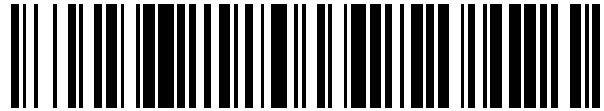


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 374**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2006 E 06844211 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 1941026**

54 Título: **Procedimientos de producción de proteínas usando compuestos anti senescencia**

30 Prioridad:

**24.10.2005 US 729573 P**

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

**13.08.2014**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**LUAN, YEN-TUNG;  
WANG, WENGE;  
THODAY, PAUL;  
DRAPEAU, DENIS y  
CHOU, JUDY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 485 374 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 anti senescencia

**Antecedentes de la invención**

5 La presente divulgación se refiere, en general, a la producción de proteínas en cultivos de células de mamífero. En particular, la presente divulgación se refiere al cultivo de células de mamífero en presencia de un compuesto anti senescencia, por ejemplo carnosina, para mantener la viabilidad y aumentar la productividad con mayor calidad. El cultivo de células ha producido muchos productos proteicos. Estos productos, tales como anticuerpos monoclonales producidos por hibridoma, pueden usarse para aplicaciones terapéuticas, de investigación u otras. Las células animales, de manera destacable células de mamífero, se usan a menudo para producir proteínas.  
10 Desafortunadamente, el uso de células animales hace que el proceso de producción consuma tiempo y sea costoso.

Añadir un agente químico a un medio de cultivo celular puede aumentar la productividad de células induciendo a las células a producir un producto, por tanto aumentando el rendimiento general. El agente óptimo a usar varía dependiendo de un número de factores, incluyendo el producto proteico deseado y el tipo celular. Factores similares también afectan a la cantidad del agente elegido añadido y a cuándo se añade el agente al medio de cultivo celular.  
15 Los ejemplos de agentes son ácidos o sales alcanóicas, derivados de la urea, o dimetilsulfóxido (DMSO). Los agentes químicos, como el butirato sódico, pueden tener efectos diversos sobre 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 celular y la viabilidad.

A medida que las células producen una proteína, la proteína se secreta típicamente al medio de cultivo celular. La proteína específica, sin embargo, no es la única materia en el medio; también se encuentran a menudo en el medio agregados de elevado peso molecular, especies acídicas, y otros materiales, que pueden hacer que el proceso de purificación sea más laborioso y costoso. Hay disponibles técnicas y procedimientos para mejorar la calidad de la producción, permitiendo una purificación de proteínas más eficiente; incluyendo, entre otros, alterar las condiciones del biorreactor o usando una línea celular distinta. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad en el campo de las técnicas y procedimientos de producción de proteínas que conduzcan a procesos de purificación mejorados.  
20  
25

Por 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 a la vez que mantenga una elevada viabilidad celular. Lo que además se necesita es un agente que aumente la calidad del producto de la proteína disminuyendo la cantidad de agregados de elevado peso molecular y especies acídicas en el medio de cultivo celular.

**Sumario de la invención**

En determinadas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un proceso para la producción potenciada de un producto proteico. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de cultivo de células huésped que expresan una proteína de interés en un medio que comprende un compuesto anti senescencia de tal forma que la producción general de la proteína de interés se potencia. En determinadas realizaciones, dicho compuesto anti senescencia comprende carnosina.  
30  
35

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que potencian la producción de una proteína de interés. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona un medio de cultivo celular que comprende un compuesto anti senescencia que potencia la producción de una proteína de interés expresada en una célula huésped. En determinadas realizaciones, dicho compuesto anti senescencia comprende carnosina. En determinadas realizaciones, se combinan células huésped manipuladas genéticamente con un medio inóculo para formar un medio de cultivo celular, que se crece en un biorreactor. Durante un ciclo de producción del producto proteico deseado, pueden alterarse las condiciones del biorreactor y/o pueden añadirse suplementos para aumentar la productividad y/o mantener la viabilidad. Los suplementos pueden incluir un medio de alimentación y/o uno o más aditivos como en la presente divulgación, carnosina y/o otros compuestos anti senescencia.  
40

Las células huésped de mamífero, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) pueden experimentar una reducción en la viabilidad al llegar al final de un ciclo de producción en un biorreactor. Se ha descubierto que la adición de un agente anti senescencia, como carnosina y análogos de la misma, a un medio de cultivo celular ayuda a mantener un número más elevado de células viables y la viabilidad celular hasta que se recoge la proteína.  
45

Además, pueden usarse procedimientos para aumentar la productividad, como alterar la temperatura después de la etapa de crecimiento y/o durante la etapa de producción del ciclo de producción de acuerdo con la presente invención. Para dar solo un ejemplo, durante la producción de un producto proteico, en concreto el anticuerpo para el factor de diferenciación de crecimiento 8 (GDF-8), se disminuyó la temperatura para ayudar a iniciar y aumentar la productividad. En determinadas realizaciones, la adición de un compuesto anti senescencia como carnosina ayuda a aumentar la productividad del cultivo celular. En determinadas realizaciones, puede añadirse un compuesto anti senescencia antes, durante y/o después de dicho cambio de temperatura.  
50  
55

También se ha descubierto que la adición de un compuesto anti senescencia como carnosina a un medio de cultivo celular aumenta la calidad general del producto proteico. Durante la producción de la proteína, se encuentran en el medio de cultivo celular agregados de elevado peso molecular, junto con otras especies no deseadas. La adición de carnosina disminuye la cantidad de agregados de elevado peso molecular y aumenta la calidad del producto. En determinadas realizaciones, la adición de un compuesto anti senescencia distinto de carnosina disminuye la acumulación de dichos agregados de elevado peso molecular y mejora la calidad del producto. En determinadas realizaciones, la carnosina se añade en combinación con uno o más compuestos anti senescencia adicionales.

