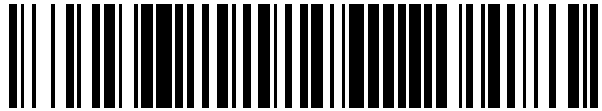


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 217**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2008 E 08746528 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 2139987**

54 Título: **Procedimientos de producción de proteínas usando compuestos antisenescencia**

30 Prioridad:

23.04.2007 US 913382 P

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

30.09.2013

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:

**GOMES, JOSE MANUEL;
LUAN, YEN-TUNG;
HILLER, GREGORY WALTER y
WANG, WENGE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 424 217 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

Procedimientos de producción de proteínas usando compuestos antisenescencia

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La solicitud está en trámite junto con, comparte al menos un inventor común con y reivindica beneficio de prioridad de, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número 60/913.382, presentada el 23 de abril de 2007.

Antecedentes de la invención

10 La presente divulgación se refiere, en general, a la producción de proteínas en cultivos de células de mamífero. Particularmente, la presente divulgación se refiere a cultivar células de mamífero en presencia de un compuesto antisenescencia, por ejemplo carnosina, para mantener la viabilidad y aumentar la productividad con calidad superior. El cultivo de células ha producido muchos productos proteicos. Estos productos, tales como anticuerpos monoclonales producidos por hibridoma, pueden usarse para terapia, investigación u otras aplicaciones. Se usan con frecuencia células animales, notablemente células de mamífero, para producir proteínas. Desafortunadamente, el uso de células animales provoca que el procedimiento de producción consuma tiempo y sea costoso.

15 Añadir un agente químico a un medio de cultivo celular puede aumentar la productividad celular induciendo que las células produzcan un producto, aumentando de este modo el rendimiento global. El agente óptimo para usar varía dependiendo de varios factores, incluyendo el producto proteico deseado y el tipo celular. Factores similares también afectan a la cantidad del agente seleccionado añadido y cuándo se añade el agente al medio de cultivo celular. Son ejemplos de agentes ácidos alcanoicos o sales, derivados de urea, o dimetilsulfóxido (DMSO). Los agentes químicos, tales como butirato sódico pueden tener diversos efectos en la producción proteica. La adición de un agente puede aumentar la productividad específica de las células, pero también puede tener efectos citotóxicos y puede inhibir el crecimiento y la viabilidad celular.

20 A medida que las células producen una proteína, típicamente, la proteína se secreta al medio de cultivo celular. La proteína específica, sin embargo, no es la única materia en el medio; también se encuentran con frecuencia en el medio agregados de alto peso molecular, especies ácidas y otros materiales, que pueden hacer el procedimiento de purificación más laborioso y costoso. Están disponibles técnicas y procedimientos para mejorar la calidad del producto, que permiten purificación proteica más eficaz; incluyendo, entre otros, alterar las condiciones del biorreactor o usar una línea celular diferente. Sin embargo, sigue existiendo no obstante la necesidad en el campo de técnicas y procedimientos de producción proteica que conduzcan a procedimientos de purificación mejorados.

25 Por lo tanto, lo que se necesita es un agente químico que se añada al medio de cultivo celular que pueda potenciar la expresión de una proteína de interés manteniendo a la vez alta viabilidad celular. Lo que se necesita además es un agente que aumente la calidad de producto de la proteína reduciendo la cantidad de agregados de alto peso molecular y especies ácidas en el medio de cultivo celular.

Sumario de la invención

35 En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para producción potenciada de un producto proteico. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para cultivar células huésped que expresan una proteína de interés en un medio que comprende un compuesto antisenescencia de modo que se potencie la producción global de la proteína de interés. En ciertas realizaciones, dicho compuesto antisenescencia comprende carnosina.

40 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que potencian la producción de una proteína de interés. Puede producirse cualquiera de una diversidad de proteínas de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se usan procedimientos y composiciones de la presente invención para producir un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se usan procedimientos y composiciones de la presente invención para producir un receptor, opcionalmente ligado con uno o más restos proteicos adicionales. Por ejemplo, pueden usarse procedimientos y composiciones de la presente invención para producir una proteína de fusión TNFR.

45 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un medio de cultivo celular que comprende un compuesto antisenescencia que potencia la producción de una proteína de interés expresada en una célula huésped en el que dicho compuesto de senescencia se selecciona del grupo que consiste en carnosina, acetilcarnosina, homocarnosina, anserina y beta alanina. En ciertas realizaciones, dicho compuesto antisenescencia comprende carnosina. En ciertas realizaciones, se combinan células huésped manipuladas genéticamente con un medio de inóculo para formar un medio de cultivo celular, que se cultiva en un biorreactor. Durante un ciclo de producción del producto proteico deseado, las condiciones del biorreactor pueden alterarse y/o pueden añadirse complementos para aumentar la productividad y/o mantener la viabilidad. Los complementos pueden incluir un medio de alimentación y/o uno o más aditivos tales como, en la presente divulgación, carnosina y/u otros compuestos antisenescencia seleccionados de acetilcarnosina, homocarnosina, antiserina y beta alanina.

Las células huésped de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster Chino (CHO), pueden experimentar una reducción de la viabilidad cerca del final de un ciclo de producción en un biorreactor. Se ha descubierto que la adición de un agente antisenescencia tal como carnosina y análogos de la misma, a un medio de cultivo celular ayuda a mantener un mayor número de células viables y viabilidad celular hasta que se recoja la proteína.

5 Además, pueden usarse procedimientos para aumentar la productividad, tales como alterar la temperatura después de la fase de crecimiento y/o durante la fase de producción del ciclo de producción de acuerdo con la presente invención. Para proporcionar solamente un ejemplo, durante la producción de un producto proteico, específicamente el anticuerpo para factor de diferenciación de crecimiento 8 (GDF-8), la temperatura se desplazó hacia abajo para ayudar a iniciar y aumentar la productividad. En ciertas realizaciones, la adición de un compuesto antisenescencia tal como carnosina ayuda a aumentar la productividad del cultivo celular. En ciertas realizaciones, un compuesto antisenescencia seleccionado del grupo que consiste en carnosina, acetilcarnosina, homocarnosina, antiserina y beta alanina puede añadirse antes, durante y/o después de dicho desplazamiento de temperatura.

10 También se ha descubierto que la adición de un compuesto antisenescencia tal como carnosina a un medio de cultivo celular aumenta la calidad global del producto proteico. Durante la producción de la proteína, hay en el medio de cultivo celular agregados de alto peso molecular, junto con otras especies no deseadas. La adición de carnosina reduce la cantidad de agregados moleculares altos y aumenta la calidad del producto.

15 La concentración de compuesto antisenescencia (por ejemplo, carnosina) añadido al medio de cultivo celular puede variar dependiendo de muchos factores del procedimiento, incluyendo, por ejemplo, el tipo celular, el producto deseado y las condiciones del biorreactor, entre otros. Además, la carnosina puede sustituirse con sus análogos; acetilcarnosina, homocarnosina, anserina y beta alanina. En ciertas realizaciones, se proporciona carnosina en combinación con uno o más compuestos antisenescencia. En ciertas realizaciones, la concentración de agente antisenescencia (por ejemplo, carnosina) en un medio de cultivo celular es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, la concentración es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM. En ciertas realizaciones, la concentración es de aproximadamente 20 mM.

20 Puede usarse cualquier procedimiento de cultivo adecuado y medio de inóculo para cultivar las células en el procedimiento de producción proteica. Puede usarse tanto suero como medio sin suero. Además, pueden usarse procedimientos de cultivo para cultivar las células según sea apropiado para el tipo celular y el producto proteico específicos. Dichos procedimientos se conocen y se entienden por los expertos en la materia de cultivo celular.

25 Otras características y ventajas de la divulgación resultarán evidentes a partir de la descripción siguiente y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1a. Efecto de Carnosina en Picos Ácidos para MYO-29.

Figura 1 b. Efecto de Carnosina en Agregados de Alto Peso Molecular.

Figura 1c. Efecto de Adiciones de Carnosina en Días Diferentes en Picos Ácidos.

35 Figura 1d. Efecto de Adiciones de Carnosina en Días Diferentes en Agregados de Peso Molecular Alto.

Figura 2a. Efecto de Carnosina en la Densidad Celular Viable Diaria.

Figura 2b. Efecto de Carnosina en la Viabilidad Celular Diaria.

Figura 2c. Efecto de Carnosina en el Título Diario.

40 Figura 2d. Efecto de Carnosina en la Productividad Celular Específica Acumulada. Las barras en los días 12 y 14 representan, de izquierda a derecha: Control A Alimentación D10, Carnosina 20 mM Alimentación D10, Control B Alimentación D10, Carnosina 20 mM (Sin Alimentación D10), y Control C (Sin Alimentación D10).

Figura 2e. Efecto de la Carnosina en Agregados de Alto Peso Molecular. Las barras en los días 12 y 14 representan, de izquierda a derecha: Control A Alimentación D10, Carnosina 20 mM Alimentación D10, Control B Alimentación D10, Carnosina 20 mM (Sin Alimentación D10), y Control C (Sin Alimentación D10).

45 Figura 3a. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en la Densidad Celular Viable.

Figura 3b. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en la Viabilidad Celular Diaria.

Figura 3c. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en el Título Diario.

Figura 3d. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en la Productividad Celular Específica Acumulada. Las barras representan, de izquierda a derecha: Control P2, Control P5, Carnosina 20 mM y Carnosina 40 mM.

50 Figura 3e. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en Agregados de Alto Peso Molecular. Las barras

representan, de izquierda a derecha: Control P2, Control P5, Carnosina 20 mM y Carnosina 40 mM.

Figura 4. Perfiles de Densidad Celular Viable de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medio que Contiene o Carece de Carnosina. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

5 Figura 5. Perfiles de Viabilidad Celular de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medio que Contiene o Carece de Carnosina. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

Figura 6. Efecto de la Carnosina en el Porcentaje de Proteína de Fusión TNFR Mal Agregada/Plegada . La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

10 Figura 7. Efecto de Carnosina en el Porcentaje de Agregados de Alto Peso Molecular (HMW) Producidos por una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

15 Figura 8. Perfiles de Títulos de Producto de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medio que Contiene o Carece de Carnosina. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

Figura 9. Perfiles de Productividad Celular Específica de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medio que Contiene o Carece de Carnosina. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

20 Figura 10. Perfiles de Sialilación Totales, Expresados como un Porcentaje de Material de Referencia, o Proteína de Fusión TNFR Recombinante Producida por una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) Cultivada en Medio que Contiene o Carece de Carnosina. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

25 Figura 11. Distribución de Oligosacáridos Ligados a N Sialilados, Expresados como un Porcentaje de Oligosacáridos Ligados a N Totales, de Proteína de Fusión TNFR Recombinante Producida por una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) en Medio que Contiene o Carece de Carnosina. La Condición de Control es la Media de 4 Ciclos de Biorreactor de Control.

DEFINICIONES

30 Siguiendo una convención muy extendida, el término “un” significa “uno o más” cuando se usa en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Incluso aunque la invención se ha descrito con un cierto grado de particularidad, resulta evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones estarán claras para los expertos en la materia a la luz de la divulgación. En consecuencia, se pretende que todas dichas alternativas, modificaciones y variaciones, que quedan dentro del espíritu y alcance de la invención, estén incluidas en las reivindicaciones definidas.

35 La expresión “compuesto antisenescencia” como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en carnosina, acetilcarnosina, homocarnosina, anserina y beta alanina que, cuando se añade a un cultivo celular, promueve la viabilidad, crecimiento y/o esperanza de vida de una célula cultivada en el mismo. En ciertas realizaciones, el uso de dicho compuesto antisenescencia en cultivo celular da como resultado aumento de título, aumento de la productividad específica de célula, reducción de la acumulación de agregados de alto peso molecular y/o reducción de la acumulación de especies ácidas que se observarían en condiciones de cultivo de otro modo idénticas que carecen del compuesto antisenescencia. En ciertas realizaciones, pueden usarse dos o más compuestos antisenescencia de acuerdo con composiciones y procedimientos de la presente invención.

45 La expresión “célula huésped” se refiere a células que pueden manipularse genéticamente y/o son capaces de crecimiento y supervivencia en un medio de cultivo celular. Típicamente, las células pueden expresar una gran cantidad de una proteína endógena o heteróloga de interés y pueden conservar la proteína o secretarla al medio de cultivo celular.

50 Las células huésped son típicamente “células de mamífero”, que comprenden los ejemplos no limitantes de células de vertebrado, incluyendo células de riñón de cría de hámster (BHK), ovario de hámster Chino (CHO), riñón humano (293), diploide de rhesus fetal normal (Brh1.2) y mieloma murino (por ejemplo, SP2/0 y NS0). Un experto en la materia será consciente de otras células huésped que pueden usarse de acuerdo con procedimientos y composiciones de la presente invención. Se excluyen células madre embrionarias humanas de la presente invención.

La expresión “medio de cultivo celular” se refiere a una solución que contiene nutrientes para apoyar la supervivencia celular en condiciones en las que las células pueden crecer y producir una proteína deseada. Las frases “medio de inoculación” o “medio de inóculo” se refieren a una solución o sustancia que contiene nutrientes en la que se inicia un cultivo de células. En ciertas realizaciones un “medio de alimentación” contiene nutrientes similares al medio de inoculación, pero es una solución o sustancia con la que se alimenta a las células después del inicio del cultivo. En ciertas realizaciones, un medio de alimentación contiene uno o más componentes no presentes en un medio de inoculación. En ciertas realizaciones, un medio de alimentación carece de uno o más componentes presentes en un medio de inoculación. Un experto en la materia del cultivo celular conocerá sin experimentación indebida qué componentes componen los medios de inoculación y alimentación. Típicamente, estas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y elementos traza requeridos por una célula para el crecimiento y supervivencia. En ciertas realizaciones, un medio de inoculación, un medio de alimentación o ambos comprenden un compuesto antisenesescencia.

La expresión “característica de cultivo celular” como se usa en el presente documento se refiere a una característica observable y/o medible de un cultivo celular. Se usan provechosamente procedimientos y composiciones de la presente invención para mejorar una o más características de cultivo celular. En ciertas realizaciones, la mejora de una característica de cultivo celular comprende aumentar la magnitud de una característica de cultivo celular. En ciertas realizaciones, la mejora de una característica de cultivo celular comprende reducir la magnitud de una característica de cultivo celular. Como ejemplos no limitantes, una característica de cultivo celular puede ser título, productividad específica celular, viabilidad celular, densidad celular viable integrada, acumulación de agregados de alto peso molecular y/o acumulación de especies ácidas. Un experto en la materia será consciente de otras características de cultivo celular que pueden mejorarse usando procedimientos y composiciones de la presente invención.

