células WI38 y células de ovario de hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés), que se usan ampliamente para la producción de diversas proteínas recombinantes complejas, por ejemplo citocinas, factores de coagulación y anticuerpos (Brasel et al. (1996), *Blood* 88: 2004-2012; Kaufman et al. (1998), *J. Biol Chem* 263: 6352-6362; McKinnon et al. (1991), *J Mol Endocrinol* 6: 231-239; Wood et al (1990), *J. Immunol.* 145: 3011-3016). Las  
50 líneas celulares mutantes deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub et al. (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 y DG-44, son líneas celulares hospedadoras CHO deseables porque en estas células el sistema de expresión de genes de selección y amplificación eficaces para DHFR permite altos niveles de expresión de proteína recombinante (Kaufman et al. (1998), *Meth Enzymol* 185: 537-566.) Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o de suspensión y presentan una estabilidad genética  
55 relativamente buena. Las células CHO y las proteínas recombinantes expresadas en ellas se han caracterizado ampliamente y las agencias reguladoras han autorizado su uso en la fabricación comercial clínica. Los métodos de la invención también pueden llevarse a la práctica usando líneas celulares de hibridoma que producen un anticuerpo. En la técnica se conocen bien métodos para preparar líneas de hibridomas. Véase, por ejemplo, Berzofsky et al. en Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Segunda Edición, páginas 315-356, a 347-350, Raven Press Ltd., Nueva York.  
60 Las líneas celulares derivadas de las líneas mencionadas anteriormente también son adecuadas para llevar a la práctica la invención.

De acuerdo con la presente invención, se cultiva una célula eucariota, opcionalmente una célula hospedadora de mamífero, en condiciones que promueven la producción de la proteína de interés, que puede ser cualquier proteína,  
65 que incluye un anticuerpo o una proteína recombinante. El cultivo se alimenta usando los medios de alimentación

concentrados y los métodos de la invención.

Las formulaciones de medio de cultivo de células para su uso como medios de base son bien conocidas en la técnica. A estas formulaciones de medio de cultivo basal el experto en la materia añadirá componentes tales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, tampones, antibióticos, lípidos, nutrientes traza y similares, dependiendo de las necesidades de las células hospedadoras que vayan a cultivarse. El medio de cultivo puede contener, o no, suero y/o proteínas. Para el cultivo celular se encuentran comercialmente disponibles diversos medios de cultivo tisulares, incluyendo medios de cultivo aséricos y/o definidos. Los medios de cultivo tisulares se definen, para los fines de la invención, como medios que son adecuados para el crecimiento de células eucariotas y, opcionalmente, células de mamífero, en cultivos celulares *in vitro*. Típicamente, los medios de cultivo tisulares contienen un tampón, sales, fuentes de energía, aminoácidos, vitaminas y nutrientes traza esenciales. Puede usarse cualquier medio que sea capaz de soportar el crecimiento de la célula eucariota apropiada en cultivo; la invención se aplica en gran medida a células eucariotas en cultivo, particularmente células de mamífero, y la elección de los medios no es crucial para la invención. En los métodos de la invención, los medios de cultivo tisulares, adecuados para su uso como un medio de base, como se define en la presente memoria, se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, en la ATCC (Manassas, VA). Por ejemplo, como un medio de base, puede usarse uno cualquiera o una combinación de los siguientes medios: Medio RPMI-1640, Medio RPMI-1641, Medio de Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM), Medio Esencial Mínimo de Eagle, Medio F-12K, Medio de Ham F-12, Medio de Dubelcco Modificado por Iscove, Medio de McCoy 5A, Medio de Leibovitz L-15 y medio asérico tal como la Serie EX-CELL™ 300 (disponible en Biosciences SAFC, que antiguamente era JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, Estados Unidos), entre otros, que pueden obtenerse a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo o de SAFC Biosciences, así como de otros proveedores. Cuando se usa un medio definido que es asérico y/o sin peptona, el medio normalmente es muy rico en aminoácidos y nutrientes traza. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.122.469 de Mather et al. y 5.633.162 de Keen et al. A un medio de cultivo puede añadirse peptona u otros hidrolizados proteicos.

Los medios de cultivo celulares, incluyendo medios de base y/o medios de alimentación, pueden ser medios aséricos, medios aprotéicos, sin factores de crecimiento y/o sin peptona. El término "asérico" se aplica a medios que incluyen cualquier medio de cultivo de células de mamífero que no contenga suero, tal como suero fetal bovino. La expresión "sin insulina" se aplica a medios que incluyen cualquier medio en el que no se ha añadido insulina exógena. Exógeno significa, en este contexto, distinto al producido por el cultivo de las propias células. La expresión "sin IGF-1" se aplica a medios que incluyen cualquier medio en el que no se ha añadido factor 1 de crecimiento Insulínico (IGF-1) exógeno o análogo (tal como por ejemplo análogos de IGF-1, LongR3, [Ala31], o [Leu24] [Ala31] disponibles de Novozymes GroPep Ltd. de Thebarton, Sur de Australia). La expresión "sin factores de crecimiento" se aplica a medios que incluyen cualquier medio en el que no se ha añadido ningún factor de crecimiento exógeno (por ejemplo, insulina, IGF-1). La expresión "aprotéico" se aplica a medios que incluyen medios que carecen de proteínas añadidas de modo exógeno, tales como, por ejemplo, transferrina y los factores de crecimiento proteicos IGF-1 e insulina. Los medios aprotéicos pueden tener, o no, peptonas. La expresión "sin peptona" se aplica a medios que incluyen cualquier medio en el que no se han añadido hidrolizados proteicos exógenos, tales como, por ejemplo, hidrolizados proteicos de animales y/o plantas. La eliminación de la peptona de los medios tiene la ventaja de reducir lote a lote la variabilidad y potenciar etapas de procesamiento, tales como filtración. Los medios químicamente definidos son medios en los que cada componente se define y se obtiene a partir de una fuente pura, preferentemente una fuente no animal.