La concentración del compuesto anti senescencia (por ejemplo, carnosina) añadido al medio de cultivo celular puede variar dependiendo de varios factores del proceso, incluyendo, por ejemplo, el tipo celular, el producto deseado, y las condiciones del biorreactor, entre otros. También, puede sustituirse la carnosina por sus análogos: acetilcarnosina, homocarnosina, anserina, y  $\beta$ -alanina. En determinadas realizaciones, la carnosina se proporciona en combinación con uno o más compuestos anti senescencia adicionales. En determinadas realizaciones, la concentración del agente anti senescencia (por ejemplo, carnosina) en un medio de cultivo celular es de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM. En determinadas realizaciones, la concentración es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM. En determinadas realizaciones, la concentración es de aproximadamente 20 mM.

Pueden usarse cualquier procedimiento de cultivo y medio inóculo adecuado para cultivar las células en el proceso de producción de proteína. Pueden usarse tanto medio con suero como medio sin suero. Además, los procedimientos de cultivo pueden usarse para cultivar las células según sea necesario para el tipo celular y producto proteico específicos. Dichos procedimientos son conocidos y entendidos por los expertos en la técnica de cultivos celulares.

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

#### **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1a. Efecto de la carnosina sobre los picos ácidos para MYO-29.

Figura 1b. Efecto de la carnosina sobre agregados de elevado peso molecular.

Figura 1c. Efecto sobre los picos ácidos de las adiciones de carnosina en días diferentes.

Figura 1d. Efecto de las adiciones de carnosina sobre los agregados de elevado peso molecular en días diferentes.

Figura 2a. Efecto de la carnosina sobre la densidad de células viables diaria.

Figura 2b. Efecto de la carnosina sobre la viabilidad celular diaria.

Figura 2c. Efecto de la carnosina sobre el título diario.

Figura 2d. Efecto de la carnosina sobre la productividad celular específica acumulativa.

Figura 2e. Efecto de la carnosina sobre los agregados de elevado peso molecular.

Figura 3a. Efecto de diferentes concentraciones de carnosina sobre la densidad de células viables.

Figura 3b. Efecto de diferentes concentraciones de carnosina sobre la viabilidad celular diaria.

Figura 3c. Efecto de diferentes concentraciones de carnosina sobre el título diario.

Figura 3d. Efecto de diferentes concentraciones de carnosina en la productividad celular específica acumulativa.

Figura 3e. Efecto de diferentes concentraciones de carnosina sobre los agregados de elevado peso molecular.

#### **Definiciones**

Siguiendo la convención de hace mucho tiempo, los términos "un", "una" y "uno", significan "uno o más" cuando se usan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Aunque la invención se ha descrito con determinado grado de particularidad, es evidente que varias alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la divulgación. Por consiguiente, se pretende que todas dichas alternativas, modificaciones, y variaciones, que se encuentren dentro del espíritu y ámbito de la invención, se engloben por las reivindicaciones definidas.

La expresión "compuesto anti senescencia" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier agente o compuesto que, cuando se añade a un cultivo celular, promueva la viabilidad, crecimiento, y/o tiempo de vida de una célula crecida en él. En determinadas realizaciones, un dicho compuesto anti senescencia en un cultivo celular da como resultado un título aumentado, una productividad específica celular aumentada, una viabilidad celular aumentada, una densidad de células viables integradas aumentada, una acumulación de agregados de elevado peso molecular disminuida, y/o una acumulación de especies ácidas disminuida de las que se observarían en condiciones de cultivo por lo demás idénticas que carezcan del compuesto anti senescencia. Los ejemplos no limitantes de compuesto anti senescencia que pueden usarse de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención incluyen carnosina, acetilcarnosina, homocarnosina, anserina, y  $\beta$ -alanina. En determinadas realizaciones, pueden usarse dos o más compuestos anti senescencia de acuerdo con las composiciones y procedimientos de la presente invención.

La expresión "célula huésped" se refiere a células que son capaces de ser manipuladas genéticamente y/o son capaces de crecer y sobrevivir en un medio de cultivo celular. Típicamente, las células pueden expresar una gran

cantidad de una proteína de interés endógena o heteróloga y pueden tanto contener la proteína o secretarla al medio de cultivo celular.

5 Las células huésped son típicamente “células de mamífero”, que comprenden los ejemplos no limitantes de células de vertebrado, incluyendo de riñón de cría de hámster (BHK), de ovario de hámster chino (CHO), riñón humano (293), fetales normales diploides de mono rhesus (FRhL-2), y mieloma murino (por ejemplo SP2/0 y NS0). Un experto en la técnica será consciente de que pueden usarse otras células huésped de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención.