La expresión “medio definido” como se usa en el presente documento se refiere a un medio en el que la composición del medio es conocida y controlada. Los medios definidos no contienen aditivos complejos tales como suero o hidrolizados que contienen componentes desconocidos y/o incontrolados.

La expresión “medio complejo” como se usa en el presente documento se refiere a un medio que contiene al menos un componente cuya identidad o cantidad es desconocida o incontrolada.

La expresión “línea celular” se refiere a, en general, células huésped primarias que expresan una proteína de interés. En algunas realizaciones, las células se han transfectado con ADN exógeno que codifica una proteína deseada y/o que contiene secuencias de control que activan la expresión de secuencias ligadas, bien endógenas o bien heterólogas. En ciertas realizaciones, las células derivadas de dichas células modificadas genéticamente forman una línea celular y se sitúan en un medio de cultivo celular para crecer y producir el producto proteico. En ciertas realizaciones, una línea celular comprende células huésped primarias que no se han transfectado con ADN exógeno y expresan una proteína endógena de interés.

La “fase de crecimiento” de un medio de cultivo celular se refiere al periodo cuando las células experimentan rápida división y crecen exponencialmente, o casi exponencialmente. Típicamente, las células se cultivan en condiciones optimizadas para cultivo celular durante generalmente 1-4 días. Las condiciones de fase de crecimiento pueden incluir una temperatura a aproximadamente 35 °C a 42 °C, generalmente aproximadamente 37 °C. La longitud de la fase de crecimiento y las condiciones de cultivo en la fase de crecimiento pueden variar pero se conocen en general por un experto en la materia del cultivo celular. En ciertas realizaciones, un medio de cultivo celular en una fase de crecimiento se complementa con un medio de alimentación.

La “fase de transición” se produce durante el periodo en el que el medio de cultivo se desplaza de condiciones coherentes con la fase de crecimiento a condiciones coherentes con la fase de producción. Durante la fase de transición, se cambian con frecuencia factores como temperatura, entre otros. En ciertas realizaciones, un medio de cultivo celular en una fase de transición se complementa con un medio de alimentación.

La “fase de producción” se produce tanto después de la fase de crecimiento como de la fase de transición. El crecimiento exponencial de las células ha terminado y la producción proteica es el principal objetivo. El medio de cultivo celular puede complementarse para iniciar la producción. En ciertas realizaciones, un medio de cultivo celular en una fase de producción se complementa con un medio de alimentación. Además, la temperatura del medio de cultivo celular durante la fase de producción puede ser menor, en general, que durante la fase de crecimiento, que típicamente promueve la producción. La fase de producción continúa hasta que se ha alcanzado un punto final deseado.

La frase “densidad celular viable” se refiere al número total de células que sobreviven en el medio de cultivo celular en un volumen particular, en general por ml. La frase “viabilidad celular” se refiere al número de células que están vivas en comparación con el número total de células, tanto muertas como vivas, expresado como un porcentaje.

“Densidad celular viable Integrada”, “IVCD”: Las expresiones “densidad celular viable integrada” o “IVCD” como se usan en el presente documento se refieren a la densidad media de células viables durante el transcurso del cultivo multiplicado por la cantidad de tiempo que se ha procesado el cultivo. Cuando la cantidad de proteína producida es

proporcionar al número de células viables presentes durante el transcurso del cultivo, la densidad celular viable integrada es una herramienta útil para estimar la cantidad de proteína producida durante el transcurso del cultivo.

5 La expresión “agregados de alto peso molecular” se refiere a proteínas generalmente mal plegadas o una asociación inapropiada de al menos dos polipéptidos. La asociación puede surgir por cualquier procedimiento incluyendo, pero sin limitación, enlace covalente, no covalente, disulfuro o de cruce no reducible. En ciertas realizaciones, los procedimientos y composiciones de la presente invención se utilizan provechosamente para reducir la acumulación de agregados de alto peso molecular.

La expresión “antioxidante” se refiere a un compuesto que puede prevenir el daño oxidativo a lípidos, proteínas, ADN y otras macromoléculas esenciales bloqueando radicales libres.

10 “Proteína terapéutica”: una “proteína terapéutica” es una proteína o péptido que tiene un efecto biológico en una región del cuerpo en la que actúa o en una región del cuerpo en la que actúa de forma remota mediante intermedios. Una proteína terapéutica puede ser, por ejemplo, una proteína secretada, tal como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un receptor soluble, una fusión de receptor, una citocina, un factor de crecimiento, una enzima, o un factor de coagulación, como se describe en más detalle posteriormente en el presente documento. La lista anterior de proteínas es de naturaleza meramente ejemplar, y no se pretende que sea una enumeración limitante. Un experto en la materia entenderá que puede usarse cualquier proteína de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína particular para producir con la base que se necesite.

20 Como se usa en la memoria descriptiva, los términos polipéptido, proteína y péptido son sinónimos y se usan de forma intercambiable. En consecuencia, como se usa en el presente documento, el tamaño de una proteína, péptido o polipéptido generalmente comprende más de dos aminoácidos. Por ejemplo, una proteína, péptido o polipéptido puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 aminoácidos, de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos, de aproximadamente 200 aminoácidos a aproximadamente 300 aminoácidos, y así sucesivamente.

25 Como se usa en el presente documento, un aminoácido se refiere a cualquier aminoácido de origen natural, cualquier derivado de aminoácido o cualquier mimético de aminoácido conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, los restos de la proteína o péptido son secuenciales, sin ningún aminoácido que interrumpa la secuencia de restos de aminoácidos. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos no aminoácidos. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la proteína o péptido pueden interrumpirse por uno o más restos no aminoácidos.

30 “Anticuerpo”: El término “anticuerpo” se usa para hacer referencia a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tenga una región de unión a antígeno e incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio sencillo (DAB), Fv, scFv (Fv monocatenaria) y similares. Se conocen bien en este campo técnicas para preparar y usar diversas construcciones basadas en anticuerpos y fragmentos. También se conocen bien medios para preparar y caracterizar anticuerpos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988;). Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir al menos una, y preferentemente dos cadenas pesadas de longitud completa, y al menos una, y preferentemente dos cadenas ligeras. El término “anticuerpo” como se usa en el presente documento incluye un fragmento de anticuerpo o una molécula variante tal como un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab, F(ab')₂, Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento de cadena pesada (por ejemplo, un VHH de camélido) y una fusión de inmunoglobulina de dominio de unión (por ejemplo, SMIP™).

45 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o de especificidad única. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico, con injerto de CDR, o generado *in vitro*. En otras realizaciones más, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada seleccionada de, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra realización, el anticuerpo tiene una cadena ligera seleccionada de, por ejemplo, kappa o lambda. En una realización, la región constante está alterada, por ejemplo, mutada, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o reducir uno o más de: unión a receptor de Fc, glicosilación de anticuerpos, el número de restos de cisteína, función celular efectora o función de complemento). Típicamente, el anticuerpo se une específicamente a un antígeno predeterminado, por ejemplo, un antígeno asociado con un trastorno, por ejemplo, un trastorno neurodegenerativo, metabólico, inflamatorio, autoinmunitario y/o maligno.

50 Small Modular ImmunoPharmaceuticals (SMIP™) proporciona un ejemplo de una molécula variante que comprende un polipéptido de dominio de unión. SMIP y sus usos y aplicaciones se desvelan en, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Publicadas de Estados Unidos N° 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 y 2005/0238646, y miembros de la familia de patentes relacionadas de las mismas.

Los anticuerpos de dominio sencillo pueden incluir anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de dominio sencillo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos desprovistos naturalmente de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio sencillo derivados de

anticuerpos de 4 cadenas convencionales, anticuerpos modificados por ingeniería genética y armazones de dominio sencillo distintos de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio sencillo pueden ser cualquiera de la técnica, o cualquier anticuerpo de dominio sencillo futuro. Los anticuerpos de dominio sencillo pueden derivar de cualquier especie incluyendo, pero sin limitación, ratón, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, bovino. De acuerdo con un aspecto de la invención, un anticuerpo de dominio sencillo como se usa en el presente documento es un anticuerpo de dominio sencillo de origen natural conocido como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. Dichos anticuerpos de dominio sencillo se desvelan en el documento WO 9404678 por ejemplo. Por razones de claridad, este dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada desprovisto naturalmente de cadena ligera se conoce en el presente documento como un VHH o nanocuerpo para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Dicha molécula de VHH puede derivar de anticuerpos inducidos en especies de Camelidae, por ejemplo en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies además de Camelidae pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadena ligera; dichos VHH están dentro del alcance de la invención.

Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una única rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable de camélido o camelizado, por ejemplo, un dominio VHH; (vii) un Fv de cadena sencilla (scFv); (viii) un anticuerpo biespecífico; y (ix) uno o más fragmentos de una molécula de inmunoglobulina fusionada con una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, mediante un engarce sintético que permite que se compongan como una cadena proteica sencilla en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar molécula monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242: 423-26; Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-83). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se evalúan con respecto a función del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Además de anticuerpos “biespecíficos” o “bifuncionales”, se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un “anticuerpo bifuncional” o “biespecífico” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos por una diversidad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El término “biorreactor” se refiere a un recipiente en el que puede contenerse un medio de cultivo celular y cuyas condiciones internas pueden controlarse durante el periodo de cultivo, por ejemplo, pH y temperatura.

Un “cultivo semicontinuo” se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que las células se inoculan en primer lugar en un biorreactor con un medio de inóculo. El medio de cultivo celular se complementa después en uno o más puntos a lo largo del ciclo de producción con un medio de alimentación que contiene componentes nutricionales y/u otros complementos.

Un “cultivo discontinuo” se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que las células se inoculan en un biorreactor con todos los nutrientes y complementos necesarios para la totalidad del ciclo de producción. No se realizan adiciones de nutrientes al medio de cultivo celular a lo largo de la duración de la producción.

Un “cultivo de perfusión” se refiere a un procedimiento para cultivar células que es diferente de un procedimiento de cultivo discontinuo o semicontinuo, en el que el cultivo no se termina, o no se termina necesariamente, antes de aislar y/o purificar una proteína expresada de interés, y en el que se añaden de forma periódica o continua nuevos nutrientes y otros componentes al cultivo, durante el cual la proteína expresada se recoge de forma periódica o continua. La composición de los nutrientes añadidos puede cambiarse durante el transcurso del cultivo celular, dependiendo de las necesidades de las células, los requisitos de producción proteica óptima y/o cualquiera de una diversidad de otros factores conocidos por los expertos en la materia.

El término “expresión” se refiere a la transcripción y la traducción que se produce dentro de una célula huésped. El nivel de expresión se relaciona, en general, con la cantidad de proteína que se produce por la célula huésped.

“Productividad específica celular”, y similares, se refiere a la tasa de expresión de producto específica, como por cada célula. La productividad específica celular se mide generalmente en microgramos de proteína producidos por cada 10⁶ células por día o en picogramos de proteína producidos por cada 10⁶ células por día.

El término “título” como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de la proteína expresada de forma recombinante producida por un cultivo celular en una cantidad dada de volumen medio. El título se expresa

típicamente en unidades de miligramos o microgramos de proteína por mililitro de medio.

Un experto en la materia reconocerá que los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para cultivar muchas de las células de mamífero bien conocidas usadas y cultivadas de forma rutinaria en la técnica, es decir, los procedimientos desvelados en el presente documento no se limitan al uso solamente con la presente divulgación.

Descripción detallada de ciertas realizaciones de la invención

Se ha descubierto que usar un compuesto antisenescencia tal como carnosina modifica la viabilidad y productividad de un cultivo celular. Por ejemplo, la adición de carnosina mantiene la viabilidad celular y mejora la productividad de células, y mejora la calidad de producto del producto proteico deseado. La carnosina es un antioxidante y un compuesto antisenescencia que también es un dipéptido de origen natural presente a altos niveles (hasta 20 mM) en tejidos musculares y nerviosos en animales. Siendo un antioxidante, la carnosina también es neutralizante de radicales libres e inhibidor de glicosilación. En general, la carnosina transforma especies reactivas en especies no reactivas protegiendo de este modo proteínas, ADN y otras macromoléculas esenciales. Como un compuesto antisenescencia, la carnosina puede extender la esperanza de vida de fibroblastos diploides humanos y pulmón fetal humano (líneas celulares primarias) a una concentración de 20 mM en medio de cultivo. La presente invención abarca el sorprendente hallazgo de que es ventajoso usar un compuesto antisenescencia en cultivo celular para producir una proteína de interés. En ciertas realizaciones, usar dicho compuesto antisenescencia en un cultivo celular para producir una proteína de interés da como resultado una o más características de cultivo celular mejoradas incluyendo, pero sin limitación, título aumentado, productividad específica celular aumentada, acumulación reducida de agregados de alto peso molecular y/o acumulación reducida de especies ácidas.

Se ha demostrado que la carnosina es citotóxica para células transformadas y neoplásicas humanas o de roedores en Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), que tiene niveles de glucosa menores, pero no en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma), que contiene piruvato 1 mM (Holliday y col, Biochemistry (Moscú), 65: 843-848,846). Además, el suero de ternero fetal dializado con compuestos de bajo peso molecular retirados aumentó los efectos citotóxicos de la carnosina. Misma referencia. También se determinó que el oxaloacetato 1 mM y α -quetoglutarato 1 mM tenían efectos comparables al del piruvato, ninguno de los cuales son componentes del inóculo o medios de alimentación usados con los ejemplos de carnosina. Misma referencia. El piruvato sódico, sin embargo, es un componente original en el medio de inóculo a una concentración de 0,5 mM, no para adiciones de carnosina sino más bien para imitar mejor las condiciones *in vivo* en un sistema de biorreactor y como una fuente de energía alternativa potencial. El medio de inóculo también está sin suero, lo que implicaría que la carnosina tendría efectos citotóxicos. De acuerdo con la referencia, la adición de carnosina a un medio de cultivo celular tendría efectos citotóxicos similares a los vistos en el medio MEM en *Holliday*. Utilizando procedimientos y/o composiciones de la presente invención, dicha citotoxicidad se reduce o elimina y se mejora la viabilidad celular y la producción de proteínas.