El experto en la materia también puede elegir usar una de las muchas formulaciones de medios de base individualizadas que se han desarrollado para maximizar el crecimiento de las células, la viabilidad celular y/o la producción de proteínas recombinantes en una célula hospedadora cultivada particular. Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden usarse en combinación con medios de cultivo de células comercialmente disponibles o con un medio de cultivo celular que se ha formulado individualmente para su uso con una línea celular particular. Por ejemplo, un medio de base enriquecido que pueda sustentar la producción aumentada de proteínas puede comprender una mezcla de dos o más medios comerciales, tales como, por ejemplo, medios DMEM y Ham F12 combinados en proporciones tales como, por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 o incluso hasta 1:15 o más elevadas. Alternativamente o adicionalmente, un medio de base puede enriquecerse por la adición de nutrientes, tales como aminoácidos o peptona y/o puede usarse un medio (o la mayoría de sus componentes con las excepciones indicadas a continuación) a una concentración recomendada mayor de lo habitual, por ejemplo a aproximadamente 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X o incluso mayores concentraciones. Como se usa en la presente memoria, "1X" significa la concentración típica normalmente usada en un medio de base particular. "2X" significa dos veces la concentración típica, etc. En cualquiera de estas realizaciones, los componentes del medio que pueden afectar sustancialmente a la osmolaridad, tales como sales, no pueden aumentarse en la concentración de manera que la osmolaridad del cultivo se encuentre fuera de un intervalo aceptable, tal como, por ejemplo, aproximadamente 200-700 mOsm, o más típicamente, de aproximadamente 270 mOsm a aproximadamente 400 mOsm. Por tanto, un medio de base puede ser, por ejemplo, 8X con respecto a todos los componentes excepto sales, que solo pueden estar presentes 1X. Un medio enriquecido puede ser un medio asérico y/o aprotéico. Un medio asérico carece de suero, tal como, por ejemplo, suero bovino, que se usa normalmente en cultivos de células. Adicionalmente, un medio de base puede complementarse periódicamente con un medio de alimentación de la invención durante el

tiempo en el que se mantiene un cultivo para reabastecer los componentes del medio que puedan agotarse, tales como, por ejemplo, vitaminas, aminoácidos y precursores metabólicos. Como se sabe en la técnica, diferentes medios y temperaturas pueden tener algunos efectos diferentes sobre las líneas celulares diferentes y el mismo medio y temperatura puede no ser adecuado para todas las líneas celulares.

5

Los medios de alimentación concentrados de la invención pueden basarse casi en cualquier medio de cultivo de base. Tal medio de alimentación concentrado puede contener muchos de los componentes del medio de cultivo, por ejemplo, a una cantidad de aproximadamente 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X o incluso aproximadamente 1000X de su cantidad normal. Sin embargo, no todos los componentes de un medio convencional pueden aumentarse en concentración en un medio de alimentación concentrado, como mucho, al mismo grado. Por ejemplo, en un medio de alimentación concentrado 10X, sales tales como cloruro de sodio o sales de hierro pueden estar presentes a sólo 1X o estar totalmente ausentes. Usándolas a una concentración de 10X podría llevarse la osmolaridad del medio a un intervalo inaceptable. Un intervalo osmótico aceptable puede ser de aproximadamente 200-1500 mOsm. De manera similar, durante el crecimiento de las células, algunos componentes del medio no se agotan sustancialmente y, por tanto, no es necesario que estén presentes a concentraciones aumentadas o, en algunos casos, no es necesario que estén presentes en ningún caso, en un medio de alimentación. Guiado por estas consideraciones, un experto en la materia podría diseñar fácilmente un medio de alimentación concentrado basándose en cualquier medio de cultivo de base eucariota, especialmente de mamífero.

20

Como se sabe en la técnica la solubilidad y la estabilidad de un medio de alimentación concentrado pueden estar sustancialmente afectadas por componentes del medio relativamente insolubles, tales como tirosina y cistina, y por componentes del medio que se convierten fácilmente en especies insolubles, tales como cisteína. Como se muestra en el Ejemplo 1, la tirosina y la cisteína pueden ser importantes para aumentar la producción de proteínas por un cultivo. Por tanto, puede ser deseable incluir tales especies insolubles a altas concentraciones en un medio de alimentación. Los medios y métodos de la invención proporcionan un medio, es decir, la adición de altas concentraciones de piruvato sódico, para estabilizar medios que contienen altas concentraciones de cisteína y/o cistina y/o tirosina.

25

En la técnica se conocen condiciones de cultivo adecuadas para células de mamífero. Véase, por ejemplo, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford university press, Nueva York (1992). Las células de mamífero pueden cultivarse en suspensión o al mismo tiempo unidas a un sustrato sólido. Adicionalmente, las células de mamífero pueden cultivarse, por ejemplo, en biorreactores de lecho fluido, biorreactores de fibra hueca, frascos rotativos, matraces agitadores o biorreactores de tanque agitado, con o sin microtransportadores, y funcionar en un modo discontinuo, con alimentación discontinua, continua, semi-continua o perfusión. Los medios y métodos de la invención implican específicamente un método en el que el medio de alimentación concentrado se añade al cultivo bien continuamente o a intervalos durante el cultivo. Por ejemplo, un cultivo puede alimentarse, por ejemplo, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días o puede alimentarse cuando la concentración de un componente específico del medio, que vaya a controlarse, se encuentre fuera de un intervalo deseado. Alternativamente, un medio de cultivo puede alimentarse sobre un programa irregular, por ejemplo, los días 2, 5 y 7.

35

40

Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden usarse para mejorar la producción de proteínas recombinantes en procedimientos de cultivo tanto en fase sencilla como en fase múltiple. En un procedimiento en fase sencilla, las células se inoculan en un medio de cultivo y los métodos descritos se emplean durante la fase de producción sencilla. En un procedimiento de fase múltiple, las células se cultivan en dos o más fases distintas. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en primer lugar en una o más fases de crecimiento, en condiciones ambientales que maximicen la proliferación y viabilidad celular, y después transferirse a una fase de producción, en condiciones que maximicen la producción de la proteína. En un procedimiento comercial para la producción de una proteína por células de mamífero, existen fases de crecimiento normalmente múltiples, por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 que pueden producirse en diferentes recipientes de cultivo antes de una fase de producción final. Las fases de crecimiento y producción pueden ir precedidas, o separadas, por una o más fases de transición. En procedimiento de fases múltiples, los métodos de acuerdo con la presente invención pueden emplearse al menos durante la fase de producción, aunque también pueden emplearse en una fase de crecimiento anterior. Una fase de producción puede realizarse a gran escala. Un procedimiento a gran escala puede realizarse en un volumen de al menos aproximadamente 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10.000, 15.000, 20.000 litros o mayor. Una fase de crecimiento puede producirse a una mayor temperatura que una fase de producción. Por ejemplo, una fase de crecimiento puede producirse a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 39°C, y una fase de producción puede producirse a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 39 °C, opcionalmente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 36 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 34 °C. Pueden añadirse inductores químicos de producción de proteínas, tales como, por ejemplo, cafeína, butirato, y hexa-metilen bisacetamida (HMBA), al mismo tiempo, antes, y/o después, de un cambio de temperatura. Si se añaden inductores después de un cambio de temperatura, éstos pueden añadirse desde una hora a cinco días después del cambio de temperatura, opcionalmente desde uno a dos días después del cambio de temperatura.