10 La expresión “medio de cultivo celular” se refiere a una solución que contiene nutrientes para mantener la supervivencia celular en condiciones en que las células puedan crecer y producir una proteína deseada. Las expresiones “medio de inoculación” o “medio inóculo” se refieren a una solución o sustancia que contiene nutrientes en la que se inicia un cultivo de células. En determinadas realizaciones un “medio de alimentación” contiene nutrientes similares a los del medio de inoculación, pero es una solución o sustancia con la que las células se alimentan después de la iniciación del cultivo. En determinadas realizaciones, un medio de alimentación contiene uno o más componentes no presentes en un medio de inoculación. En determinadas realizaciones, un medio de alimentación carece de uno o más componentes presentes en el medio de inoculación. Un experto en la técnica de cultivos celulares conocerá sin experimentación innecesaria qué componentes se encuentran en los medios de inoculación de cultivo. Típicamente, estas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos, y oligoelementos necesarios para el crecimiento y supervivencia celular. En determinadas realizaciones, un medio de inoculación, un medio de alimentación o ambos comprenden un compuesto anti senescencia.

20 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. Los procedimientos y composiciones de la presente invención se usan ventajosamente para mejorar una o más características de un cultivo celular. En determinadas realizaciones, la mejora de una característica de un cultivo celular comprende aumentar la magnitud de una característica de un cultivo celular. En determinadas realizaciones, la mejora de una característica de cultivo celular comprende disminuir la magnitud de una característica de cultivo celular. Como ejemplos no limitantes, una característica de cultivo celular puede ser el título, productividad específica de las células, viabilidad celular, densidad de células viables integradas, acumulación de agregados de elevado peso molecular, y/o acumulación de especies ácidas. Un experto en la técnica será consciente de que pueden mejorarse otras características de cultivo celular usando los procedimientos y composiciones de la presente invención.

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

30 La expresión “medio complejo” como se usa en el presente documentos se refiere a un medio que contiene al menos un componente cuya identidad o cantidad es o bien conocida o sin controlar.

35 La expresión “línea celular” se refiere, generalmente, a 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 las secuencias unidas, ya sean endógenas o heterólogas. En determinadas realizaciones, las células derivadas de dichas células modificadas genéticamente forman una línea celular y se colocan en un medio de cultivo celular para su crecimiento y producción del producto proteico. En determinadas realizaciones, una línea celular comprende células huésped primarias que no se han transfectado con ADN exógeno y expresan una proteína endógena de interés.

40 La “etapa de crecimiento” de un medio de cultivo celular se refiere al período en que las células están experimentando una rápida división y creciendo exponencialmente, o de manera prácticamente exponencial. Típicamente, las células se cultivan en condiciones optimizadas para crecimiento celular durante generalmente 1-4 días. Las condiciones de la fase de crecimiento pueden incluir una temperatura de aproximadamente 35 °C a 42 °C, generalmente aproximadamente 37 °C. La duración de la etapa de crecimiento y las condiciones de cultivo en la etapa de crecimiento pueden variar pero son conocidas para un experto en la técnica de cultivos celulares. En determinadas realizaciones, un medio de cultivo celular en etapa de crecimiento se suplementa con un medio de alimentación.

45 La “etapa de transición” sucede durante el periodo en que el medio de cultivo celular está siendo cambiado de condiciones coherentes con la etapa de crecimiento a condiciones coherentes con la etapa de producción. Durante la etapa de transición, se cambian a menudo factores como la temperatura, entre otros. En determinadas realizaciones, un medio de cultivo celular en etapa de transición se suplementa con un medio de alimentación.

50 La “etapa de producción” sucede después tanto de la etapa de crecimiento como de la etapa de transición. El crecimiento exponencial de las células ha terminado y el objetivo principal es la producción de proteínas. El medio de cultivo celular puede suplementarse para iniciar la producción. En determinadas realizaciones, un medio de cultivo celular en una etapa de producción se suplementa con un medio de alimentación. Además, la temperatura del medio

de cultivo celular durante la etapa de producción puede ser más baja, generalmente, que durante la etapa de crecimiento, lo que típicamente promueve la producción. La etapa de producción continúa hasta que se alcanza un punto final deseado.

5 La expresión “densidad de células viables” se refiere al número total de células que sobreviven en el medio de cultivo celular en un volumen concreto, generalmente por ml. La expresión “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.

10 “Densidad de células viables integradas”, “IVCD”: Las expresiones “densidad de células viables integradas” o “IVCD” como se usa en el presente documento se refiere a la densidad media de células viables durante el transcurso del cultivo multiplicada por la cantidad de tiempo del ciclo de cultivo. Cuando la cantidad de proteína producida es proporcional al número de células viables presente a lo largo del cultivo, la densidad de células viables integrada es una herramienta útil para estimar la cantidad de proteína producida durante el transcurso del cultivo.

15 La expresión “agregados de elevado peso molecular” se refiere a proteínas generalmente mal plegadas o a una asociación impropia de al menos dos polipéptidos. La asociación puede surgir mediante cualquier procedimiento incluyendo, pero sin limitación, reticulación covalente, no covalente, disulfuro, o no reducible. En determinadas realizaciones, los procedimientos y composiciones de la presente invención se usan ventajosamente para reducir la acumulación de agregados de elevado peso molecular.