En ciertas realizaciones, se proporciona carnosina en un medio de cultivo celular a una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En ciertas realizaciones, se proporciona carnosina en un medio de cultivo celular a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 20 mM. En ciertas realizaciones, se proporciona carnosina en un medio de cultivo celular a una concentración de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 mM, o mayor. En ciertas realizaciones, dichas concentraciones de carnosina se consiguen en cultivo celular añadiendo carnosina en múltiples momentos durante el procedimiento de cultivo celular, por ejemplo, en uno o más medios de alimentación. La concentración de carnosina utilizada depende del medio de cultivo celular y la línea celular que se use, entre otros factores, incluyendo los efectos deseados que se buscan en la línea celular o producto. También pueden proporcionarse análogos de carnosina, por ejemplo, acetilcarnosina, homocarnosina, anserina y beta alanina, en un medio de cultivo celular para un efecto similar. Uno o más de estos análogos pueden proporcionarse en un medio de cultivo celular. En ciertas realizaciones, dichos análogos se proporcionan en un medio de cultivo celular en combinación con carnosina. En ciertas realizaciones, dichos análogos se proporcionan a una concentración de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 mM, o mayor.

En ciertas realizaciones, para producir una proteína de interés, inicialmente, las células huésped se transfectan o transforman con ADN exógeno que codifica una proteína para proporcionar células transformadas, que producen de forma constitutiva el producto proteico deseado. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico introducida en la célula codifica la proteína deseada para expresar de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico contiene una secuencia reguladora o codifica un producto génico que induce o potencia la expresión de la proteína deseada por la célula. Como un ejemplo no limitante, dicho producto génico puede ser un factor de transcripción que aumenta la expresión de la proteína de interés.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de una proteína se introduce de forma estable en la célula huésped. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de una proteína se introduce de forma transitoria en la célula huésped. Un experto en la materia podrá elegir si introducir de forma estable o transitoria el ácido nucleico en la célula basándose en necesidades experimentales, comerciales u otras.

- 5 Un gen que codifica una proteína de interés puede ligarse opcionalmente a uno o más elementos de control genéticos reguladores. En algunas realizaciones, un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva de la proteína. En algunas realizaciones, puede usarse un elemento de control genético que proporcione expresión inducible de un gen que codifique la proteína de interés. El uso de un elemento de control genético inducible (por ejemplo, un promotor inducible) posibilita la modulación de la producción de la proteína en la célula. Los ejemplos no
10 limitantes de elementos de control genético inducibles potencialmente útiles para su uso en células eucariotas incluyen elementos regulados por hormonas (véase por ejemplo, Mader, S. y White, J. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5603-5607, 1993), elementos regulados por ligandos sintéticos (véase, por ejemplo, Spencer, D. M. y col., Science 262: 1019-1024, 1993) y elementos regulados por radiación ionizante (véase, por ejemplo, Manome, Y. y col., Biochemistry 32: 10607-10613, 1993; Datta, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10149-10153, 1992).
15 Pueden usarse sistemas específicos de células adicionales u otros reguladores conocidos en la técnica de acuerdo con procedimientos y composiciones descritos en el presente documento.

Puede utilizarse cualquier célula huésped susceptible de cultivo celular, y de expresión de proteínas, de acuerdo con la presente invención. Las células huésped son generalmente células de mamífero, más particularmente células animales, tales como células de ovario de hámster Chino (CHO). Otros ejemplos no limitantes de células de
20 mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC N°: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:
25 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de Búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N. Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una
30 línea de hepatoma humano (Hep G2).

Polipéptidos

Puede producirse cualquier polipéptido que sea expresable en una célula huésped de acuerdo con la presente invención. El polipéptido puede expresarse a partir de un gen que es endógeno de la célula huésped o a partir de un
35 gen heterólogo que se introduce en la célula huésped. El polipéptido puede ser un polipéptido que aparece en la naturaleza, o puede como alternativa tener una secuencia que se ha generado por ingeniería genética o se ha seleccionado por la mano del hombre. Un polipéptido para producir de acuerdo con la presente invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos polipeptídicos que aparecen individualmente en la naturaleza. Adicionalmente o como alternativa, el polipéptido modificado por ingeniería genética puede incluir uno o más fragmentos que no
40 aparecen en la naturaleza. Pueden realizarse proteínas o péptidos por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos mediante técnicas de biología molecular convencionales, el aislamiento de proteínas o péptidos de fuentes naturales o la síntesis química de proteínas o péptidos. Las regiones codificantes para genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas
45 desveladas en el presente documento o como conocerían los expertos en la materia. Como alternativa, diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos se conocen por los expertos en la materia.

Se seleccionarán con frecuencia proteínas terapéuticas que puedan expresarse idealmente de acuerdo con la presente invención basándose en una actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente invención puede emplearse para expresar cualquier enzima farmacéutica o comercialmente relevante, factor de
50 coagulación, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. La siguiente lista de proteínas terapéuticas que pueden producirse de acuerdo con la presente invención es de naturaleza meramente ejemplar, y no se pretende que sea una enumeración limitante. Un experto en la materia entenderá que cualquier polipéptido puede expresarse de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar el polipéptido particular para producir basándose en sus necesidades particulares.

Proteínas de fusión

55 En general las proteínas de fusión tienen todo o una parte sustancial de un péptido de dirección, ligado en el extremo N o C, con todo o una parte de un segundo polipéptido o proteína. Por ejemplo, las fusiones pueden emplear secuencias líder de otras especies para permitir la expresión recombinante de una proteína en un huésped heterólogo. Otra fusión útil incluye la adición de un dominio inmunológicamente activo, tal como un epítipo de anticuerpo, para facilitar la purificación de la proteína de fusión. Una proteína de fusión puede incluir un resto de
60 dirección, por ejemplo, un fragmento de receptor soluble o un ligando, y una cadena de inmunoglobulina, un

fragmento Fc, una región constante de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo por ejemplo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de un receptor y, por ejemplo, fusionado con una cadena Fc de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgG1 humana o IgG4 humana, o una forma mutada de la misma). En una realización, la secuencia de Fc humana se ha mutado en uno o más aminoácidos, por ejemplo, se ha mutado en los restos 254 y 257 de la secuencia natural para reducir la unión del receptor de Fc. Las proteínas de fusión pueden incluir adicionalmente una secuencia de engarce que une el primer resto con el segundo resto, por ejemplo, el fragmento de inmunoglobulina. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un engarce peptídico, por ejemplo, un engarce peptídico de aproximadamente 4 a 20, más preferentemente, de 5 a 10, aminoácidos de longitud; en ciertas realizaciones, el engarce peptídico es de 8 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un engarce peptídico que tiene la fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_y, en la que y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En otras realizaciones, pueden añadirse secuencias de aminoácidos adicionales al extremo N o C de la proteína de fusión para facilitar la expresión, flexibilidad estérica, detección y/o aislamiento o purificación.

La inclusión de un sitio de escisión en o cerca del punto de unión de fusión facilitará la retirada del polipéptido ajeno después de purificación. Otras fusiones útiles incluyen enlaces de dominios funcionales, tales como sitios activos de enzimas, dominios de glicosilación, señales de dirección celular o regiones transmembrana. Los ejemplos de proteínas o péptidos que pueden incorporarse en una proteína de fusión incluyen proteínas citostáticas, proteínas citocidas, agentes proapoptóticos, agentes antiangiogénicos, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, fármacos peptídicos, anticuerpos, anticuerpos de fragmentos Fab, antígenos, proteínas receptoras, enzimas, lectinas, proteínas MHC, proteínas de adhesión celular y proteínas de unión. Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos para generar proteínas de fusión. Dichas proteínas pueden producirse, por ejemplo, por unión química usando reactivos de reticulación bifuncionales, por síntesis *de novo* o la proteína de fusión completa, o por unión de una secuencia de ADN que codifica el péptido diana con una secuencia de ADN que codifica el segundo péptido o proteína, seguido de expresión de la proteína de fusión intacta.

25 *Anticuerpos*

Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno particular. Dado el gran número de anticuerpos actualmente en uso o en investigación como agentes farmacéuticos u otros comerciales, la producción de anticuerpos de acuerdo con la presente invención es de particular interés. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para producir anticuerpos en un cultivo celular en el que el plegamiento erróneo y/o agregación de los anticuerpos producidos se reduce.

En ciertas realizaciones, los procedimientos y/o composiciones de la presente invención se emplean para producir un anticuerpo contra el factor de diferenciación del crecimiento 8 (GDF-8). Los ejemplos no limitantes de anticuerpos de GDF-8 incluyen Myo29, Myo28 y Myo22. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de GDF-8 producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se producen en forma de isotipos de IgG humana. En ciertas realizaciones, se emplean procedimientos y/o composiciones de la presente invención para producir un anticuerpo MYO29 tal como se describe en la solicitud de patente internacional, número de publicación WO 2004/037861, titulada Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Thereof, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad.

Otras proteínas terapéuticas disponibles en el mercado representativas que pueden producirse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, AVASTIN [Bevacizumab], CAMPATH [Alemtuzumab], ERBITUX [Cetuximab], HERCEPTIN [TRASTUZUMAB], HUMIRA [Adalimumab], LUCENTIS [Ranibizumab], MYLOTARG [gemtuzumab ozogamicina], MYCSCINT [Imicromab Penetato], PROSTASCINT [Capromab Pendetida], RAPTIVA [Efalizumab], REMICADE [Infliximab], REO-PRO [Abciximab], RITUXAN [Rituximab], SIMULECST [Basiliximab], SOLIRIS [Eculizumab], SYNAGIS [Palivizumab], TYSABRI [Natalizumab], VECTIBIX [Panitumumab], VERLUMA [Nofetumomab], XOLAIR [Omalizumab], ZANAPAX [Daclizumab], ZEVALIN [Ibritumomab Tiuxetan], etc.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados descritos anteriormente contienen restos de aminoácidos que no aparecen de forma natural en ningún anticuerpo de ninguna especie en la naturaleza. Estos restos ajenos pueden utilizarse, por ejemplo, para conferir especificidad nueva o modificada, afinidad o función efectora en el anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado.

50 *Factores de coagulación*

Se ha mostrado que los factores de coagulación son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales. La hemofilia B es un trastorno en el que la sangre del que la padece es incapaz de coagular. Por lo tanto, cualquier pequeña herida que dé como resultado hemorragia es potencialmente un acontecimiento con riesgo para la vida. Dada la importancia de los factores de coagulación recombinantes en el tratamiento de enfermedades tales como hemofilia, la producción de factores de coagulación de acuerdo con la presente invención es de particular interés. En ciertas realizaciones, la presente invención puede usarse para producir factores de coagulación en un cultivo celular en el que el plegamiento erróneo y/o agregación de los factores de coagulación producidos se reduce.

Por ejemplo, el Factor de Coagulación IX (Factor IX o "FIX") es una glicoproteína monocatenaria cuya deficiencia da como resultado hemofilia B. FIX se sintetiza como un cimógeno de cadena sencilla que puede activarse a una serina proteasa de dos cadenas (Factor IXa) por liberación de un péptido de activación. El dominio catalítico del Factor IXa se localiza en la cadena pesada (véase Chang y col., J. Clin. Invest., 100: 4, 1997, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). Otros factores de coagulación que pueden producirse de acuerdo con la presente invención incluyen factor tisular y factor de von Willebrand y/o factores de coagulación sanguínea disponibles en el mercado. Los factores de coagulación sanguínea disponibles en el mercado representativos que pueden producirse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, ALTEPLASE [Activador de Plasminógeno Tisular; t-PA], BENEFIX [Factor IX], HEMOFIL [Factor Antihemófilo; Factor XIII], RECOMBINATE (Factor Antihemófilo Recombinante), etc.

Enzimas

Otra clase de polipéptidos que se ha mostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que pueden producirse idealmente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen enzimas. Dada la importancia de las enzimas recombinantes en el tratamiento de enfermedades y otros usos comerciales y farmacéuticos, la producción de enzimas de acuerdo con la presente invención es de particular interés. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para producir enzimas en un cultivo celular en el que el plegamiento erróneo y/o agregación de las enzimas producidas se reduce. Las enzimas disponibles en el mercado representativas que pueden producirse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, ACTIVASE [alteplasa Recombinante], CEREDASE [Alglucerasa], CERZYME [Imiglucerasa], PULMOZYME [DNasa], etc.

Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

Otra clase de polipéptidos que se ha mostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que pueden producirse idealmente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluye factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Los factores de crecimiento son con frecuencia glicoproteínas que se secretan por células y se unen a y activan receptores en otras células, iniciando un cambio metabólico o del desarrollo en la célula receptora. Dada la importancia biológica de los factores de crecimiento y otras moléculas de señalización y su importancia como agentes terapéuticos potenciales, la producción de estas moléculas de acuerdo con la presente invención es de particular interés. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para producir factores de crecimiento u otras moléculas de señalización en un cultivo celular en el que el plegamiento erróneo y/o agregación de los factores de crecimiento producidos u otras moléculas de señalización se reducen.

Los ejemplos no limitantes de factores de crecimiento de mamíferos y otras moléculas de señalización incluyen citocinas; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como aFGF y bFGF; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4, o TGF-beta 5; factor de crecimiento de tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina (las eritropoyetinas disponibles en el mercado representativas incluyen, por ejemplo, ARANESEP [darbepoyetina]; CEASCAN [Arcitumomab], EPOGEN [epoyetina alfa]; PROCRIT [epoyetina alfa]), etc.); factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso (BMP); un interferón tal como interferón alfa, -beta y -gamma (los interferones disponibles en el mercado representativos incluyen, por ejemplo, ACTIMUNNE [Interferón gamma-1b], AVONEX [Interferón beta-1a], REBIF [Interferón beta-1a], BETASERON [Interferón beta-1b]), etc.); factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF (otros factores estimulantes de colonias disponibles en el mercado representativos incluyen, por ejemplo, GRANUCYTE, Lenograstim, LEUKINE [Sargramostim]), etc.); interleucinas (TL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona folículo estimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulación tales como Proteína C; factor natriurético auricular; tensorioactivo de pulmón, un activador de plasminógeno; tal como uroquinasa o activador de plasminógeno de tipo tisular o de orina humana (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hemopoyético; encefalinasa; RANTES (regulado en la activación, normalmente expresado y secretado por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado con gonadotropina de ratón; factores neurotróficos tales como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-beta. Un experto en la materia será consciente de otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que pueden expresarse de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención.