55

60

65

Los métodos de la invención pueden usarse para el cultivo de células que producen una proteína, y después la proteína expresada resultante puede recogerse. Además, la proteína puede purificarse, o purificarse parcialmente, de dicho cultivo (por ejemplo, del medio de cultivo o de extractos celulares) usando procedimientos conocidos. La expresión “purificarse parcialmente” significa que se ha realizado algún procedimiento, o procedimientos, de fraccionamiento, pero están presentes más especies de proteína (al menos 10%) de la proteína deseada. Por “purificarse” se entiende que la proteína es esencialmente homogénea, es decir, están presentes menos de aproximadamente un 2% de proteínas contaminantes. Los procedimientos de fraccionamiento pueden incluir, pero sin limitación, una o más etapas de filtración, centrifugación, precipitación, separación por fases, purificación por afinidad, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, usando resinas tales como éter fenílico, éter butílico o éter propílico), HPLC o alguna combinación de las anteriores.

Por ejemplo, la purificación de la proteína puede incluir una columna de afinidad que contenga agentes que se unirán a la proteína; una o más etapas en columna sobre dichas resinas de afinidad tales como concanavalina A-agarosa, heparina-TOYOPEARL® (Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Japón) o Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE® (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Nueva York); una o más etapas que impliquen elución y/o cromatografía por inmunoafinidad. La proteína puede expresarse en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como una proteína de fusión, tal como una proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX). En el mercado de New England BioLab (Beverly, Mass), Pharmacia (Piscataway, N.J.) e InVitrogen, respectivamente se encuentran disponibles kits para la expresión y purificación de dichas proteínas de fusión. La proteína puede marcarse con un epítipo y posteriormente purificarse usando un anticuerpo específico dirigido contra dicho epítipo. Un epítipo de este tipo (FLAG®) se encuentra disponible en el mercado de de Kodak (New Haven, Conn.). También es posible utilizar una columna de afinidad que comprenda una proteína de unión a proteínas, tal como un anticuerpo monoclonal contra la proteína recombinante, contra proteínas expresadas purificadas por afinidad. Otros tipos de etapas de purificación por afinidad pueden ser una columna de proteína A o de proteína G, cuyos agentes de afinidad se unen a proteínas que contienen dominios Fc. Para su uso, las proteínas pueden eliminarse de una columna de afinidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, en un tampón de elución con una alta concentración salina y después dializarse en un tampón con una baja concentración salina o cambiando el pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada o pueden eliminarse competitivamente usando el sustrato de origen natural del resto de afinidad.

El grado de pureza final deseado depende del uso deseado de la proteína. Se desea un grado de pureza relativamente alto cuando la proteína va a administrarse, por ejemplo, *in vivo*. En tal caso, las proteínas se purifican de tal manera que ninguna banda de proteína, correspondiente a otra proteína, sea detectable después de análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Un experto en la materia reconocerá, en el campo pertinente, que pueden visualizarse bandas múltiples correspondientes a la proteína por SDS-PAGE, debido a una glicosilación diferencial, procesamiento postraduccional diferencial y similares. Opcionalmente, la proteína se purifica a una homogeneidad sustancial, como se indica mediante una sola banda de proteína tras análisis por SDS-PAGE. La banda de proteína puede visualizarse por tinción con plata, tinción con azul de Coomassie o (si la proteína está radiomarcada) por autorradiografía.

La invención también incluye opcionalmente formular adicionalmente las proteínas. El término “formulación” significa que las proteínas pueden intercambiarse en el tampón, esterilizarse, envasarse a granel y/o envasarse para un usuario final. Para los fines de la invención, la expresión “forma a granel estéril” significa que una formulación está libre, o está esencialmente libre, de contaminación microbiana (a un grado tal que sea aceptable para fines alimentarios y/o farmacológicos), y tiene una composición y una concentración definidas. La expresión “forma de dosis unitaria estéril” significa una forma que es apropiada para la administración o consumo del consumidor y/o paciente. Dichas composiciones pueden comprender una cantidad eficaz de la proteína, en combinación con otros componentes tales como un diluyente, vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. La expresión “fisiológicamente aceptable” significa un material no tóxico que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente (o ingredientes) activo.

Las formulaciones adecuadas para la administración incluyen soluciones para inyección estériles, acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las proteínas pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos usados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Pueden combinarse mezclas, bien como el único material activo o con otros materiales activos conocidos, adecuados para una indicación determinada, con diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, solución salina, Tris-HCl, acetato, y soluciones tamponadas con fosfato), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y/o transportadores. Las formulaciones adecuadas para las composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. Adicionalmente, dichas composiciones pueden formar complejos con polietilenglicol (PEG), iones metálicos o incorporarse en compuestos poliméricos tales como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextrano, etc. o incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Los lípidos adecuados para formulaciones liposomales incluyen, sin limitación,

monoglicéridos, diglicéridos, sulfatadas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de dichas formulaciones liposomales se encuentran dentro del nivel de experiencia en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 4.737.323. Tales composiciones ejercerán influencia en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de eliminación *in vivo* y por tanto se seleccionarán de acuerdo con la aplicación deseada, de tal manera que las características del transportador dependerán de la vía de administración seleccionada. Las formas de liberación sostenida adecuadas para su uso incluyen, pero sin limitación, proteínas que están encapsuladas en un polímero biocompatible de lenta disolución (tal como micropartículas de alginato descritas en la Patente de Estados Unidos Nº 6.036.978), mezcladas con tal polímero (incluyendo hidrogeles aplicados por vía tópica), y/o incluidas en un implante semipermeable biocompatible.

Habiéndose descrito la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y sin limitación.

### Ejemplos

15

#### Ejemplo 1: la adición de tirosina y cisteína aumenta las valoraciones de proteína

Se cultivó una línea celular CHO productora de una proteína recombinante en un medio de base disponible en el mercado (una versión modificada del medio asérico EX-CELL™ 325 PF para CHO de número de catálogo 24340C de SAFC Biosciences (Lenexa, Kansas), en el que la concentración de cloruro sódico era de 4,5 g/l, en lugar de 6,508 g/l presente en el número de catálogo 24340C) y se alimentó con Medio de Alimentación A con o sin cisteína y/o tirosina. El Medio de Alimentación A se diseñó basándose en el medio convencional DMEM, disponible en el mercado. El medio DMEM se encuentra disponible en el mercado, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia, Estados Unidos. El Medio de Alimentación A contiene todos los ingredientes indicados en la Tabla 1 dentro de los intervalos de concentración indicados en la Tabla 1, excepto los siguientes ingredientes, que no forman parte del Medio de Alimentación A: arginina, asparagina, biotina, cloruro de calcio, sulfato cúprico, cianocobalamina, cisteína, cistina, glucosa (que se añadió por separado), hipoxantina, ácido linoleico, ácido alfa-lipoico, cloruro de magnesio, niacinamida, cloruro potásico, fosfato potásico monobásico, fosfato potásico dibásico, prolina, putrescina, piridoxal, riboflavina, fosfato sódico dibásico, piruvato sódico, timidina, tirosina y sulfato de cinc. La cantidad de cloruro de sodio en el Medio de Alimentación A se ajustó para llevar la osmolalidad del medio a aproximadamente 300 mOsm.