El término “antioxidante” se refiere a un compuesto que puede evitar el daño oxidativo en lípidos, proteínas, ADN y otras macromoléculas esenciales bloqueando radicales libres.

20 Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” incluye una proteína que comprende al menos uno, y típicamente dos, dominios VH o porciones del mismo y/o al menos uno, y típicamente dos, dominios VL o porciones del mismo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina están interconectadas mediante, por ejemplo, uniones disulfuro. Los anticuerpos, o una porción de los mismos, pueden obtenerse de cualquier origen, incluyendo, pero sin limitación a, roedores, primates, (por ejemplo primate humano y no humano), o camélidos, así como producidos de manera recombinante, por ejemplo, quiméricos, humanizados, y/o generados *in vitro*, como se describe en más detalle en el presente documento.

30 Los ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen, pero sin limitación a, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente 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 un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable de camélido o camelizado; (vii) una cadena sencilla Fv (scFv); (viii) un anticuerpo biespecífico, y (ix) uno o más fragmentos de una molécula de inmunoglobulina fusionados a una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican mediante genes separados, pueden unirse, empleando procedimientos recombinantes, mediante un enlazante sintético que permita producirlos como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena sencilla Fv (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-26; Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-83). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén englobados en el término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica, y la función de los fragmentos se evalúa la del mismo modo que con los anticuerpos intactos.

45 El “fragmento de unión a antígeno” puede, opcionalmente, incluir además un resto que potencia uno o más de, por ejemplo, estabilidad, función celular de efector o complementar la fijación. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede además incluir un resto pegilado, albúmina, o una región constante de cadena ligera y/o pesada.

50 A diferencia de los anticuerpos “bienespecíficos” o “bifuncionales”, se entiende que un anticuerpo tiene idénticos cada uno de sus sitios de unión. Un “anticuerpo biespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares distintos de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión distintos. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una variedad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab' véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

55 Se encuentran disponibles numerosos procedimientos conocidos para los expertos en la técnica para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante la generación de hibridomas de acuerdo con procedimientos conocidos. Los hibridomas formados de este modo se evalúan típicamente usando procedimientos estándar, como ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) y análisis de resonancia de plasmón superficial (Biacore™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno específico. Cualquier forma del antígeno específico puede usarse como el inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas de origen

natural, y variantes o fragmentos de los mismos, así como péptidos antigénicos de los mismos.

Un procedimiento ejemplar de fabricación de anticuerpos incluye evaluar librerías de expresión de proteínas, por ejemplo, librerías de presentación de fagos o ribosomas. La presentación de fagos se describe, por ejemplo, por Ladner y col., Patente de los Estados Unidos N°. 5.223.409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809.

Además del uso de librerías de presentación, el antígeno específico puede usarse para inmunizar a un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata. En determinadas realizaciones, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible modificar mediante ingeniería genética cepas de ratón deficientes en producción de anticuerpos de ratón con fragmentos completos del locus humano de Ig. Mediante el uso de la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse anticuerpos monoclonales específicos de antígeno derivados de genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green y col. (1994) Nature Genetics 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, publicado el 31 Oct., 1996, y solicitud PCT N°. PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril., 1996.

En determinadas realizaciones, se obtiene un anticuerpo monoclonal a partir de un animal no humano, y después se modifica, por ejemplo, humaniza, desinmuniza, quimeriza, produciéndose mediante el uso de técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Se han descrito una variedad de enfoques para fabricar anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda y col., Nature 314:452, 1985, Cabilly y col., Patente de los Estados Unidos. N° 4.816.567; Boss y col., Patente de los Estados Unidos N°. 4.816.397; Tanaguchi y col., publicación de patente Europea EP171496; publicación de patente Europea 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B. Los anticuerpos humanizados también pueden producirse, por ejemplo, usando ratones transgénicos que expresan genes humanos de cadena pesada y ligera, pero son incapaces de expresar los genes de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón endógena. Winter describe un procedimiento de injerto de CDR de ejemplo que puede usarse para preparar anticuerpos humanizados descritos en el presente documento (Patente de los Estados Unidos N° 5.225.539). Todos los CDR de un anticuerpo humano particular pueden reemplazarse con al menos una porción de un CDR no humano, o solo algunos de los CDR pueden reemplazarse por CDR no humanos. Solo es necesario reemplazar el número de CDR requeridos para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos pueden generarse reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente involucradas en la unión a antígeno con secuencias equivalentes de los dominios variables Fv humanos. Los procedimientos ejemplares para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se proporcionan por Morrison (1985) Science 229:1202-1207; por Oi y col. (1986) Bio-Techniques 4:214; y por los documentos US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213. Dichos procedimientos incluyen aislamiento, manipulación y expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la totalidad o parte de los dominios variables Fv de la inmunoglobulina de al menos una cadena pesada o ligera. Dichos ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se describe anteriormente, así como de otras fuentes. Un ADN recombinante que codifica una molécula de anticuerpo humanizada puede entonces clonarse en un vector de expresión apropiado.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado se optimiza mediante la introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencias consenso, sustituciones de la línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden fabricarse mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica, (por ejemplo, Teng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor y col., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson y col., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982), y pueden fabricarse de acuerdo con las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o del documento EP0239400).