Receptores

Otra clase de polipéptidos que se ha mostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que pueden producirse idealmente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluye receptores. Dada la importancia biológica de receptores y su importancia como agentes terapéuticos potenciales, la producción de estas moléculas de acuerdo con la presente invención es de interés particular. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para producir receptores en un cultivo celular en el que el plegamiento erróneo y/o agregación de los

receptores producidos se reduce.

Los receptores son típicamente glicoproteínas transmembrana que actúan reconociendo un ligando de señalización extracelular. Los receptores tienen con frecuencia un dominio proteína quinasa además del dominio de reconocimiento de ligando. Este dominio de proteína quinasa inicia una ruta de señalización fosforilando moléculas intracelulares diana tras unión del ligando, lo que conducen a cambios de desarrollo o metabólicos dentro de la célula. En ciertas realizaciones, se produce un dominio extracelular de un receptor transmembrana de acuerdo con procedimientos y sistemas desvelados en el presente documento. En ciertas realizaciones, se produce un dominio intracelular de un receptor transmembrana de acuerdo con procedimientos y sistemas desvelados en el presente documento.

En ciertas realizaciones, se expresan inhibidores del factor de necrosis tumoral, en forma de receptores del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNFR-1; documento EP 417.563 publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014 publicado el 20 de marzo de 1991) de acuerdo con sistemas y procedimientos de la presente invención (para revisión, véase Naismith y Sprang, *J Inflamm.* 47(1-2): 1-7, 1995-96). De acuerdo con algunas realizaciones, un inhibidor de factor de necrosis tumoral comprende un receptor de TNF soluble. En ciertas realizaciones, un inhibidor de factor de necrosis tumoral comprende un TNFR soluble fusionado con cualquier parte de una proteína de inmunoglobulina, incluyendo la región Fc de una inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, los inhibidores de TNF de la presente invención son formas solubles de TNFR I y TNFR II. En ciertas realizaciones de TNF de la presente invención son proteínas de unión a TNF. En ciertas realizaciones, los inhibidores de TNF de la presente invención son TNFR-Fc, por ejemplo, etanercept. Como se usa en el presente documento "etanercept", se refiere a un TNFR-Fc, que es un dímero de dos moléculas de la parte extracelular del receptor de TNF- α p75, consistiendo cada molécula en una parte Fc de 235 aminoácidos de IgG1 humana. De acuerdo con la invención, se usa un compuesto antisenesescencia, tal como carnosina, para reducir la cantidad de proteína mal plegada y/o agregada durante la producción de TNFR-Fc.

En algunas realizaciones, los receptores para producir de acuerdo con la presente invención son tirosina quinasa receptoras (RTK). La familia de RTK incluye receptores que son cruciales para una diversidad de funciones de numerosos tipos celulares (véase, por ejemplo, Yarden y Ullrich, *Ann. Rev Biochem.* 57: 433-478, 1988; Ullrich y Schlessinger, *Cell* 61:243-254, 1990). Los ejemplos no limitantes de RTK incluyen receptores de factor de necrosis tumoral alfa y beta, miembros de la familia del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tirosina quinasa con dominios de homología de EGF e inmunoglobulina 1 (TIE-1) y receptores de TIE-2 (Sato y col., *Nature* 376 (8535): 70-74, 1995) y receptor de c-Met, algunos de los cuales se ha sugerido que promueven la angiogénesis, directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, *J. Cell Biol.* 129: 895-899, 1995). Otros ejemplos no limitantes de RTK incluyen quinasa de hígado fetal 1 (FLK-1) (en ocasiones denominada receptor que contiene dominio de inserto de quinasa (KDR) (Terman y col, *Oncogene* 6: 16T7-83, 1991) o receptor de factor de crecimiento de células endoteliales vasculares 2, VEGFR-2), tirosina quinasa 1 de tipo fms (Flt-1) (DeVries y col. *Science* 255,989-991, 992; Shibuya y col., *Oncogene* 5: 519-524, 1990), denominada en ocasiones receptor de factor de crecimiento de células endoteliales vasculares 1 (VEGFR-1), neuropilina-1, endoglina, endosialina y Axl. Los expertos en la materia serán conscientes de otros receptores que pueden expresarse de acuerdo con la presente invención.

En ciertas realizaciones, el receptor para producir de acuerdo con la presente invención es un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Los GPCR son una diana principal para la acción farmacológica y el desarrollo. De hecho, los receptores han conducido a más de la mitad de los fármacos actualmente conocidos (Drews, *Nature Biotechnology*, 14: 1516, 1996) y los GPCR representan la diana más importante para intervención terapéutica, antagonizando o agonizando el 30% de los fármacos clínicamente prescritos un GPCR (Milligan, G. y Rees, S., *TIPS*, 20: 118-124, 1999). Puesto que estos receptores tienen un historial demostrado, establecido, como dianas terapéuticas, la producción de GPCR de acuerdo con la presente invención también es de particular interés.

En general, los que practiquen la presente invención seleccionarán su proteína o polipéptido de interés, y sabrán su secuencia de aminoácidos precisa. Cualquier polipéptido dado que vaya a expresarse de acuerdo con la presente invención tendrá sus propias características particulares y puede influir en la densidad o viabilidad celular de las células cultivadas, y puede expresarse a niveles menores que otro polipéptido o proteína cultivado en condiciones de cultivo idénticas. Un experto en la materia será capaz de modificar de forma apropiada los medios y procedimientos de la invención descritos en el presente documento para optimizar el crecimiento celular, título, plegamiento o cualquier otra propiedad de un polipéptido o proteína expresado dado.

Un experto en la materia será consciente de otras proteínas útiles y/o deseables que puedan expresarse de acuerdo con procedimientos y composiciones de la presente invención.

Las líneas celulares pueden cultivarse usando una diversidad o técnicas para producir el producto proteico deseado. El cultivo celular puede realizarse en una escala pequeña o grande, dependiendo del fin del medio de cultivo celular o uso del producto. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un biorreactor. En ciertas realizaciones, el volumen del biorreactor es de al menos 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Además, los biorreactores que pueden usarse incluyen, pero sin

limitación, un biorreactor de tanque agitado, reactor de lecho fluido, biorreactor de fibra hueca o frasco rotatorio. Los sistemas también pueden actuar en un modo discontinuo, semicontinuo o continuo/perfusión. El biorreactor y modo en el que controlar y supervisar el medio de cultivo celular se conocerán por el experto en la materia del cultivo celular. En el presente ejemplo, el sistema utilizado es un biorreactor de tanque agitado y que funciona en modo semicontinuo.

El biorreactor generalmente se siembra con un medio de inóculo y una línea celular seleccionada, por ejemplo, una línea celular de proteína de fusión TNFR, que puede transfectarse para expresar de forma estable y producir el producto proteico deseado. Puede usarse medio disponible en el mercado tal como Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), F10 de Ham (Sigma), o Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) como el medio básico. Estos medios básicos pueden después complementarse con aminoácidos, vitaminas, elementos traza y/u otros componentes para producir el inóculo o medio de alimentación usado durante el ciclo de producción. En ciertas realizaciones, se altera un medio básico para permitir el crecimiento robusto de células, para aumentar la viabilidad celular, para aumentar la productividad celular, para aumentar la densidad de células viables integradas y/o para mejorar la calidad de la proteína producida en presencia de carnosina. Por ejemplo, puede complementarse un medio básico con piruvato, oxaloacetato y/o α -cetoglutarato. Un experto en la materia podrá alterar un medio básico para su uso con procedimientos y composiciones de la presente invención, sin experimentación indebida.

En ciertas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una diversidad de medios definidos químicamente que contienen un compuesto antisenescencia en los que los componentes de los medios son conocidos y controlados. Por ejemplo, los medios definidos típicamente no contienen aditivos complejos tales como suero o hidrolizados. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una diversidad de medios complejos que contienen un compuesto antisenescencia, en los que no todos los componentes del medio son conocidos y/o controlados. En ciertas realizaciones, dicho compuesto antisenescencia comprende carnosina.

Las condiciones del biorreactor se controlan típicamente con el pH ajustado entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. El pH se ajusta usando un ácido, generalmente CO_2 , o una base, tal como bicarbonato sódico. El oxígeno disuelto se controla entre aproximadamente 5 y 90% de saturación en aire, y la temperatura se mantiene entre 30 °C y 42 °C durante la fase de crecimiento. Un experto en la materia del cultivo celular puede modificar las condiciones del biorreactor basándose en la línea celular y procedimientos que se emplean para conseguir los resultados deseados sin experimentación indebida.

Las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse con cualquier procedimiento de cultivo o sistema que sea susceptible de la expresión de proteínas. Por ejemplo, las células que expresan una proteína de interés pueden cultivarse en cultivos discontinuos o semicontinuos, en los que el cultivo se termina después de la expresión suficiente de la proteína, después de lo cual la proteína expresada se recoge y opcionalmente se purifica. Como alternativa, las células que expresan una proteína de interés pueden cultivarse en cultivos de perfusión, en los que el cultivo no se termina y se añaden de forma periódica o continua nuevos nutrientes y otros componentes al cultivo, durante el cual la proteína expresada se recoge de forma periódica o continua.

Después de sembrarse las células estas pasan por una fase de crecimiento durante la cual el número de células generalmente aumenta exponencialmente. Durante la fase de crecimiento la temperatura o intervalo de temperaturas del cultivo celular se seleccionará basándose principalmente en las temperaturas o intervalo de temperaturas en los que el cultivo celular sigue siendo viable, en los que se produce un nivel alto de proteína, en los que se minimiza la producción o acumulación de productos residuales metabólicos y/o cualquier combinación de estos u otros factores considerados importantes por el facultativo. Como un ejemplo no limitante, las células CHO crecen bien y producen altos niveles de proteína a aproximadamente 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien y/o pueden producir altos niveles de proteína dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos enseñados por la presente divulgación no están limitados a estas temperaturas. Ciertas células de mamífero crecen bien y/o pueden producir altos niveles de proteína dentro del intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. En ciertas realizaciones, el cultivo celular se cultiva a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 °C una o más veces durante la fase de crecimiento. Los expertos en la materia podrán seleccionar temperatura o intervalo de temperaturas apropiados en los que cultivar las células, dependiendo de las necesidades de las células y los requisitos de producción del facultativo.

Después de la fase de crecimiento hay una fase de transición durante la cual las células se adaptan a cualquier cambio que se produzca en el entorno, tal como un cambio de temperatura. Los cambios que se producen son típicamente parámetros para la fase de producción. En los presentes ejemplos, el día 4, la temperatura se redujo de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 31 °C. El desplazamiento de temperatura, sin embargo, puede producirse más de una vez y no es necesario que vaya en dirección descendente. Además, la fase de transición y el desplazamiento de temperatura pueden producirse en cualquier día durante el ciclo de producción. Aunque la mayoría de los procedimientos de producción incluyen procedimientos multifase, también puede utilizarse carnosina en un procedimiento de una única fase.

Quando se desplaza la temperatura de cultivo, el desplazamiento de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede tardarse varias horas o días en completar el cambio de temperatura. Como alternativa, el desplazamiento de temperatura puede ser relativamente abrupto. La temperatura puede aumentar o reducirse a un ritmo constante durante el procedimiento de cultivo. Como alternativa, la temperatura puede aumentarse o reducirse en cantidades discretas en diversos momentos durante el procedimiento de cultivo. La temperatura o las temperaturas o intervalo o intervalos de temperaturas posteriores pueden ser menores que o mayores que la temperatura o temperaturas o intervalo o intervalos de temperaturas iniciales o anteriores. Un experto en la materia entenderá que están abarcados múltiples desplazamientos de temperatura discretos en estas realizaciones. Por ejemplo, la temperatura puede desplazarse una vez (a una temperatura o intervalo de temperaturas mayor o menor), manteniéndose las células a esta temperatura o intervalo de temperaturas durante un cierto periodo de tiempo, después de lo cual la temperatura puede desplazarse de nuevo a una nueva temperatura o intervalo de temperaturas, que puede ser mayor o menor que la temperatura o intervalo de temperaturas de la temperatura o intervalo de temperaturas previo. La temperatura del cultivo después de cada desplazamiento discreto puede ser constante o puede mantenerse dentro de un cierto intervalo de temperaturas.

Finalmente, está la fase de producción en la que el número de células no aumenta sustancialmente, sino que las células más bien producen el producto proteico deseado. Un experto en la materia entenderá, sin embargo, que en ciertas realizaciones, las células pueden continuar creciendo y aumentando en número durante la fase de producción. Durante esta fase el ambiente del biorreactor se controla en condiciones en las que es más probable que las células sean productivas. Por ejemplo, la temperatura se mantiene generalmente a una temperatura diferente de la de la fase de crecimiento, lo que conduce a la producción de un producto proteico, por ejemplo, 31 °C. A lo largo del ciclo de producción, las células pueden alimentarse con un medio de alimentación que contiene nutrientes y complementos que las células pueden necesitar. Por ejemplo, en ciertos casos, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular durante la fase de producción posterior con nutrientes u otros componentes del medio que se han agotado o metabolizado por las células. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos o glucosa y otra fuente de energía. Estos componentes complementarios pueden añadirse todos al cultivo celular a la vez, o pueden proporcionarse al cultivo celular en una serie de adiciones. En ciertas realizaciones, se proporciona un compuesto antisenescencia en un medio de alimentación una o más veces durante la fase de producción.

De acuerdo con ciertas realizaciones, el uso de un compuesto antisenescencia, por ejemplo carnosina, en el medio de cultivo celular durante la fase de producción, bien proporcionado en un medio de inoculación o bien en un medio de alimentación, aumenta la viabilidad celular y/o producción de proteínas específicas, mejorando de este modo el rendimiento global de proteína producida.

Los aspectos de un procedimiento de producción de proteínas se determinan por un experto en la materia de cultivo celular. Los parámetros tales como densidad de siembra, duración del cultivo de producción, condiciones de funcionamiento durante la recogida, entre otros, incluyendo los mencionados anteriormente están en función de la línea celular y el medio de cultivo celular. Por lo tanto, los parámetros pueden determinarse sin experimentación indebida por un experto en la materia del cultivo celular.