Al Medio de Alimentación A, se añadieron cisteína, tirosina y piruvato sódico a diversas combinaciones. Los medios de alimentación sólo diferían en sus concentraciones de tirosina, cisteína y piruvato sódico, las cuales se muestran en la siguiente Tabla 2. Los medios de alimentación se mezclaron a temperatura ambiente. Las células se cultivaron en matraces agitadores de 125 ml, tapados con ventilación, en el medio de base descrito anteriormente. Los matraces agitadores se mantuvieron a una temperatura de 36 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. Los matraces se agitaron a 150 rpm. Todos los matraces se sembraron a 5 x 10<sup>5</sup> células por ml en un volumen de 30 ml. Los días 3, 6 y 8, se añadió un volumen de cultivo de 0,1 de cada uno de los medios de alimentación descritos en la Tabla 2 a uno de los cuatro matraces. El día 0 es el día en el que comenzaron los cultivos, el día 1 es el primer día después de esto, el día 2 es el segundo día después de esto, etc. La valoración de proteína se determinó los días 8 y 10.

Tabla 2: Concentraciones de los componentes del medio

Medio de alimentación	Tirosina (mM)	Cisteína (mM)	Piruvato sódico (mM)
Nº 1	0,0	0,0	0,0
Nº 2	0,0	0,0	36,35
Nº 3	4,40	12,53	0,0
Nº 4	4,40	12,53	36,35

La Figura 1 muestra las valoraciones de proteína observadas los días 8 y 10 del cultivo. Estos datos indican que la adición de tirosina y de cisteína al Medio de Alimentación A aumenta la valoración de proteína. Por tanto, la adición de cisteína y tirosina a un medio de alimentación puede ser ventajosa. Así pues, los métodos para conservar estos componentes del medio en solución pueden ser ventajosos, particularmente para grandes volúmenes de medios de alimentación y/o en situaciones en las que es más conveniente preparar medios de alimentación un poco antes de su uso real.

#### Ejemplo 2: altas concentraciones de piruvato estabilizan los medios de alimentación concentrados que contienen tirosina, cisteína y cistina

El Medio de Alimentación B es un medio de alimentación concentrado. Contiene todos los ingredientes indicados en la Tabla 1 con los intervalos de concentración indicados en la Tabla 1 excepto los siguientes ingredientes, que no forman parte del Medio de Alimentación B: arginina, glucosa (que se añadió al cultivo por separado) y nitrato férrico. El Medio de Alimentación B contiene cistina 1 mM, tirosina 3,03 mM, piruvato sódico 3,5 mM y cisteína 7 mM. El Medio de Alimentación B requiere calentamiento a 45 °C para disolver todos los componentes del medio y

típicamente forma un precipitado tras la conservación durante algunos días a temperatura ambiente o a una temperatura de 4-8 °C. Esta característica hace que su uso sea sin duda muy poco conveniente, si no potencialmente impracticable, especialmente en un cultivo comercial a gran escala para la producción de un compuesto biológico.

5

Para superar los problemas de insolubilidad e inestabilidad, la tirosina y la cistina se eliminaron del Medio de Alimentación B. El medio resultante, Medio de Alimentación C, no requiere calentamiento para disolverse y no precipita a los 28 días de conservación a una temperatura de 4°C. Por tanto, la tirosina y/o cistina son posiblemente responsables de la insolubilidad e inestabilidad del Medio de Alimentación B.

10

Para determinar si el piruvato podría estabilizar el Medio de Alimentación B se añadieron diversas concentraciones de piruvato sódico al Medio de Alimentación B. Los medios se conservaron a una temperatura de 4-8 °C y después se comprobaron para determinar su estabilidad los días 3, 6 y 8, siendo el día 0 el día en el que se prepara el medio y siendo el día 1 el siguiente día. El volumen de cada muestra fue de 50 ml. La siguiente Tabla 3 muestra las

15

**Tabla 3: Concentraciones de los componentes del medio y estabilidad de los medios**

Cisteína (mM)	Cistina (mM)	Tirosina (mM)	Piruvato (mM)
7,0	1,0	3,03	3,50
7,0	1,0	3,03	11,36
7,0	1,0	3,03	14,00
7,0	1,0	3,03	19,27
7,0	1,0	3,03	35,00

El día 3, la muestra que contenía piruvato 3,5 mM contenía más precipitado que cualquier otra, seguido de la muestra que contenía piruvato 11,36 mM y de la muestra que contenía piruvato 14 mM. Las muestras que contenían piruvato 19,27 y 35 mM no contenían precipitado después de una semana de conservación. Sin embargo, la muestra que contenía piruvato 19,27 mM contenía un precipitado que se eliminó algunas semanas más tarde. La muestra que contenía piruvato 35 mM aún carecía de precipitado en este momento. Estos datos indican que una concentración de 19,27 mM es adecuada para estabilizar el Medio de Alimentación B durante al menos una semana y que una concentración de piruvato 35 mM puede estabilizar el Medio de Alimentación B algo más de una semana.

25

### Ejemplo 3: estabilización de un medio de alimentación que contiene tirosina y cisteína

Para producir un medio estable que contuviese tirosina, se añadieron diversas concentraciones de piruvato y tirosina al Medio de Alimentación C. Estas concentraciones se muestran en la siguiente Tabla 4. El Medio de Alimentación C, contiene todos los ingredientes indicados en la Tabla 1 dentro de los intervalos de concentración indicados en la Tabla 1 excepto en los siguientes ingredientes, que no forman parte del Medio de Alimentación C: arginina, cistina, glucosa (que se añadió al cultivo por separado), nitrato férrico y tirosina. Por tanto, como se ha mencionado anteriormente, la única diferencia entre los Medios de Alimentación B y C es la ausencia de cistina y tirosina en el

35

Medio de Alimentación C. La concentración de cisteína en el Medio de Alimentación C es de 7 mM. La estabilidad durante la conservación se sometió a ensayo. Los medios se conservaron a una temperatura de 4-8 °C. Los medios se evaluaron para determinar la precipitación por inspección visual los días 0, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23 y 28, siendo el día 0 el día en el que se prepararon los medios, siendo el día 1 el primer día después de esto, el día 2 el segundo día después de esto, etc. Las muestras de los medios calificadas como "ninguno", en la columna de la derecha de la Tabla 4, no contenían ningún precipitado durante el transcurso de este experimento, es decir, durante 28 días. Para las muestras que precipitaron durante el transcurso del experimento, en la columna de la derecha de la Tabla 4 se registra el primer día en el que se observa precipitado.