Un anticuerpo o fragmento del mismo también puede modificarse mediante la delección específica de epítopos de linfocitos T humanos o "desinmunización" mediante los procedimientos divulgados en el documento WO 98/52976 y el documento WO 00/34317. En resumen, los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo pueden analizarse para péptidos que se unen a la clase II de MHC; estos péptidos representan epítopos potenciales de linfocitos T (como se define en el documento WO98/52976 y el documento WO00/34317). Para la detección de epítopos de linfocitos T potenciales, puede aplicarse un enfoque de modelado por ordenador llamado "reconocimiento de plegamiento de péptidos", y además puede hacerse una búsqueda en una base de datos de péptidos de unión de clase II de MHC humano para motivos presentes en las secuencias de VH y VL, como se describe en el documento WO98/52976 y WO00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos principales de DR de clase II de MHC, y por tanto constituyen epítopos potenciales de linfocitos T. Los epítopos potenciales de linfocitos T detectados pueden eliminarse sustituyendo pequeñas cantidades de restos de aminoácidos en los dominios variables, o preferentemente, mediante sustituciones de aminoácidos sencillas. Típicamente, se efectúan sustituciones conservativas. A menudo, pero no de manera exclusiva, puede usarse un aminoácido común a una posición en secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se divulgan por Tomlinson, y col. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. y col. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. y col. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; y Tomlinson y col. (1995) EMBO J. 14:4628-4638. El directorio V BASE proporciona un amplio directorio de secuencias de la región variable de la inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. y col. MRC Centre for Protein Engineering,

Cambridge, R.U.). Estas secuencias pueden usarse como una fuente de secuencia humana, por ejemplo, para regiones de marco conservado y CDR. Las regiones de marco conservado humano consenso también pueden usarse, por ejemplo, como se describe en el documento US 6.300.064.

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede contener una región constante de inmunoglobulina alterada o región Fc. Por ejemplo, un anticuerpo producido de acuerdo con las enseñanzas del presente documento puede unirse con más fuerza o más especificidad a moléculas efectoras como receptores complemento y/o Fc, que pueden controlar varias funciones inmunes del anticuerpo como la actividad de célula efectora, lisis, actividad mediada por complemento, aclaramiento de anticuerpos, y vida media del anticuerpo. Los receptores Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen, pero sin limitación, receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII y FcRn, incluyendo variantes alélicas y como alternativa formas empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc se revisan por Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92, 1991; Capel y col., Immunomethods 4:25-34, 1994; y de Haas y col., J. Lab.Clin. Med. 126:330-41, 1995).

El término "biorreactor" se refiere a un recipiente en el que se puede contener un medio de cultivo celular y donde las condiciones internas de este pueden controlarse durante el periodo de cultivo, por ejemplo, el pH y la temperatura.

15 Un "cultivo discontinuo alimentado" se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el cual las células primeramente se inoculan en un biorreactor con un medio inóculo. El medio de cultivo celular se suplementa a continuación en uno o más puntos a lo largo del ciclo de producción con un medio de alimentación que contiene componentes nutricionales y/o otros suplementos.

20 Un "cultivo discontinuo" se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el cual las células se inoculan en un biorreactor con todos los nutrientes necesarios y suplementos para el ciclo de producción completo. No se producen adiciones de nutrientes al medio de cultivo celular durante la duración de la producción.

25 Un "cultivo en perfusión" se refiere a un procedimiento de cultivo de células que es diferente del procedimiento de cultivo discontinuo o de cultivo discontinuo alimentado, en el que el cultivo no se termina, o no es necesariamente terminado, antes de aislar y/o purificar una proteína de interés expresada, y en el cual se añaden periódica o continuamente nutrientes y otros componentes al cultivo, durante el cual la proteína expresada se recoge de manera continua o periódica. La composición de los nutrientes añadidos puede cambiarse durante el transcurso del cultivo celular, dependiendo de las necesidades de las células, los requisitos para una producción óptima de proteínas, y/o cualquiera de una variedad de otros factores conocidos para los expertos en la técnica.

30 El término "expresión" se refiere a la transcripción y traducción que sucede en una célula huésped. El nivel de expresión se refiere, generalmente, a la cantidad de proteína que se produce por la célula huésped.

Los términos "proteína" o "producto proteico" se refieren a una o más cadenas de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, el término "proteína" es sinónimo de "polipéptido" y, como se entiende generalmente en la técnica, se refiere a al menos una cadena de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos secuenciales. En determinadas realizaciones, una "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógeno que se ha transformado en una célula huésped. En determinadas realizaciones, una "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es endógena de la célula huésped. En determinadas realizaciones, la expresión de dicha proteína endógena de interés se altera transfectando una célula huésped con una molécula de ácido nucleico exógena que puede, por ejemplo, contener una o más secuencias reguladores y/o codificar una proteína que potencia la expresión de la proteína de interés. Pueden usarse procedimientos y composiciones de la presente invención para producir cualquier proteína de interés, incluyendo, pero sin limitación a, proteínas que tengan propiedades terapéuticas, farmacéuticas, diagnósticas, agrarias y/o cualquiera de una variedad de otras propiedades que son útiles en aplicaciones comerciales, experimentales y/o otras. En determinadas realizaciones, las proteínas producidas empleando los procedimientos y/o composiciones de la presente invención pueden procesarse y/o modificarse. Por ejemplo, una proteína a producir de acuerdo con la presente invención puede glicosilarse.