Como con la temperatura o intervalo de temperaturas durante la fase de crecimiento, la temperatura o intervalo de temperaturas del cultivo celular durante la fase de producción se seleccionará basándose principalmente en la temperatura o intervalo de temperaturas en los que el cultivo celular sigue siendo viable, en los que se produce un alto nivel de proteína, en los que se minimiza la producción o acumulación de productos residuales metabólicos y/o cualquiera combinación de estos u otros factores considerados importantes por el facultativo. En general, la mayoría de las células de mamífero permanecen viables y producen altos niveles de proteína dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos enseñados por la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. En ciertas realizaciones, las células de mamífero siguen siendo viables y producen altos niveles de proteína dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 35 °C. En ciertas realizaciones, el cultivo celular se cultiva a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 °C una o más veces durante la fase de producción. Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar temperatura o temperaturas o intervalo o intervalos de temperaturas apropiados en los que cultivar las células durante la fase de producción, dependiendo de las necesidades particulares de las células y los requisitos de producción particulares del facultativo. Las células pueden cultivarse durante cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del facultativo y el requisito de las células en sí mismas.

En ciertas realizaciones, se terminan cultivos discontinuos o semicontinuos una vez que el cultivo alcanza una o más de las condiciones de cultivo relevantes, como se determina por las necesidades del facultativo. En ciertas realizaciones, los cultivos discontinuos o semicontinuos se terminan una vez que la proteína expresada alcanza un título suficientemente alto, una vez que la densidad celular alcanza un nivel suficientemente alto, una vez que la proteína expresada alcanza una densidad celular suficientemente alta y/o para evitar la producción o acumulación deseable de productos residuales metabólicos (por ejemplo, lactato y/o amonio). Un experto en la materia será consciente de otras condiciones de cultivo relevantes que pueden usarse para determinar cuando debería

determinarse un cultivo discontinuo o semicontinuo, basándose en consideraciones experimentales, comerciales y/u otras.

5 En ciertas realizaciones, después de un ciclo de producción, el producto proteico se recupera del medio de cultivo celular y se aísla adicionalmente usando técnicas de separación tradicionales. Por ejemplo, la proteína puede inicialmente separarse por centrifugación, conservando el sobrenadante que contiene la proteína. Adicionalmente o como alternativa, el producto proteico puede unirse a la superficie de la célula huésped. En dichas realizaciones, el medio se retira y las células huésped que expresan la proteína se lisan como una primera etapa en el procedimiento de purificación. La lisis de células huésped de mamífero puede conseguirse por cualquier variedad de medios conocidos por los expertos en la materia, incluyendo rotura física por perlas de vidrio y exposición a condiciones de pH alto.

Usando procedimientos de purificación proteica convencionales, puede aislarse adicionalmente la proteína. Los procedimientos por los cuales aislar y purificar el producto proteico deseado se conocen dentro de la técnica de cultivo celular. Los procedimientos específicos dependen de la línea celular usada y el producto buscado.

15 El compuesto antisenescencia, por ejemplo, carnosina, puede añadirse al medio de cultivo en un momento óptimo para el procedimiento de cultivo celular específico. Para los ejemplos presentes, la adición de carnosina se realiza después de que la fase de producción está sustancialmente completa y esté en la fase de transición. Durante la adición, el medio de cultivo celular se adapta a la nueva temperatura resultante del desplazamiento de temperatura. La fase de transición generalmente es cuando los agentes se añaden para ayudar a iniciar la fase de producción. La carnosina, sin embargo, puede añadirse en cualquier punto durante el ciclo de producción que genera resultados óptimos, incluyendo la fase de crecimiento y la fase de producción. También puede añadirse carnosina en combinación con otros componentes, tales como medio de alimentación. En ciertas realizaciones, se proporciona un compuesto antisenescencia en un medio de inoculación y está presente en el cultivo celular durante el procedimiento de cultivo celular completo. En ciertas realizaciones, se proporcionan dos o más compuestos antisenescencia en el medio de cultivo celular. En ciertas realizaciones, se proporcionan dos o más compuestos antisenescencia en un medio de inoculación y están presentes en el cultivo celular durante el procedimiento de cultivo celular completo. En ciertas realizaciones, se proporcionan dos o más compuestos antisenescencia, en los que un compuesto antisenescencia se proporciona en un medio de inoculación y está presente en el cultivo celular durante el procedimiento de cultivo celular completo, mientras que se proporciona otro compuesto antisenescencia después de que haya comenzado el cultivo celular.

30 En ciertas realizaciones, la concentración de un compuesto antisenescencia presente en el cultivo celular es diferente para diversos tipos celulares y productos. En ciertas realizaciones, la concentración de carnosina presente es diferente para diversos tipos celulares y productos. En general, la concentración es suficiente para potenciar la productividad y calidad sin efectos tóxicos. Para los presentes ejemplos, el intervalo incluye, pero sin limitación, de 5 mM a 100 mM. Se apreciará que la concentración de carnosina usada puede variar dependiendo del medio de cultivo celular. Puede ser necesario determinar la concentración apropiada de carnosina para una línea celular particular con experimentos a pequeña escala rutinarios, tales como, por ejemplo, un biorreactor de 2 l, usando procedimientos convencionales. Un experto en la materia será capaz de determinar una concentración ventajosa u óptima de carnosina u otro compuesto antisenescencia sin experimentación indebida usando técnicas de cultivo celular y procedimientos de diagnóstico que se conocen en la técnica.

40 Una ventaja de añadir carnosina u otro compuesto antisenescencia, en lugar de agentes químicos, es el efecto sobre la viabilidad. Típicamente, el crecimiento celular cesa y el número de células viables se reduce con la adición de un agente químico, como butirato sódico (Kim y col. *Biotechnol Bioeng*, 71: 184-193,184). Los ejemplos posteriores, sin embargo, demuestran que la adición de carnosina a un medio de cultivo celular da como resultado mayor viabilidad en el momento de recogida que la que se observa en un cultivo celular cultivado en ausencia de un compuesto antisenescencia tal como carnosina. Además, dichos cultivos celulares que contienen carnosina muestran un aumento de la productividad específica. Con los efectos positivos en la viabilidad celular y productividad específica, el rendimiento global es mayor.

50 Otra ventaja es que un compuesto antisenescencia tal como carnosina reduce la cantidad de agregados de alto peso molecular y/o el número de especies ácidas. La reducción de la cantidad de agregados de alto peso molecular y especies ácidas simplifica la purificación del producto proteico. Permitir que la proteína se aisle más eficazmente reduce el coste para producir el producto proteico. En ciertas realizaciones, un compuesto antisenescencia, tal como carnosina, se usa para reducir la cantidad de proteína mal plegada y/o agregada. En ciertas realizaciones, un compuesto antisenescencia distinto de carnosina se usa para reducir la cantidad de agregados de alto peso molecular y/o especies ácidas. En ciertas realizaciones, se usan dos o más compuestos antisenescencia para reducir la cantidad de agregados de alto peso molecular y/o especies ácidas.

60 En ciertas realizaciones, las células se cultivan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de cultivo celular descritos en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 11/213.308, 11/213.317 y 11/213.633 cada una de las cuales se presentó el 25 de agosto de 2005. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la concentración de aminoácidos acumulada es mayor de aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la relación molar de

- glutamina acumulada y asparagina acumulada es menor de aproximadamente 2. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la relación molar de glutamina acumulada y aminoácidos totales acumulados es menor de aproximadamente 0,2. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la relación molar de ión orgánico acumulado y aminoácido total acumulado es entre aproximadamente 0,4 y 1. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la concentración de glutamina acumulada y asparagina acumulada combinada está entre aproximadamente 16 y 36 mM. En ciertas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo que contiene dos, tres, cuatro o las cinco condiciones de medio precedentes. El uso de dichos medios permite mayores niveles de producción proteica y reduce la acumulación de ciertos factores indeseables tales como amonio y/o lactato.
- En algunas realizaciones, las células se cultivan en una o más de las condiciones descritas en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/830.658, presentada el 13 de julio de 2006. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración entre aproximadamente 10 y 600 nM. En algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración entre aproximadamente 20 y 100 nM. En algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración de aproximadamente 40 nM. El uso de dichos medios en el crecimiento de glicoproteínas da como resultado la producción de una glicoproteína con un patrón de glicosilación mejorado (por ejemplo, un mayor número de restos de azúcares ligados covalentemente en una o más cadenas de oligosacáridos).
- En ciertas realizaciones de la invención, las proteínas producidas de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de compuestos farmacéuticos. Las proteínas producidas de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse en primer lugar para suministro por cualquier vía disponible incluyendo, pero sin limitación, vías parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente incluyen una proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero, un agente de suministro (es decir, un polímero catiónico, transportador molecular peptídico, tensioactivo, etc., como se ha descrito anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos complementarios activos en las composiciones.
- Se formula una composición farmacéutica para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Dichas formulaciones se conocerán por los expertos en la materia. En ciertas realizaciones, se formula una proteína producida de acuerdo con la presente invención en forma oral y/o parenteral. En ciertas realizaciones, para facilidad de administración y uniformidad de dosificación, dichas formas orales y/o parenterales se formulan como forma farmacéutica unitaria, en la que cada unidad contiene una cantidad predeterminada de proteína activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Un experto en la materia será consciente de formulaciones de dosificación unitarias apropiadas para proteínas producidas de acuerdo con la presente invención.
- Ciertas realizaciones y aspectos se han analizado en detalle anteriormente. La presente divulgación se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes. Los expertos en la materia entenderán, sin embargo, que diversas modificaciones de estas realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Se observa que la adición de carnosina y/u otros compuestos antisenescencia es igualmente aplicable a otros cultivos celulares de mamífero y productos proteicos. Son las reivindicaciones y equivalentes de las mismas las que definen el alcance de la presente invención, que no se limita y no debería limitarse a o por la presente descripción de ciertas realizaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Experimentos de carnosina a escala de placa

- Se cultivó una línea celular MYO-29 en un medio de producción sin suero en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1 l y se desplazó a una temperatura de 37 °C a 31 °C el día 4. El pH del biorreactor se mantuvo a 7,0 y el oxígeno disuelto estuvo al 30% de saturación en aire. El medio de cultivo celular se tomó después del biorreactor el día 4, día 7 y día 10 y se puso en placas de cultivo con un volumen de trabajo de 8 ml y se situó en un incubador a 31 °C, en el que los cultivos de placas se cultivaron hasta el día 12. Las células se complementaron con un medio de alimentación los días 5 y 7. El día 5, se añadió medio de alimentación al 10% (v/v) a los cultivos celulares y el día 7, se añadió medio de alimentación al 5% (v/v) a los cultivos celulares. Se añadió carnosina 10 mM el día 4, día 7 y día 10, respectivamente, a las placas y el medio de cultivo celular se recogió el día 12.

La Figura 1a muestra el efecto de las adiciones de carnosina en la cantidad de picos ácidos en el cultivo el día 7. La figura 1b muestra el efecto de la carnosina en los agregados de alto peso molecular en el cultivo del día 7. La Figura 1c ilustra el efecto de las adiciones de carnosina el día 4, frente al día 7, frente al día 10 en los picos ácidos. La

Figura 1d muestra los resultados del mismo experimento pero para agregados de alto peso molecular. En general, la carnosina tuvo un efecto positivo reduciendo tanto los picos ácidos como los agregados de alto peso molecular en placas cultivadas.

Ejemplo 2: Efectos de la adición de carnosina a medio de cultivo celular

5 Se inocularon cinco biorreactores con $0,9 \times 10^6$ células/ml con un volumen de trabajo de 1 l de una línea celular MYO-29 en un medio de inoculación sin suero. Todos los biorreactores se alimentaron con un medio de alimentación al 5% (v/v) los días 3, 5, 7 y 12 de un ciclo de 14 días. Se añadió medio de alimentación de día 10 del 5% (v/v) del medio de alimentación a dos de los biorreactores de control y uno que contenía carnosina. Las condiciones de los biorreactores se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, un pH de 7,0, y un nivel de oxígeno disuelto al 30% de saturación en aire. La tasa de agitación fue de 200 rpm y el gas rociado tuvo una combinación de aire y dióxido de carbono al 7%.

10 Todas las células se cultivaron durante 4 días momento en el cual se añadió carnosina 20 mM a dos de los biorreactores, no se añadió carnosina a los controles y la temperatura se desplazó a 31 °C en todos los biorreactores el día 4 también. Los biorreactores se recogieron el día 14 del ciclo de producción. Las muestras se tomaron a lo largo del ciclo para supervisar el progreso del medio de cultivo celular. Los controles rindieron como se esperaba.

15 La Figura 2a muestra la densidad celular viable diaria. La Figura 2b muestra que la viabilidad celular diaria de los biorreactores con carnosina fue mayor tras recogerse en comparación con los dos biorreactores sin ella. La Figura 2c muestra el título diario de los biorreactores y que los dos biorreactores con carnosina presente tuvieron mayor título en el momento de recogida. Los cultivos con carnosina tuvieron mejor productividad celular específica acumulada mostrada en la Figura 2d. La Figura 2e muestra la cantidad de agregados de alto peso molecular y muestra una reducción de agregados de alto peso molecular en los biorreactores con carnosina presente.

Ejemplo 3: Efecto de diferente concentración de adiciones de carnosina

25 Se inocularon cuatro biorreactores con $0,4 \times 10^6$ células/ml con un volumen de trabajo de 1 l de una línea celular MYO-29 en un medio de inoculación sin suero. Todos los biorreactores se alimentaron con medio de alimentación al 5% (v/v) el día 7 del ciclo de 14 días. Las condiciones del biorreactor se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, un pH de 7,0, y un nivel de oxígeno disuelto a 30% de saturación en aire. La velocidad de agitación fue de 200 rpm y el gas rociado tuvo una combinación de aire y dióxido de carbono al 7%.

30 Todas las células se cultivaron durante cuatro días momento en el cual la temperatura se desplazó en todos los biorreactores a 31 °C. También el día 4, se añadió carnosina 20 mM a un biorreactor, a un segundo se añadió carnosina 40 mM y a los controles no se añadió ninguna carnosina. Todos los biorreactores se recogieron el día 12 del ciclo de producción. Se tomaron muestras a lo largo del ciclo para supervisar el progreso del medio de cultivo celular. Los controles rindieron generalmente como se esperaba, excepto que un control tuvo viabilidades diarias ligeramente menores de lo que se había visto previamente.