45

**Tabla 4: Efectos estabilizantes del piruvato sódico a diversas concentraciones de tirosina**

Medios	Concentración de tirosina (mM)	Concentración de piruvato sódico (mM)	Primer día en el que se observa precipitado
Medio de Alimentación C	0	3,5	Ninguno
Medio de Alimentación C	3,03	3,5	Ninguno
Medio de Alimentación C	3,03	35,0	Ninguno
Medio de Alimentación C	4,40	3,5	19
Medio de Alimentación C	4,40	35,0	Ninguno
Medio de Alimentación C	5,74	3,5	9
Medio de Alimentación C	5,74	35,0	6

Estos datos indican que el piruvato sódico a una concentración de 35 mM estabiliza el Medio de Alimentación C

cuando este contiene tirosina a una concentración de 4,4 mM, mientras que la menor concentración de piruvato de 3,5 mM no lo hace. Sin embargo, la adición de tirosina a una concentración de 3,03 mM no desestabiliza el medio, e incluso el medio de alimentación que contiene tirosina a una concentración de 4,4 mM era estable durante un período de tiempo considerable cuando este contenía piruvato a una concentración de 3,5 mM. Ninguna concentración de piruvato sometida a ensayo estabilizó el medio que contenía tirosina a una concentración de 5,74 mM.

**Ejemplo 4: efectos de la cisteína, cistina, tirosina, piruvato y temperatura de conservación sobre la estabilidad del medio**

10

El siguiente experimento explora interacciones de diversos parámetros y sus efectos sobre la estabilidad del Medio de Alimentación C. Se preparó el Medio de Alimentación C (descrito en los Ejemplos 2 y 3) y se añadieron, o no, tirosina, piruvato sódico, cisteína y cistina a diversas muestras de medios. Todos los medios se mezclaron a temperatura ambiente. La estabilidad se evaluó a temperatura ambiente o a una temperatura de 4-8 °C. Para determinar la formación de precipitado, las muestras se inspeccionaron visualmente los días 0, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 20, 23 y 26 de la conservación. La siguiente Tabla 5 indica las temperaturas de conservación (indicando "TA" temperatura ambiente) y las concentraciones de cisteína, cistina, tirosina y piruvato sódico en cada muestra. Las muestras se clasificaron según precipitado como se explica en el Ejemplo 3, excepto que donde se indica "ninguno", en la columna de la derecha, significa que no hubo precipitado durante los 26 días (en lugar de los 28 días) del transcurso del experimento.

15

20

**Tabla 5: Estabilidad y composición de los medios**

L-cisteína (mM)	L-tirosina (mM)	Piruvato sódico (mM)	L-cistina (mM)	Temperatura de conservación	pH	Osmolaridad (mOsm)	Primer día en el que se observa precipitado
7,0	0,0	3,5	0,0	TA	6,52	238	Ninguno
7,0	0,0	35,0	1,0	TA	6,19	294	Ninguno
7,0	4,4	3,5	1,0	TA	7,06	252	2
7,0	4,4	35,0	0,0	TA	6,87	307	Ninguno
16	0,0	3,5	1,0	TA	6,01	263	2
16	0,0	35,0	0,0	TA	6,01	303	Ninguno
16	4,4	3,5	0,0	TA	6,48	271	2
16	4,4	35,0	1,0	TA	6,01	308	Ninguno
7,0	0,0	3,5	1,0	4-8°C	6,52	238	2
7,0	0,0	35,0	0,0	4-8°C	6,31	283	Ninguno
7,0	4,4	3,5	0,0	4-8°C	7,11	250	Ninguno
7,0	4,4	35,0	1,0	4-8°C	6,83	289	Ninguno
16	0,0	3,5	0,0	4-8°C	6,26	256	2
16	0,0	35,0	0,0	4-8°C	6,01	299	Ninguno
16	4,4	3,5	1,0	4-8°C	6,39	262	2
16	4,4	35,0	0,0	4-8°C	6,01	317	Ninguno
7,0	0,0	3,5	1,0	4-8°C	6,51	237	2
7,0	0,0	35,0	1,0	4-8°C	6,32	284	Ninguno
7,0	4,4	3,5	0,0	4-8°C	7,07	252	23
7,0	4,4	35,0	0,0	4-8°C	6,81	294	Ninguno
16	0,0	3,5	1,0	4-8°C	6,45	259	2
16	0,0	35,0	1,0	4-8°C	6,11	300	Ninguno
16	4,4	3,5	0,0	4-8°C	6,37	266	2
16	4,4	35,0	1,0	4-8°C	6,01	316	Ninguno
7,0	0,0	3,5	1,0	4-8°C	6,55	242	Ninguno
7,0	0,0	35,0	0,0	4-8°C	6,19	296	Ninguno
7,0	4,4	3,5	0,0	4-8°C	7,04	253	2
7,0	4,4	35,0	1,0	4-8°C	6,84	315	Ninguno
16	0,0	3,5	1,0	4-8°C	6,01	260	2
16	0,0	35,0	0,0	4-8°C	6,01	304	Ninguno
16	4,4	3,5	1,0	4-8°C	6,48	269	2
16	4,4	35,0	0,0	4-8°C	6,01	310	Ninguno

25

Los datos se introdujeron en el programa informático JMP® (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte) y dieron lugar a las Figuras 2A y 2B. Las figuras 2A y 2B y la Tabla 4 hace obvia una serie de tendencias en los datos. En primer lugar, los medios fueron aproximadamente igualmente estables a temperatura ambiente o a temperatura de enfriamiento, es decir, 4-8 °C. La presencia o ausencia de tirosina dentro del intervalo sometido a ensayo, es decir, 0,0 mM o 4,4 mM, tuvo escaso, o ningún, efecto sobre la estabilidad del medio. Sin embargo, mayores concentraciones de cisteína, cistina o una combinación de las dos, condujo a la precipitación de los medios a

concentraciones bajas (3,5 mM) pero no altas (35 mM) de piruvato sódico. Por tanto, la adición de mayores concentraciones de piruvato sódico pueden estabilizar los medios que contienen mayores concentraciones de cisteína y/o cistina sometidas a ensayo en este experimento.