"Productividad específica de la célula", y similares, se refieren a la tasa de expresión del producto específica, como en por célula. La productividad específica de la célula se mide generalmente en microgramos de proteína producida por cada 10<sup>6</sup> células por día o en picogramos de proteína producida por cada 10<sup>6</sup> células por día.

50 El término "título" como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad total de proteína expresada de forma recombinante producida por un cultivo celular en una cantidad dada de volumen de medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos o microgramos de proteína por mililitro de medio.

55 Un experto en la técnica reconocerá que los procedimientos divulgados en el presente documento pueden usarse para cultivar muchas de las bien conocidas células de mamífero usadas de manera rutinaria y cultivadas en la técnica, es decir, los procedimientos divulgados en el presente documento no se limitan a su uso solo con la presente divulgación.

**Descripción detallada de determinadas realizaciones de la invención**

Se ha descubierto que usando un compuesto anti senescencia como carnosina se modifica la viabilidad y productividad de un cultivo celular. Por ejemplo, la adición de carnosina mantiene la viabilidad celular, y mejora la productividad de las células, y mejora la calidad del producto proteico deseado. La carnosina es un antioxidante y un compuesto anti senescencia que es también un dipéptido de origen natural presente a elevados niveles (hasta 20 mM) en los tejidos nerviosos y musculares de mamíferos. Al ser un antioxidante, la carnosina también es un secuestrante de radicales libres y un inhibidor de la glicación. En general, la carnosina transforma especies reactivas en especies no reactivas, por tanto protegiendo a las proteínas, ADN, y otras macromoléculas esenciales. Como compuesto anti senescencia, la carnosina puede extender la vida media de fibroblastos diploides humanos y células de pulmón fetales humanas (líneas celulares primarias) a una concentración de 20 mM en medio de cultivo. La presente invención engloba el descubrimiento sorprendente de que es ventajoso usar un compuesto anti senescencia (incluyendo, pero sin limitación a, carnosina) en un cultivo celular para producir una proteína de interés. En determinadas realizaciones, el uso de dicho compuesto anti senescencia en el cultivo celular para producir una proteína de interés da como resultado una o más características del cultivo celular mejoradas incluyendo, pero sin limitación a, título aumentado, productividad específica de la célula aumentada, viabilidad celular aumentada, densidad de células viables integradas aumentada, acumulación de agregados de elevado peso molecular disminuida, y/o acumulación de especies ácidas disminuida.

Se ha demostrado que la carnosina es citotóxica para células de humano o roedor transformadas y neoplásicas en Medio Esencial Mínimo (MEM, sigma), que tiene niveles de glucosa más bajos, pero no en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, sigma), que contiene piruvato 1mM. (Holliday y col, Biochemistry (Moscú), 65:843-848,846). Además, el suero fetal bovino dializado con los compuestos de bajo peso molecular eliminados aumentó los efectos citotóxicos de la carnosina. Asimismo, también se determinó que el oxoalacetato 1 mM y 1mM de  $\alpha$ -ketoglutarato tenían efectos comparables al piruvato, no siendo ninguno de ellos componentes del medio inóculo o de alimentación usado con los ejemplos de carnosina. Asimismo, el piruvato sodico, sin embargo, es un componente original en el medio inóculo a una concentración de 0,5 mM, no para las adiciones de carnosina sino para mimetizar mejor las condiciones in vivo en un sistema de biorreactor y como una fuente de energía alternativa potencial. El medio inóculo también está libre de suero, lo que puede implicar que la carnosina pueda tener efectos citotóxicos. De acuerdo con la referencia, la adición de carnosina a un medio de cultivo celular puede tener efectos citotóxicos similares como se ve en el medio MEM en *Holliday*. Mediante el uso de los procedimientos y/o composiciones de la presente invención, se reduce o elimina dicha citotóxicidad y se mejoran la viabilidad celular y la producción de proteína.

En determinadas realizaciones, la carnosina se proporciona a un medio de cultivo celular a una concentración de entre aproximadamente 5mM y aproximadamente 100 mM. En determinadas realizaciones, la carnosina se proporciona a 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 determinadas realizaciones, la carnosina se proporciona a 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 determinadas realizaciones, dichas concentraciones de carnosina se logran en cultivos celulares mediante la adición de carnosina en diversos tiempos durante el proceso 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 esté usando, entre otros factores, incluyendo los efectos deseados que se busquen en el producto o línea celular. También pueden proporcionarse a un medio de cultivo celular análogos de carnosina, por ejemplo, acetilcarnosina, homo-carnosina, anserina, y  $\beta$ -alanina para lograr un efecto similar. Uno o más de estos análogos pueden proporcionarse a un medio de cultivo celular. En determinadas realizaciones, dichos análogos se proporcionan a un medio de cultivo celular que carece de carnosina. En determinadas realizaciones, dichos análogos se proporcionan a un medio de cultivo celular en combinación con carnosina. En determinadas 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, 38, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 mM, o mayor.