35 La Figura 3a muestra la densidad celular viable diaria, los diferentes biorreactores son bastante similares con las excepciones del biorreactor con carnosina 4 mM. La Figura 3b muestra que la viabilidad celular diaria de los biorreactores con carnosina tuvo una mayor viabilidad tras recogerse en comparación con dos biorreactores de control sin ella. La Figura 3c muestra el título diario; los biorreactores con las adiciones de carnosina y uno de los controles fueron similares. El biorreactor con carnosina 40 mM tuvo una productividad celular especificidad acumulada mayor (Figura 3d). La Figura 3e muestra la cantidad de agregados de alto peso molecular; en general hay una reducción en los agregados de alto peso molecular con las adiciones de carnosina en comparación con los controles.

Ejemplo 4: Uso de carnosina en cultivo celular de mamífero para mejorar las características de producto de una proteína de fusión TNFR recombinante

45 Se cultivó una línea celular de proteína de fusión TNFR en un medio de producción sin suero en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1 l. El día 1 la temperatura se desplazó de 37 °C a 29,5 °C, se añadió butirato sódico a una concentración final de 1 mM y se añadió HMBA a una concentración final de 3 mM. El pH del biorreactor se mantuvo a 6,95 y el oxígeno disuelto estuvo a una saturación del 60% en aire. El día 2, se añadió carnosina al cultivo a una concentración final de 20 mM. Las células se complementaron con un medio de alimentación al 5% (v/v) los días 3, 6, 8 y 10. El medio de cultivo celular se recogió el día 12. Se procesaron cuatro biorreactores de control separados en los que las células CHO que expresaban una proteína de fusión TNFR recombinante se cultivaron en condiciones idénticas a las descritas anteriormente excepto que no se añadió carnosina el día 2. Los datos de control en las Figuras 4-11 es la media de los cuatro ciclos de biorreactor de control.

55 Como puede verse en las Figuras 4 y 5, el crecimiento celular y la viabilidad celular no se vieron afectadas significativamente por adición de carnosina. La Figura 6 muestra que la cantidad de proteína de fusión TNFR mal plegada y/o agregada, como se mide por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), se redujo significativamente cuando las células se cultivaron en medio que contenía carnosina. La Figura 7 muestra que la cantidad de agregados de alto peso molecular (HMW), como se mide por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), también

5 se redujo significativamente cuando las células que expresaban proteína de fusión TNFR se cultivaron en medio que contenía carnosina. Las Figuras 8 y 9 muestran que el título de producto y productividad celular específica, respectivamente, aumentaron cuando las células que expresaban proteína de fusión TNFR se cultivaron en medio que contenía carnosina. Finalmente, las Figuras 10 y 11 muestran que la glicosilación de la proteína de fusión de TNFR producida no fue significativamente diferente cuando las células se cultivaron en medio que contenía carnosina.

10 Aunque algunas realizaciones de la divulgación se han descrito en el presente documento, la descripción anterior es meramente ilustrativa. Los expertos en la materia del cultivo celular obtendrán modificación adicional de las realizaciones desveladas en el presente documento y se considera que todas estas modificaciones están dentro del alcance de las realizaciones como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una proteína de fusión TNFR en cultivo celular que comprende las etapas de:
 - 5 cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica la proteína de fusión TNFR, expresándose dicho gen en condiciones de cultivo celular, en un medio de cultivo celular que comprende un compuesto antisenescencia, en el que el compuesto antisenescencia está seleccionado del grupo que consiste en carnosina, acetilcarnosina, homocarnosina, anserina y beta alanina y combinaciones de los mismos y en el que el compuesto antisenescencia está presente en el medio de cultivo celular a una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM; y
 - 10 mantener el cultivo en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la expresión de la proteína; en el que el cultivo celular muestra una característica de cultivo celular mejorada que difiere de una característica de cultivo celular correspondiente que se observaría en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece del compuesto antisenescencia; en el que la característica de cultivo mejorada está seleccionada del grupo que consiste en: título aumentado, productividad específica celular aumentada, acumulación de agregados de alto peso molecular reducida, acumulación de especies ácidas reducida y combinaciones de los mismos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto antisenescencia comprende carnosina.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que se proporciona adicionalmente al cultivo celular componentes complementarios.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que se proporcionan componentes complementarios en un medio de alimentación.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que los componentes complementarios están seleccionados del grupo que consiste en hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, glucosa u otra fuente de energía y combinaciones de los mismos.
6. Un procedimiento de producción de una proteína de fusión TNFR que comprende las etapas de:
 - 30 cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica la proteína de fusión TNFR en un medio de cultivo celular, expresándose dicho gen en condiciones de cultivo celular, a una primera temperatura o intervalo de temperaturas que conducen a crecimiento celular durante una fase de crecimiento; desplazar la temperatura o intervalo de temperaturas del medio de cultivo celular a una segunda temperatura o intervalo de temperaturas que conduce a la producción de proteínas;
 - 35 cultivar las células huésped en el medio de cultivo celular a la segunda temperatura o intervalo de temperaturas a través de una fase de transición y a una fase de producción; en el que un compuesto antisenescencia se añade al cultivo celular y de modo que el cultivo celular muestre una característica de cultivo celular mejorada que difiere de una característica de cultivo celular correspondiente que se observaría en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece del compuesto antisenescencia, en el que el compuesto antisenescencia está seleccionado del grupo que consiste en carnosina, acetilcarnosina, homocarnosina, anserina y beta alanina y combinaciones de los mismos; en el que el compuesto antisenescencia está presente en el medio de cultivo celular a una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM; y en el que la característica de cultivo celular mejorada está seleccionada del grupo que consiste en: título aumentado, productividad específica de célula aumentada, acumulación de agregados de alto peso molecular reducida, acumulación de especies ácidas reducida y combinaciones de los mismos.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el compuesto antisenescencia se añade al medio de cultivo celular al comienzo del procedimiento de cultivo celular.
8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el compuesto antisenescencia se añade al medio de cultivo celular durante la fase de crecimiento.
9. El procedimiento de la reivindicación 6, 7 u 8, en el que el compuesto antisenescencia se añade al medio de cultivo celular durante la fase de transición.
10. El procedimiento de la reivindicación 6-9, en el que el compuesto antisenescencia se añade al medio de cultivo celular durante la fase de producción.
11. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el compuesto antisenescencia comprende carnosina.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el cultivo celular es provisto adicionalmente con componentes complementarios.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que los componentes complementarios son provistos en un medio de alimentación.
- 5 14. El procedimiento de la reivindicación 12 o 13, en el que los componentes complementarios están seleccionados del grupo que consiste en hormonas y/u otros factores de crecimiento, particularmente iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, glucosa u otra fuente de energía y combinaciones de los mismos.
15. El procedimiento de la reivindicación 12, 13 o 14, en el que los componentes complementarios incluyen un compuesto antisenescencia.
- 10 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de fusión TNFR producida es heteróloga para las células de mamífero.
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células de mamífero son células CHO.
- 15 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de fusión TNFR comprende un TNFR-Fc.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el TNFR-Fc es etanercept.
20. Un procedimiento de preparación de una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de aislar la proteína del medio de cultivo celular.
- 20 21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la proteína se purifica o procesa adicionalmente para formulación.
22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la proteína se formula para dar una composición farmacéutica.
23. Un procedimiento de preparación de una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los agregados de alto peso molecular comprenden proteína mal plegada.

Figura 1 a. Efecto de Carnosina en Picos Ácidos para MYO-29.

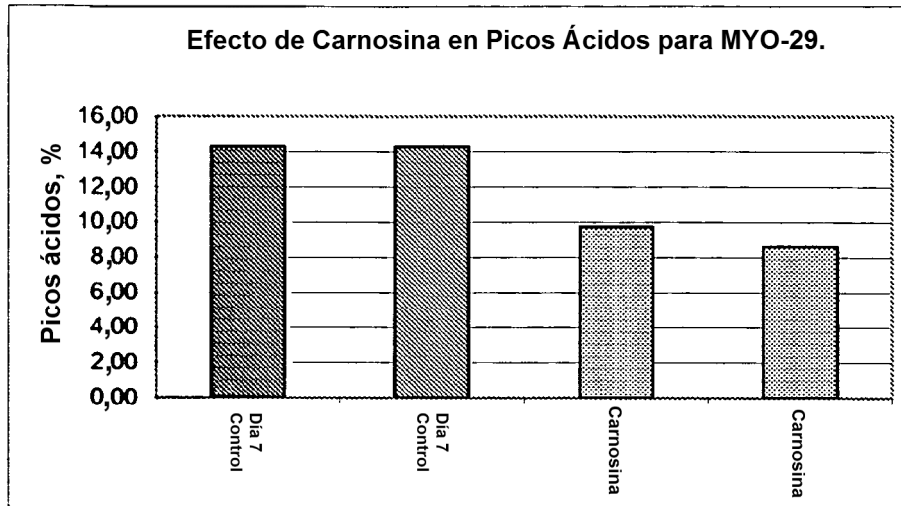


Figura 1b. Efecto de Carnosina en Agregados de Alto Peso Molecular

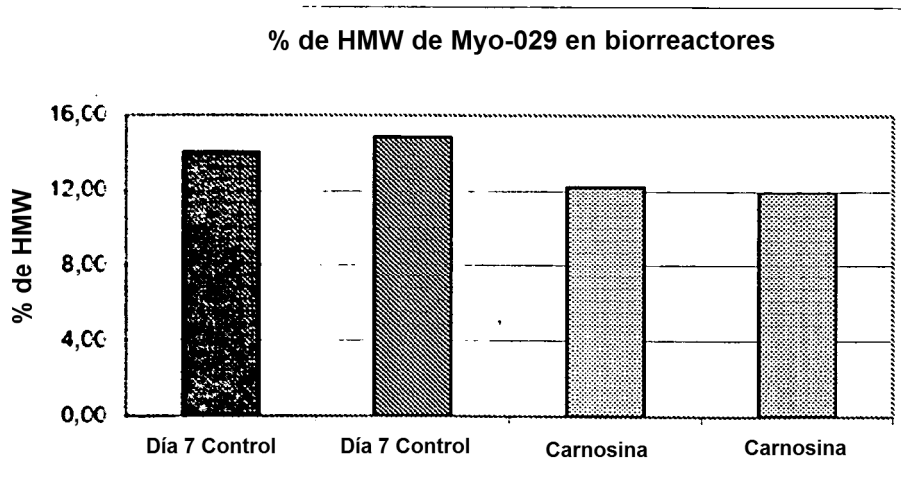


Figura 1c. Efecto de Adiciones de Carnosina en Días Diferentes en Picos Ácidos

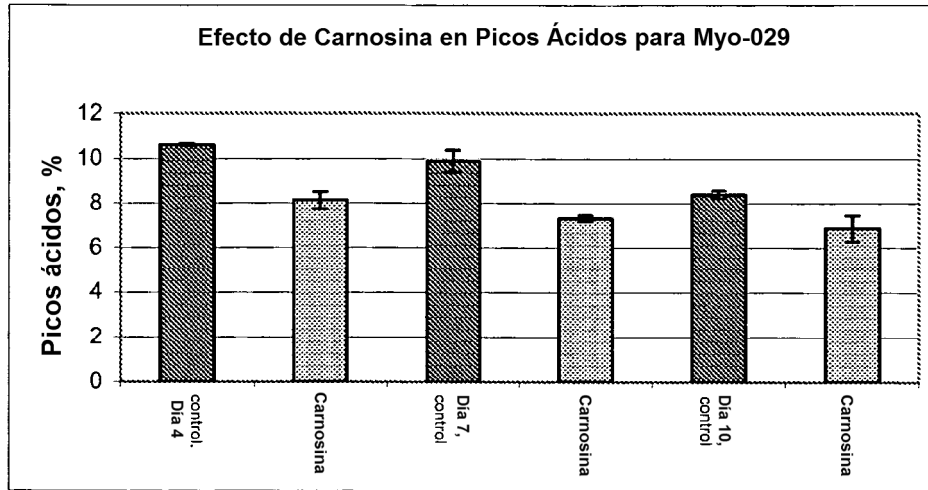


Figura 1d. Efecto de Adiciones de Carnosina en Días Diferentes en Agregados de Alto Peso Molecular

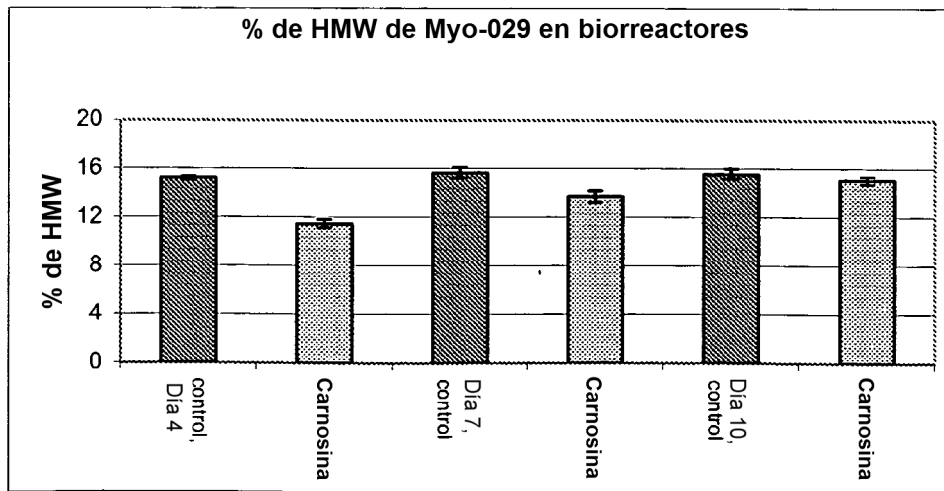


Figura 2a. Efecto de Carnosina en la Densidad Celular Viable Diaria.