**5 Ejemplo 5: Efectos estabilizantes del Piruvato sobre el Medio de Alimentación A**

Usando la parte del Diseño del Experimento (DOE) del programa informático JMP® (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte), se diseñó un experimento para medir la estabilidad del Medio A (descrito anteriormente en el Ejemplo 1) con diversas cantidades de cistina, cisteína, tirosina y piruvato sódico añadidas. El experimento sometió a ensayo los efectos de (1) concentración de cistina de 0,0 y 1,12 mM, (2) concentración de tirosina de 0,0, 3,83 y 4,59 mM, (3) concentración de cisteína de 0,0, 6,83 y 12,53 mM, (4) concentración de piruvato sódico de 4,54, 9,09, 18,18 y 36,35 mM y (5) todas las posibles combinaciones de las mismas sobre la estabilidad del medio. Los medios se prepararon a temperatura ambiente y su estabilidad se evaluó a 4-8 °C los días 0, 2, 4, 6, 9, 12, 14, 16, 19 y 21. La estabilidad se registra en la siguiente Tabla 6, como se explicó en el Ejemplo 3. Las muestras indicadas como "ninguno" no presentaron precipitaron el día 21, día en el que finalizó el experimento.

**Tabla 6: Estabilidad del Medio de Alimentación A con diversos aditivos**

Cistina (mM)	Tirosina (mM)	Cisteína (mM)	Piruvato sódico (mM)	pH	Osmolaridad (mOsm)	Primer día en el que se observa precipitado
1,12	0	0	4,54	6,99	299	ninguno
0	0	0	4,54	6,67	287	ninguno
1,12	3,83	0	4,54	7,01	296	ninguno
0	4,59	0	4,54	6,99	300	ninguno
1,12	4,59	0	4,54	6,98	283	2
0	0	6,83	4,54	7,00	300	2
1,12	0	6,83	4,54	6,97	300	ninguno
0	3,83	6,83	4,54	6,97	293	4
1,12	3,83	6,83	4,54	7,01	288	ninguno
0	4,59	6,83	4,54	7,00	294	2
1,12	4,59	6,83	4,54	6,99	297	2
0	0	12,53	4,54	6,99	300	2
1,12	0	12,53	4,54	6,95	292	6
0	3,83	12,53	4,54	6,94	288	2
1,12	3,83	12,53	4,54	7,05	300	4
0	4,59	12,53	4,54	6,92	291	2
1,12	4,59	12,53	4,54	6,94	305	2
0	0	0	9,09	6,94	302	2
1,12	0	0	9,09	6,99	299	Ninguno
0	3,83	0	9,09	6,93	293	Ninguno
1,12	3,83	0	9,09	7,01	309	Ninguno
0	4,59	0	9,09	6,99	304	Ninguno
1,12	4,59	0	9,09	6,94	303	4
0	0	6,83	9,09	6,99	308	2
1,12	0	6,83	9,09	7,02	303	Ninguno
0	3,83	6,83	9,09	7,01	293	4
1,12	1,12	6,83	9,09	6,89	294	Ninguno
0	4,59	12,53	9,09	6,98	302	2
1,12	4,59	12,53	9,09	6,95	306	2
0	0	12,53	9,09	7,01	300	2
1,12	0	12,53	9,09	6,97	299	21
0	3,83	12,53	9,09	6,99	303	2
1,12	3,83	12,53	9,09	6,99	307	6
0	4,59	12,53	9,09	7,01	310	2
1,12	4,59	12,53	9,09	6,99	311	2
0	0	12,53	9,09	7,00	312	2
1,12	0	0	9,09	6,97	310	ninguno
0	3,83	0	9,09	7,02	312	ninguno
1,12	3,83	0	9,09	6,99	317	ninguno
0	4,59	0	9,09	6,98	303	2
1,12	4,59	0	9,09	7,02	316	2
0	0	0	9,09	7,03	296	ninguno
1,12	0	0	9,09	6,97	303	6

Cistina (mM)	Tirosina (mM)	Cisteína (mM)	Piruvato sódico (mM)	pH	Osmolaridad (mOsm)	Primer día en el que se observa precipitado
0	3,83	6,83	9,09	7,02	316	Ninguno
1,12	3,83	6,83	9,09	7,03	310	4
0	4,59	6,83	9,09	6,98	309	4
1,12	4,59	6,83	9,09	6,98	313	2
0	0	12,53	9,09	7,05	315	Ninguno
1,12	0	12,53	18,18	6,98	307	6
0	3,83	12,53	18,18	6,97	312	21
1,12	3,83	12,53	18,18	7,01	315	4
0	4,59	12,53	18,18	7,00	320	2
1,12	4,59	12,53	18,18	7,02	318	2
0	0	0	36,35	6,97	330	ninguno
1,12	0	0	36,35	6,97	342	ninguno
0	3,83	0	36,35	7,00	348	ninguno
1,12	3,83	0	36,35	6,98	347	ninguno
0	4,59	0	36,35	6,98	343	6
1,12	4,59	0	36,35	7,00	346	4
0	0	6,83	36,35	7,04	331	ninguno
1,12	0	6,83	36,35	7,01	357	ninguno
0	3,83	6,83	36,35	6,97	349	ninguno
1,12	3,83	6,83	36,35	7,02	351	ninguno
0	4,59	6,83	36,35	7,05	349	4
1,12	4,59	6,83	36,35	7,02	360	4
0	0	12,53	36,35	6,98	315	ninguno
1,12	0	12,53	36,35	6,94	344	ninguno
0	3,83	12,53	36,35	6,99	350	ninguno
1,12	3,83	12,53	36,35	7,00	348	ninguno
0	4,59	12,53	36,35	6,98	357	4
1,12	4,59	12,53	36,35	6,99	354	4