En determinadas 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 manera constitutiva el producto proteico deseado. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico introducida en la célula codifica la proteína deseada para expresarse de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico contiene una secuencia reguladora o codifica un producto génico que incluye o potencia la expresión por parte de la célula de la proteína deseada. Como ejemplo no limitante, dicho producto génico puede ser un factor de transcripción que aumenta la expresión de la proteína de interés.

En determinadas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de una proteína se introduce de manera estable en la célula huésped. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de una proteína se introduce de manera transitoria en la célula huésped. Un experto en la técnica será capaz de elegir entre introducir el ácido nucleico de manera estable o transitoria en la célula basándose en las necesidades



experimentales, comerciales u otras.

Un gen que codifica una proteína de interés puede unirse opcionalmente a uno o más elementos reguladores de control genético. 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 proporciona expresión inducible de un gen que codifica la proteína de interés. El uso de un elemento de control genético inducible (por ejemplo, un promotor inducible) permite la modulación de la producción de la proteína en la célula. Los ejemplos no 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. EE.UU.90: 5603-5607, 1993), elementos sintéticos regulados por ligando (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. EE.UU. 89:10149-10153, 1992). Pueden usarse de acuerdo con los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento otros sistemas reguladores adicionales conocidos en la técnica específicos de célula.

Cualquier célula susceptible de cultivo celular, y de expresión de proteínas, puede usarse de acuerdo con la presente invención. Las células huésped son generalmente de mamífero, más particularmente células animales, tales como las células de ovario de hámster chino (CHO). Otros ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la 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 mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col; J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de ratón (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1 587); células de carcinoma de cérvix humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 51); células TRI (Mather y col, Annals N.Y.Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Cualquier proteína que pueda expresarse en una célula huésped puede producirse de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención. La proteína puede expresarse a partir de un gen que es endógeno de la célula huésped, o a partir de un gen heterólogo que se introduce en la célula huésped. La proteína puede ser una de origen natural, o puede como alternativa tener una secuencia que haya sido modificada por ingeniería genética o seleccionada por la mano del hombre. Una proteína a producir puede ensamblarse a partir de fragmentos de proteína que suceden individualmente en la naturaleza. De manera adicional o como alternativa, la proteína modificada por ingeniería genética puede incluir uno o más fragmentos que no son de origen natural.

En determinadas realizaciones, los procedimientos y composiciones de la presente invención se emplean para expresar una enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. farmacéutica o comercialmente relevante. En el presente ejemplo, las células manipuladas genéticamente producen un anticuerpo contra el factor de diferenciación de crecimiento 8 (GDF-8). Las realizaciones ilustrativas no limitantes se citan como Myo29, Myo28, y Myo22. Estas realizaciones ejemplares se proporcionan en forma de isótopos de IgG humana. Los ejemplos no limitantes divulgados usan MYO29 cubierto por la patente N° WO2004/037861 titulada Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Thereof, y se incorpora en el presente documento a modo de referencia. Un experto en la técnica será consciente de que otras proteínas útiles y/o deseables pueden expresarse de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención.

Las líneas celulares pueden cultivarse usando una variedad de técnicas para producir el producto proteico deseado. El cultivo celular puede hacerse a pequeña o gran escala, dependiendo del propósito, del medio de cultivo celular o uso del producto. Por ejemplo, las células pueden crecerse en un biorreactor. En determinadas 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 en tanque agitado, reactor de lecho fluidificado, biorreactor de fibra hueca, o botella rotatoria. Los sistemas también pueden operar en un modo de discontinuo, discontinuo alimentado, o continuo/de perfusión. El biorreactor y modo en que se controla y monitoriza el medio de cultivo celular será conocido para un experto en la técnica de cultivos celulares. En el presente ejemplo, el sistema utilizado es un biorreactor en tanque agitado y operado en modo discontinuo alimentado.

En gGeneral, se siembra el biorreactor con un medio inóculo y una línea celular seleccionada, por ejemplo, una línea celular MYO-29, que puede transfectarse para expresar de manera estable y producir el producto proteico deseado. Un medio comercial como Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), F10 de Ham (Sigma), o medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) pueden usarse como medio base. Estos medios base pueden suplementarse a continuación con aminoácidos, vitaminas, oligoelementos, y/o otros componentes para producir el medio inóculo o de alimentación usado durante el ciclo de producción. En determinadas realizaciones, se altera un medio base para permitir un crecimiento robusto de las 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, un medio base puede suplementarse con piruvato, oxaloacetato y/o  $\alpha$ -ketoglutarato. Un experto en la técnica será capaz de alterar un medio base para su uso con los procedimientos y composiciones de la presente invención sin experimentación innecesaria.

- 5 En determinadas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una variedad de medios químicos definidos que contienen un compuesto anti senescencia, en el que los componentes del medio son tanto conocidos como controlados. Por ejemplo, un medio definido típicamente no contiene aditivos complejos como suero o hidrolizados. En determinadas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una variedad de medios complejos que contienen un compuesto anti senescencia, en el que no todos los componentes del medio son conocidos y/o controlados. En determinadas realizaciones, dicho compuesto anti senescencia comprende carnosina.