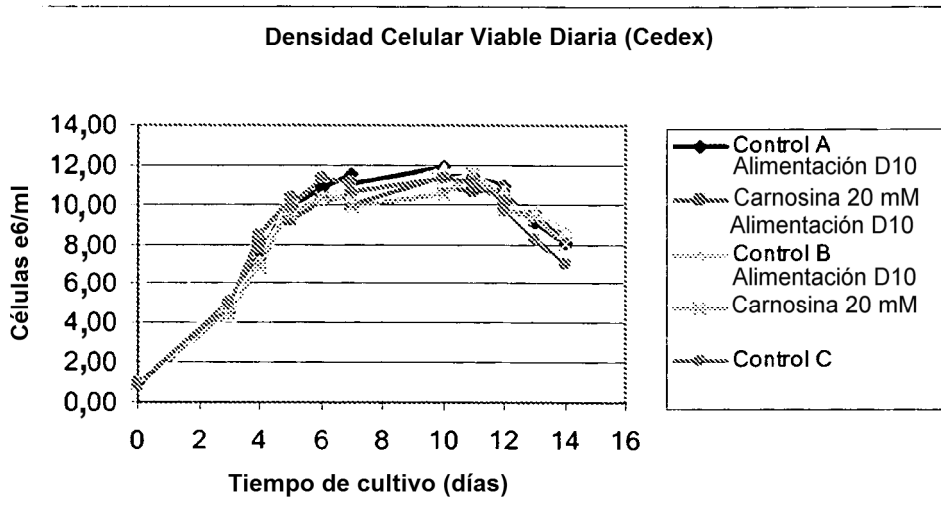


Figura 2b. Efecto de Carnosina en la Viabilidad Celular Diaria

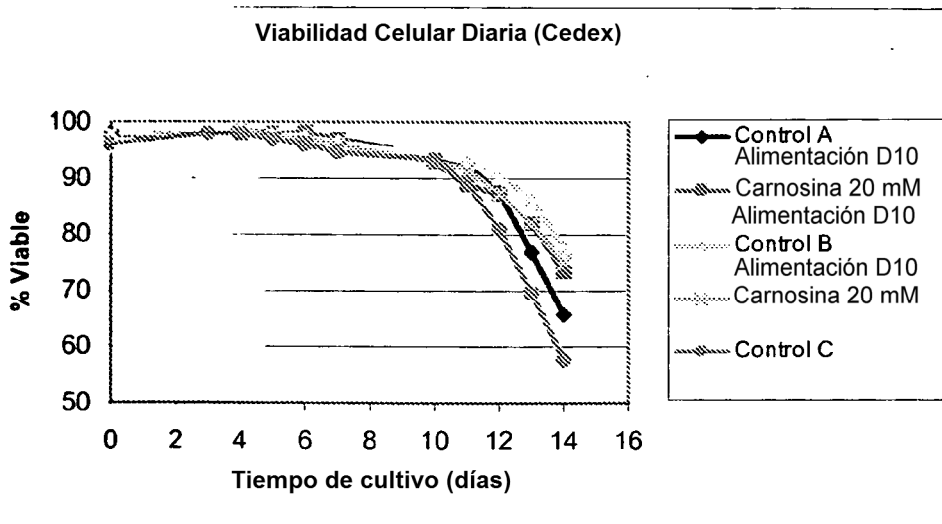


Figura 2c. Efecto de Carnosina en el Título Diario.

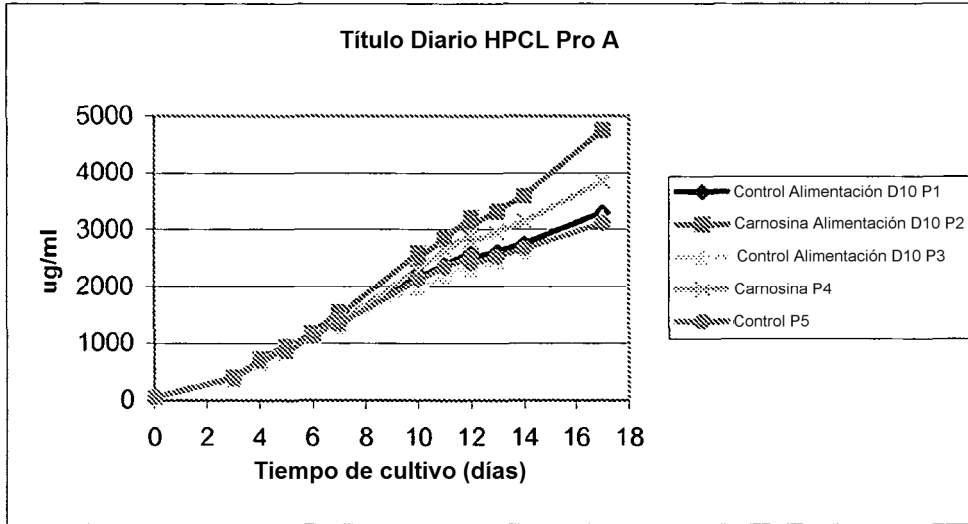


Figura 2d. Efecto de Carnosina en la Productividad Celular Específica Acumulada

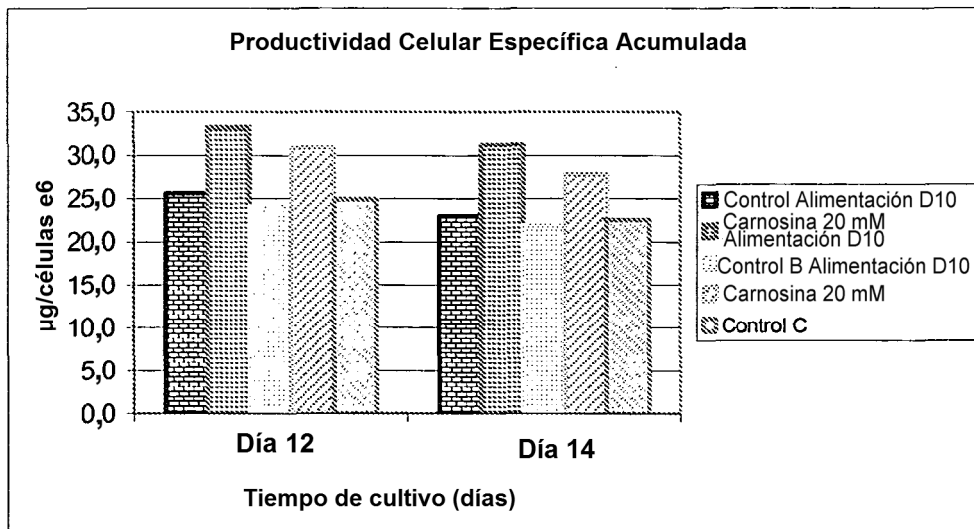


Figura 2e. Efecto de Carnosina en Agregados de Alto Peso Molecular

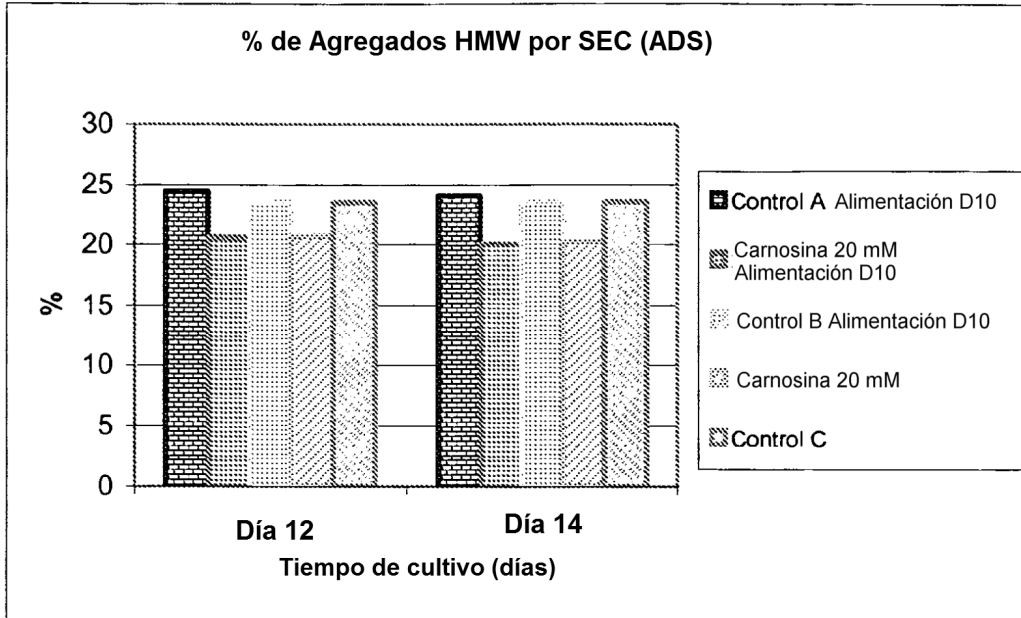


Figura 3a. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en la Densidad Celular Viable

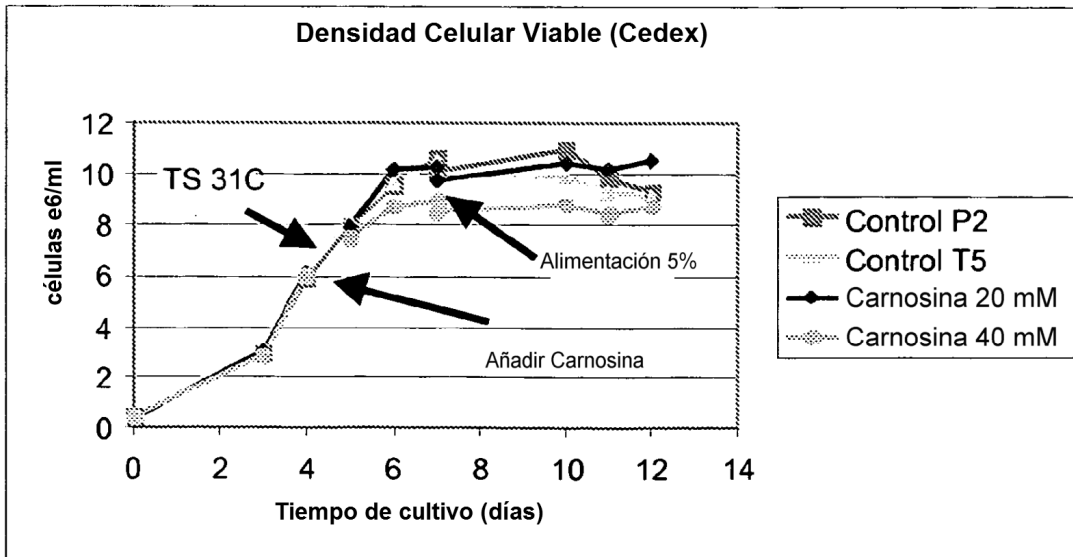


Figura 3b. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en la Viabilidad Celular Diaria

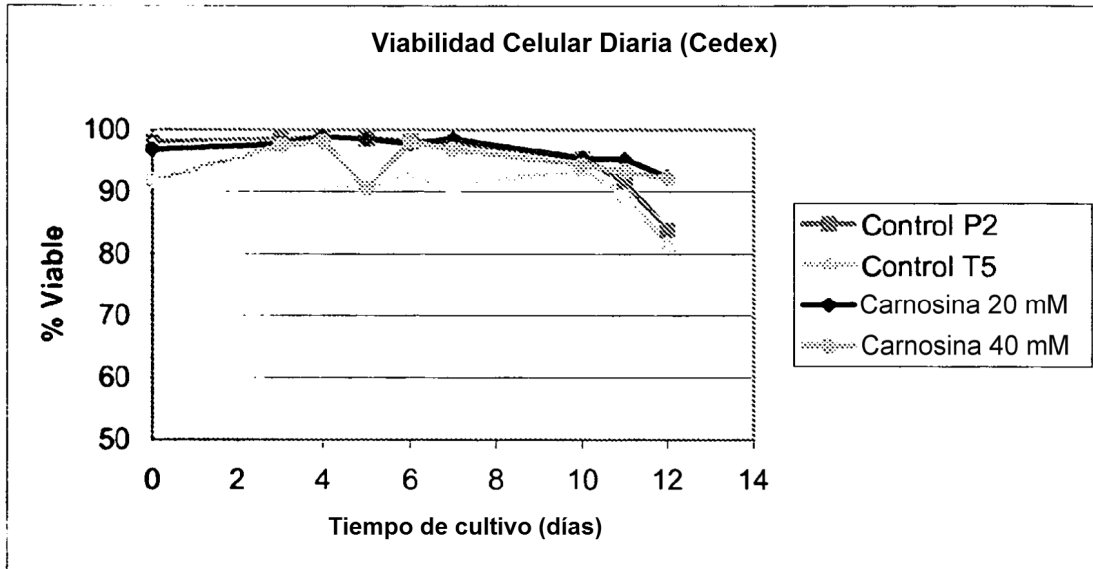


Figura 3c. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en el Título Diario

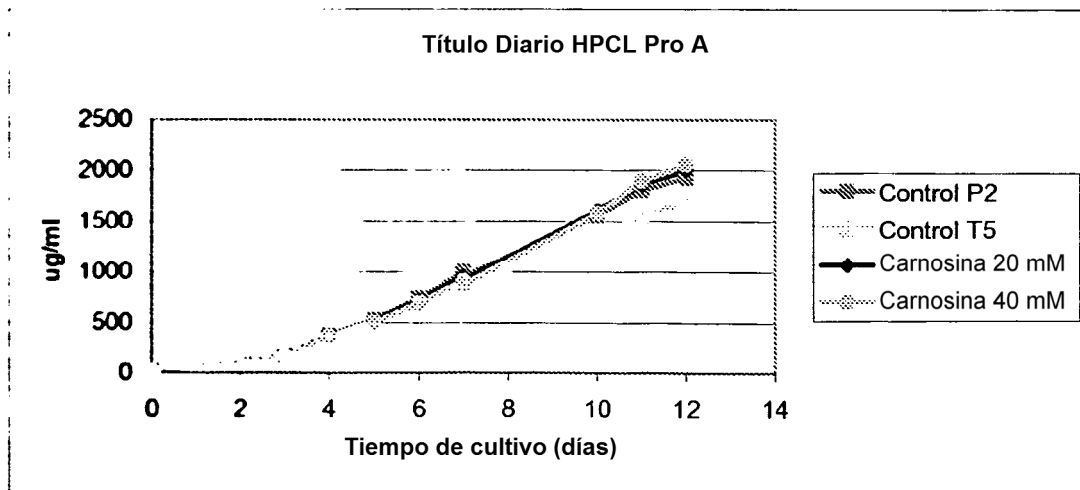


Figura 3d. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en la Productividad Celular Específica Acumulada