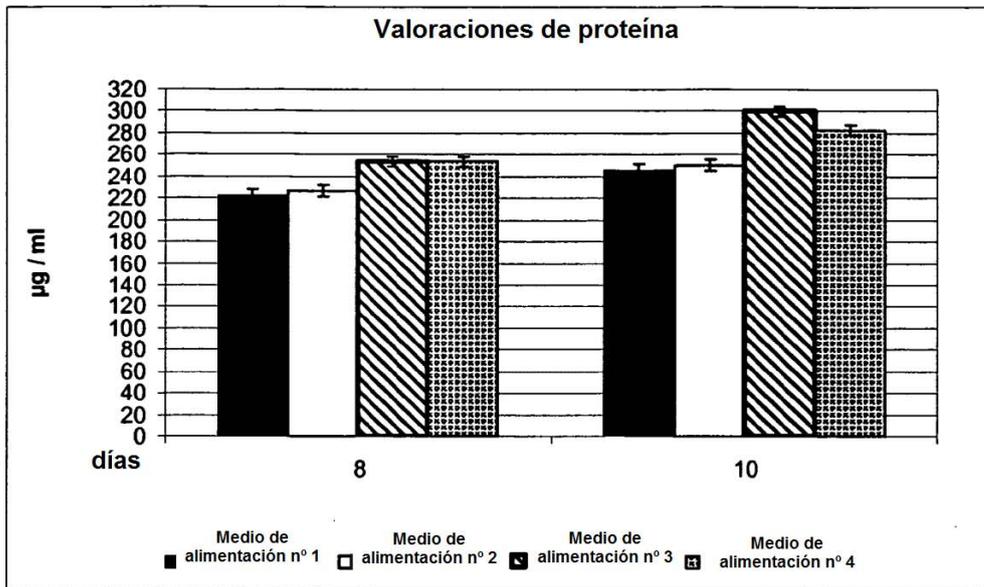
Las Figuras 3 A y 3B y la Tabla 6 ponen de manifiesto algunos aspectos de los datos. En primer lugar, altos niveles de cistina, cisteína o de tirosina aumentan la precipitación. Sin embargo, la adición de la concentración más alta de piruvato sódico sometida a ensayo (36,36 mM) inhibió la precipitación asociada con la cistina o cisteína y la mayoría de las concentraciones de tirosina sometidas a ensayo, mientras que menores concentraciones de piruvato sometidas a ensayo no fueron tan eficaces en la estabilización de los medios. La adición de piruvato a una concentración de 9,09 ó 18,18 mM estabilizó algunas muestras en comparación con muestras que contenían una concentración de piruvato de 4,53 mM. Sin embargo, incluso una concentración de piruvato sódico de 36,35 mM no estabilizó los medios que contenían una concentración de tirosina de 4,59 mM.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para estabilizar un medio de alimentación concentrado para alimentar un cultivo de células de mamífero que comprende incluir en el medio de alimentación piruvato a una concentración de al menos aproximadamente 25 mM,  
5 donde el medio de alimentación comprende cisteína y/o cistina, donde la suma de las concentraciones de cisteína y/o cistina es de al menos aproximadamente 7,9 mM,  
donde el pH del medio de alimentación es de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4,  
10 donde el medio de alimentación comprende tirosina y la concentración de tirosina no es más de aproximadamente 4,4 mM, y  
donde el medio de alimentación con el piruvato incluido es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 1 semana.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende incluir en el medio de alimentación piruvato a una  
15 concentración de al menos aproximadamente 35 mM.
3. El método de reivindicación 1, que comprende incluir en el medio de alimentación piruvato a una concentración de al menos aproximadamente 30 mM.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el pH del medio de alimentación es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el medio de alimentación comprende al menos aproximadamente cisteína a una concentración de 6,0 mM.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, donde el medio de alimentación comprende cisteína a una concentración de al menos aproximadamente 12,0 mM.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el medio de alimentación comprende tirosina a una concentración de al menos aproximadamente 3 mM.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en que el medio de alimentación es aséptico.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde  
35 el medio de alimentación comprende un hidrolizado proteico;  
el medio de alimentación tiene una osmolaridad de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 1000 mOsm; y/o  
el medio de alimentación comprende cistina a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM
- 40 10. El método de la reivindicación 1,  
donde en el medio de alimentación se incluye piruvato sódico a una concentración de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mM,  
donde el medio de alimentación comprende tirosina a una concentración de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 4 mM,  
45 donde el medio de alimentación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 2 semanas,  
donde el medio de alimentación no comprende cistina y  
donde el medio de alimentación comprende cisteína a una concentración de al menos aproximadamente 12 mM.
- 50 11. Un medio de alimentación para un cultivo de células de mamífero que comprende piruvato a una concentración de al menos aproximadamente 25 mM y cisteína a una concentración de al menos aproximadamente 5 mM,  
donde el medio de alimentación puede comprender o no cistina,  
donde la suma de las concentraciones de cisteína y cistina es de al menos aproximadamente 7,9 mM,  
55 donde el pH del medio de alimentación es de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 7,4,  
donde la concentración de tirosina es no superior a aproximadamente 4,4 mM, y  
donde medio es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 1 semana.
12. El medio de alimentación de la reivindicación 11, donde  
60 (a) el pH del medio de alimentación es de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,2;  
(b) el medio de alimentación comprende una concentración de cisteína de al menos aproximadamente 12,0 mM;  
(c) el medio de alimentación que comprende una concentración de tirosina de al menos aproximadamente 3 mM;  
(d) el medio de alimentación es aséptico; y/o  
65 (e) el medio de alimentación tiene una osmolaridad de aproximadamente 200 mOsm a aproximadamente 1000

mOsm.

13. El medio de alimentación de las reivindicaciones 11 ó 12, donde el medio de alimentación comprende piruvato a una concentración de al menos aproximadamente 30 mM.
- 5 14. El medio de alimentación de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el cultivo de células de mamífero es un cultivo de células CHO y donde el piruvato es piruvato sódico.
- 10 15. Uso del medio de alimentación de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, para producir una proteína que comprende cultivar en un medio de base las células de mamífero que producen la proteína, alimentar el cultivo con dicho medio y recuperar la proteína del medio de cultivo.