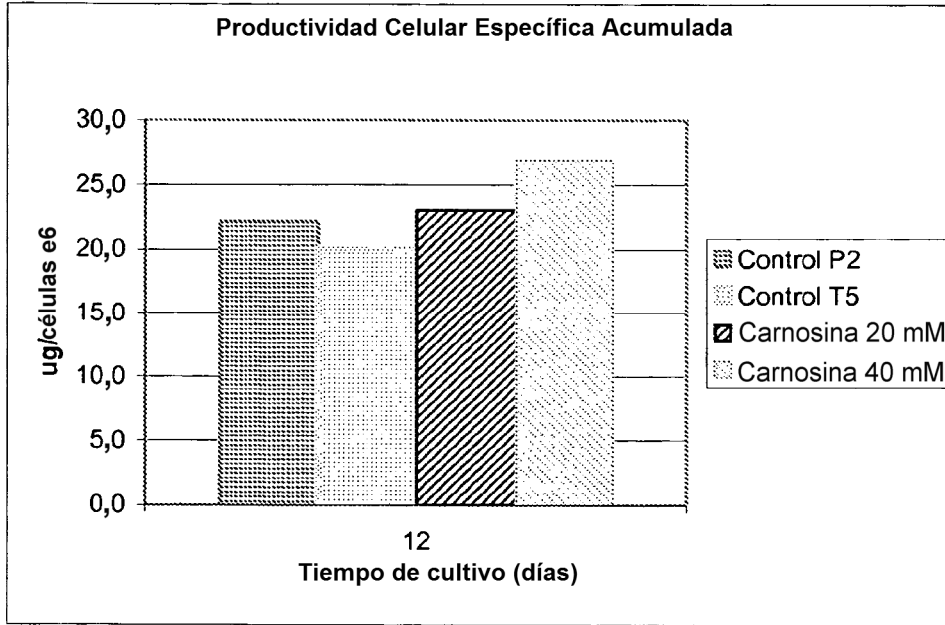


Figura 3e. Efecto de Diferentes Concentraciones de Carnosina en los Agregados de Alto Peso Molecular

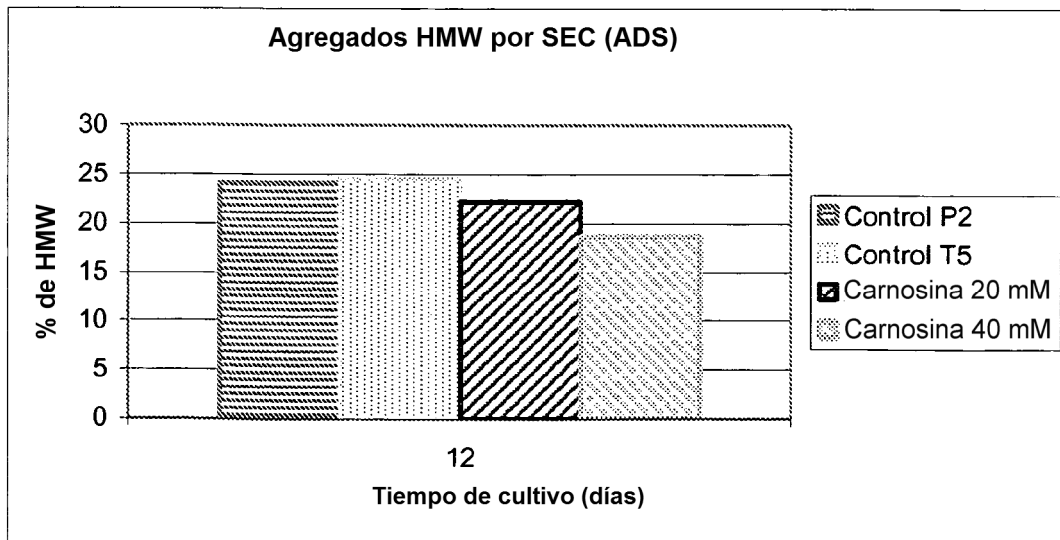


Figura 4. Perfiles de Densidad Celular Viable de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medios que Contienen o Carecen de Carnosina

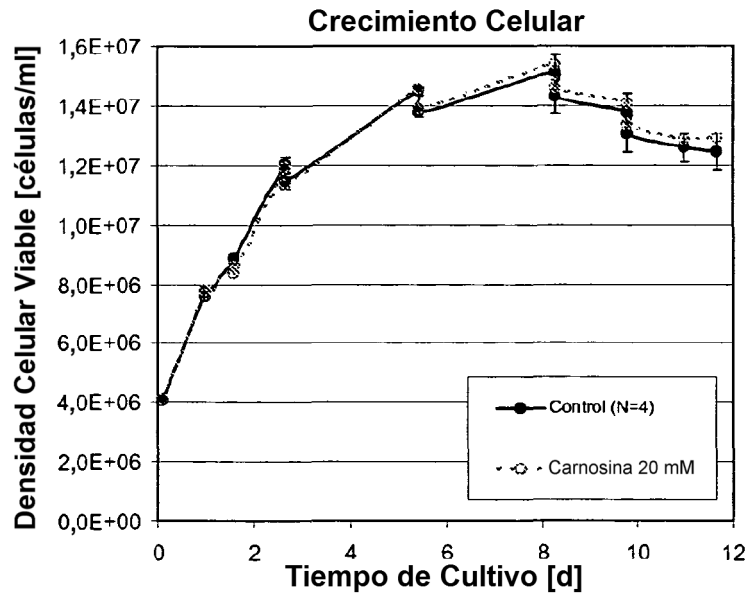


Figura 5. Perfiles de Viabilidad Celular de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante en Medios que Contienen o Carecen de Carnosina

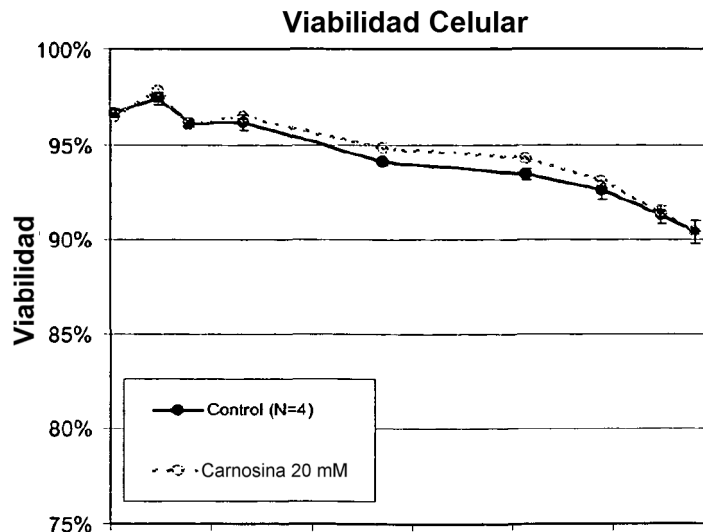


Figura 6. Efecto de Carnosina en el Porcentaje de Proteína de Fusión TNFR Mal Plegada/Agregada

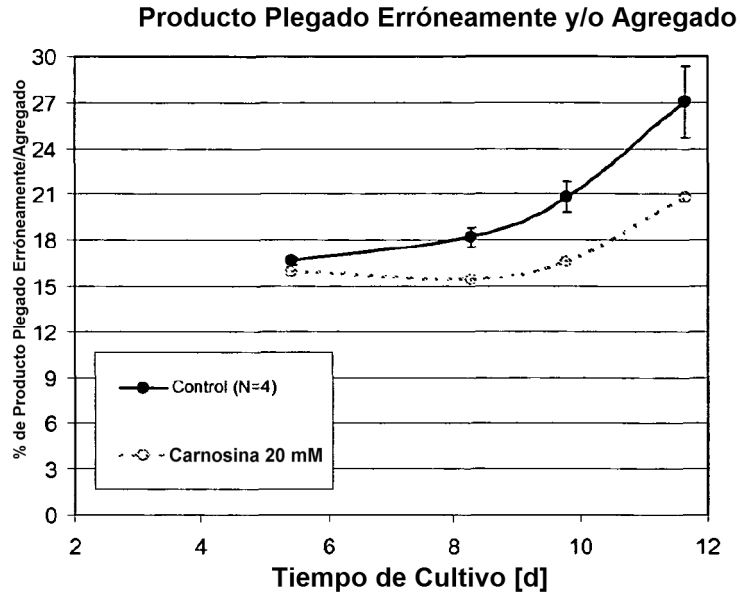


Figura 7. Efecto de Carnosina en el Porcentaje de Agregados de Alto Peso Molecular (HMW) Producidos por una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteínas de Fusión TNFR Recombinante.

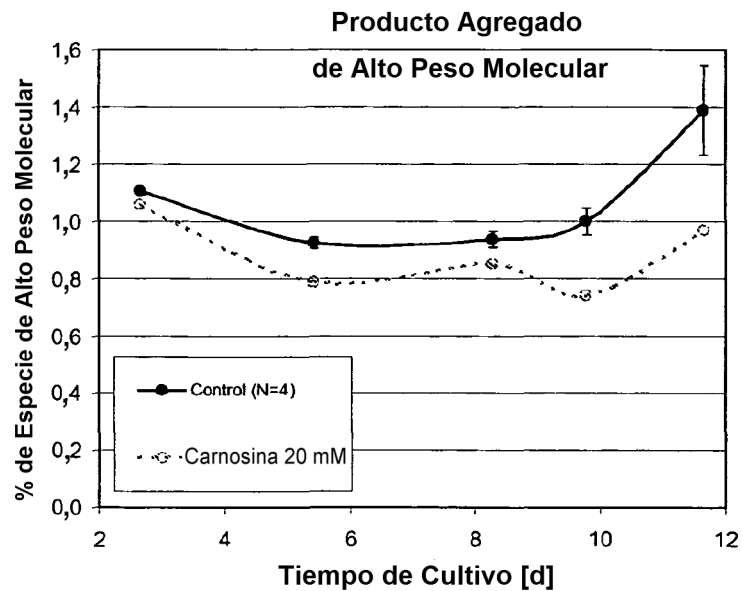


Figura 8. Perfiles de Título de Producto de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que Produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medios que Contienen o Carecen de Carnosina

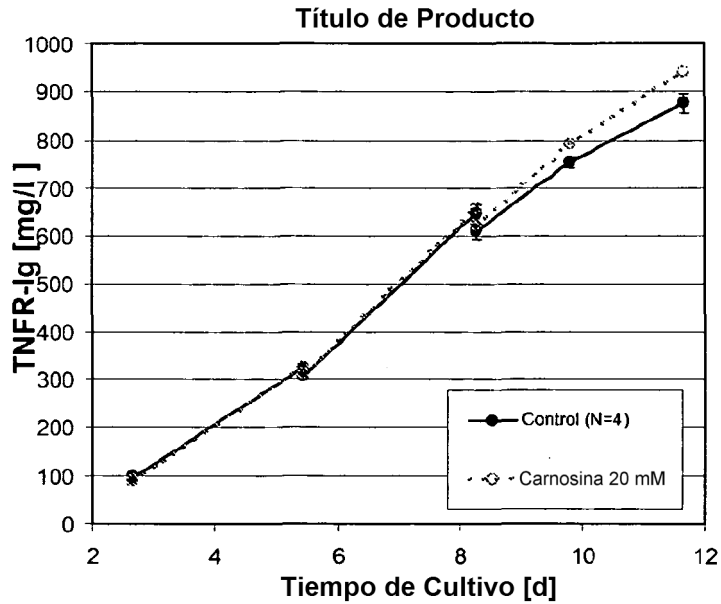


Figura 9. Perfiles de Productividad Celular Específica de una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) que produce Proteína de Fusión TNFR Recombinante Cultivada en Medios que Contienen o Carecen de Carnosina

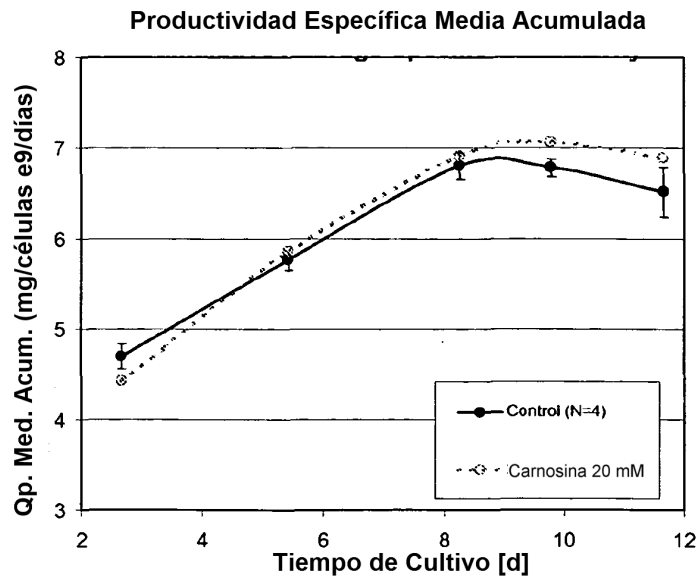


Figura 10. Perfiles de Sialilación Total, Expresados como un Porcentaje del Material de Referencia, de Proteína de Fusión TNFR Recombinante producida por una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) Cultivada en Medios que Contiene o Carecen de Carnosina

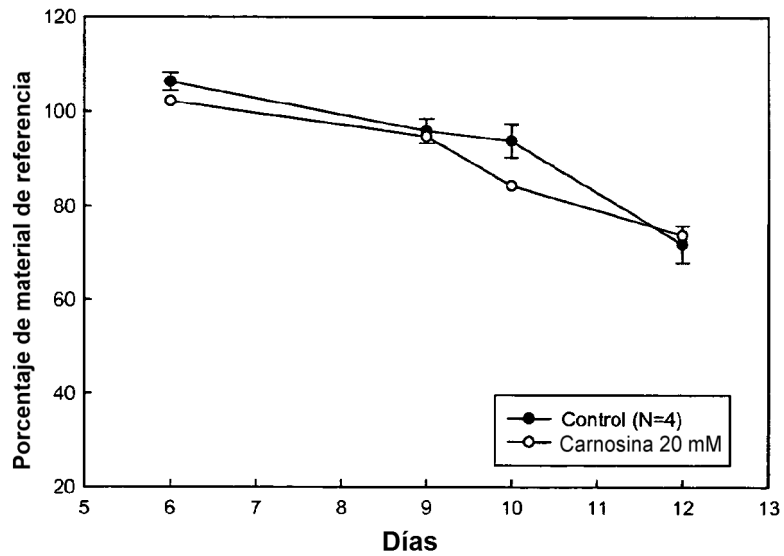


Figura 11. Distribución de Oligosacáridos Ligados a N Sialilados, expresada como un porcentaje de Oligosacáridos Ligados a N Totales, de Proteína de Fusión TNFR Recombinante Producida por una Línea Celular de Ovario de Hámster Chino (CHO) Cultivada en Medios que Contienen o Carecen de Carnosina