**Figura 1**

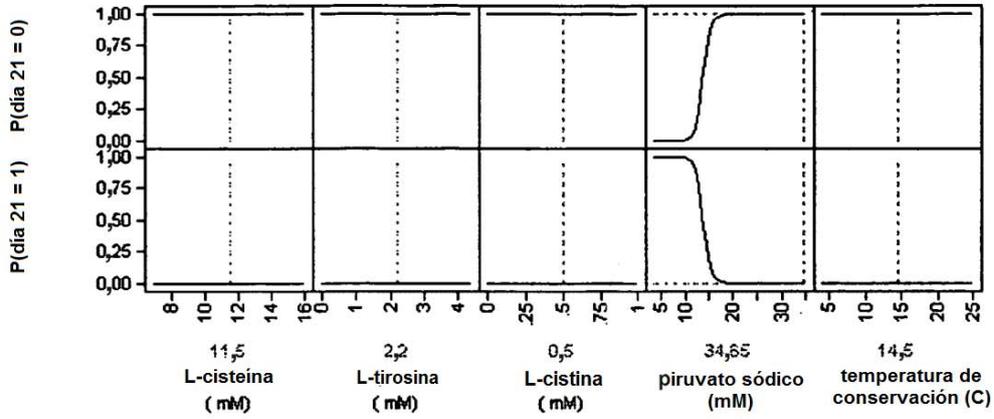


Figura 2A

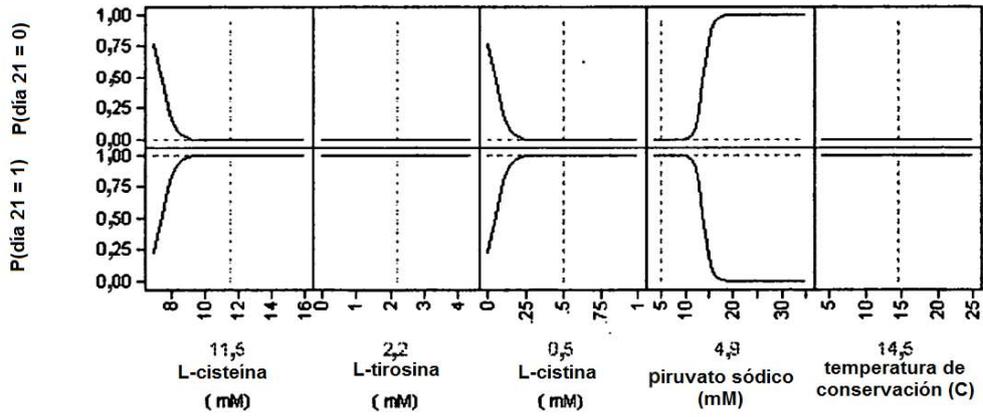


Figura 2B

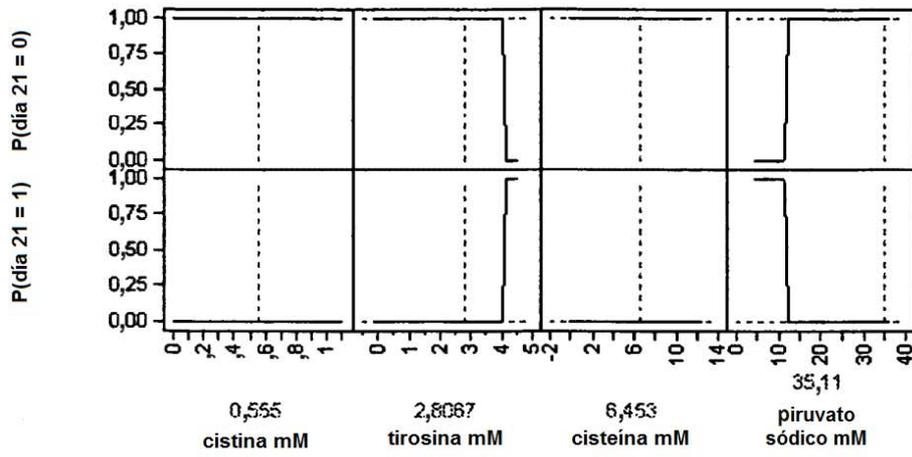


Figura 3A

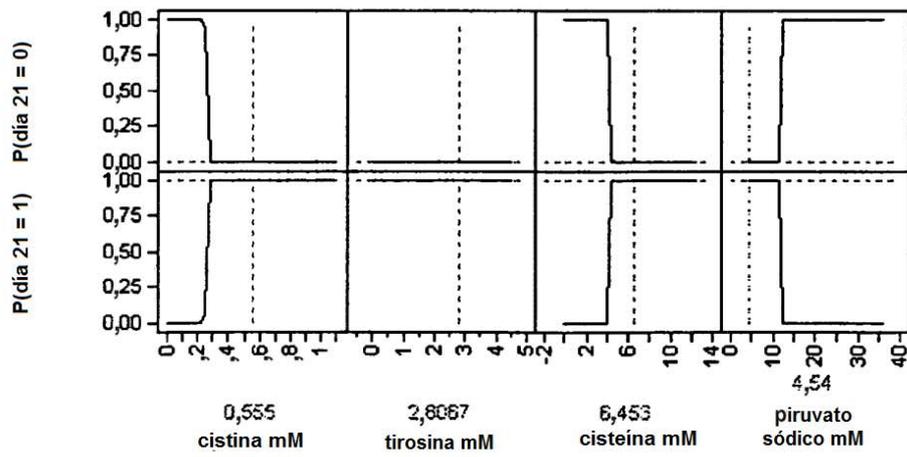


Figura 3B

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- US 91756907 P [0001]
- US 5672502 A [0003] [0021]
- WO 0310661 A [0005]
- US 5272071 A, Chappel [0019]
- WO 0127299 A [0034]
- WO 94283911 A [0035]
- US 6087329 A [0035]
- WO 0136637 A [0035] [0036] [0041]
- WO 9701633 A [0035]
- AU 588819 [0035]
- US 6204363 B [0035]
- US 4695623 A [0035]
- US 4897471 A [0035]
- US 5395760 A [0036] [0041]
- US 5610279 A [0036]
- EP 0460846 A [0036] [0045] [0049]
- US 4968607 A [0036] [0045] [0049]
- US 5767064 A [0036]
- US 6337072 B [0036]
- US 5981713 A [0036]
- US 6096728 A [0036]
- US 5075222 A [0036]
- EP 0367566 A [0036] [0048] [0049]
- US 5856296 A [0036]
- US 6271349 B [0036]
- US 6015938 A [0036]
- WO 0183525 A [0039]
- WO 0024782 A [0039]
- US 5272064 A [0039]
- US 5149792 A [0039]
- US 6235883 B1 [0039]
- WO 9410308 A [0041]
- US 4965195 A [0045] [0049]
- EP 367566 A [0045]
- US 6312951 B1 [0047]
- US 6027915 B1 [0047]
- US 6309841 B1 [0047]
- WO 0127299 A1 [0048]
- US 5122469 A, Mather [0052]
- US 5633162 A, Keen [0052]
- US 4235871 A [0063]
- US 4501728 A [0063]
- US 4837028 A [0063]
- US 4737323 A [0063]
- US 6036978 A [0063]

10

## Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- KAUFMAN et al. *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 185, 487-511 [0019]
- Current Protocols in Molecular Biology. Wiley & Sons, 1998 [0019]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, vol. 1-3 [0019]
- SEGAL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96 (6), 2758-63 [0019]
- NEURATH et al. *The Proteins*. Academic Press, 1979 [0020]
- DEVEREUX et al. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387 [0020]
- GRIBSKOV ; BURGESS. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 6745 [0020]
- Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, 1979, 353-358 [0020]
- CHU ; ROBINSON. *Current Opin. Biotechnol.*, 2001, vol. 12, 180-87 [0021]
- THE MERCK INDEX. Merck & Co., Inc, 1996, 471, 9971 [0025]
- THE MERCK INDEX. 470-71 [0025]
- MCMAHAN et al. *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 2821 [0034]
- MAISONPIERRE et al. *Science*, 1997, vol. 277 (5322), 55-60 [0035]
- RÜEGG ; PYTELA. *Gene*, 1995, vol. 160, 257-62 [0035]
- Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research. Blackwell Sciences, 1998, vol. II [0035]
- Growth Factors: A Practical Approach. Oxford University Press Inc, 1993 [0035]
- The Cytokine Handbook. Academic Press, 1991 [0035]
- Proceedings of the VIth International Workshop and Conference. Leukocyte Typing VI. 1996 [0037]
- DO ; CHEN-KIANG. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, vol. 13 (1), 19-25 [0039]
- LOVEJOY et al. *Science*, 1993, vol. 259, 1288-1293 [0041]
- HARBURY et al. *Science*, 1993, vol. 262, 1401-05 [0041]