10 Las condiciones del biorreactor se controlan, típicamente, con el pH ajustado entre aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. El pH se ajusta usando un ácido, generalmente  $\text{CO}_2$ , o una base, como bicarbonato de sodio. El oxígeno disuelto se controla entre aproximadamente 5 y 90 % de saturación de aire, y la temperatura se mantiene entre 30 °C a 42 °C, durante la fase de crecimiento. Un experto en la técnica de cultivos celulares puede modificar las condiciones del biorreactor basándose en la línea celular y procedimientos empleados para lograr los resultados deseados sin experimentación innecesaria.

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

20 Después de que las células se siembran, pasan a través de una etapa de crecimiento durante la cual el número de células generalmente aumenta de manera exponencial. Durante la etapa de crecimiento, la temperatura o intervalo de temperaturas del cultivo celular se seleccionará basándose primariamente en las temperaturas o intervalo de temperaturas a las que el cultivo celular se mantiene viable, en la que se produce un alto nivel de proteínas, en la que la producción o acumulación de productos de desecho metabólicos se minimiza, y/o cualquier combinación de estos u otros factores considerados importantes por el experto. A modo de ejemplo no limitante, las células CHO crecen adecuadamente y producen elevados niveles de proteína a aproximadamente 37 °C. En general, la mayoría de células de mamífero crecen bien y/o pueden producir elevados niveles de proteína dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos mostrados por la presente divulgación no están limitados a estas temperaturas. Determinadas células de mamífero crecen bien y/o pueden producir elevados niveles de proteína dentro del intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. En determinadas realizaciones, el cultivo celular se crece a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 °C en uno o más tiempos durante la etapa de crecimiento. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura apropiada o intervalo de temperaturas en el que crecer las células, dependiendo de las necesidades de las células y los requerimientos de producción del experto.

25 Seguidamente a la etapa de crecimiento, se encuentra una etapa de transición durante la que las células se adaptan a cualquier cambio que suceda en los alrededores, como un cambio de temperatura. Los cambios que suceden son típicamente parámetros para la etapa de producción. En los presentes ejemplos, en el día 4, la temperatura disminuyó de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 31 °C. El cambio de temperatura, sin embargo, puede suceder más de una vez y no necesita necesariamente ser a la baja. Además, la etapa de transición y el cambio de temperatura pueden suceder en cualquier día durante el ciclo de producción. Aunque la mayoría de los procedimientos de producción incluyen procesos multi etapa, la carnosina también puede utilizarse en procesos de etapa única.

30 Cuando se modifica la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede llevar varias horas o días completar el cambio de temperatura. Como alternativa, el cambio de temperatura puede ser relativamente abrupto. La temperatura puede aumentarse o disminuirse de manera progresiva durante el proceso de cultivo. Como alternativa, la temperatura puede aumentarse o disminuirse en cantidades discretas a diversos tiempos durante el proceso de cultivo. La temperatura o temperaturas o intervalos de temperatura posteriores pueden ser más bajos que o mayores que la temperatura o temperaturas o intervalo o intervalos de temperatura iniciales. Un experto en la técnica entenderá que varios cambios de temperatura discretos están englobados en estas realizaciones. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse una vez (ya sea a una temperatura más alta o más baja o intervalo de temperaturas), mantenerse las células a esta temperatura o intervalos de temperaturas durante un determinado periodo de tiempo, después del cual la temperatura puede cambiarse de nuevo a cualquier temperatura nueva o intervalo de temperaturas, que puede ser tanto mayor como menor que la temperatura o intervalo de temperaturas que la temperatura o intervalo de temperaturas anteriores. La temperatura del cultivo después de cada cambio discreto puede ser constante o puede mantenerse dentro de un intervalo determinado de temperaturas.

Finalmente, se encuentra la etapa de producción donde el número de células no aumenta de manera sustancial, sino que las células producen el producto proteico deseado. Un experto en la técnica entenderá, sin embargo, que en determinadas realizaciones, las células pueden continuar creciendo y aumentando en número durante la etapa de producción. Durante esta etapa el medio ambiente del biorreactor se controla en condiciones en las que las células es más probable que sean productivas. Por ejemplo, la temperatura generalmente se mantiene a una temperatura distinta de la de la etapa de crecimiento, que es conductiva a la producción de un producto proteico, por ejemplo, 31 °C. A lo largo del ciclo de producción, puede alimentarse a las células con un medio de alimentación que contiene nutrientes y suplementos que las células pueden necesitar. Por ejemplo, en determinados casos, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular durante la etapa de producción posterior con nutrientes u otros componentes del medio que se hayan consumido o metabolizado por las células. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular con hormonas y/o otros factores de crecimiento, iones concretos (como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía. Todos estos componentes suplementarios pueden añadirse al cultivo celular a la vez, o pueden proporcionarse al cultivo celular en una serie de adiciones. En determinadas realizaciones, se proporciona un compuesto anti senescencia en un medio de alimentación a uno o más tiempos durante la etapa de producción.

De acuerdo con determinadas realizaciones, el uso de un compuesto anti senescencia, por ejemplo, carnosina, en el medio de cultivo celular durante la etapa de producción, ya sea proporcionado en un medio de inoculación o en un medio de alimentación, aumenta la viabilidad celular y/o producción específica de proteína, mejorando por tanto el rendimiento general de proteína producida.

Los aspectos de un proceso de producción de proteína se determinan por un experto en la técnica de cultivos celulares. Los parámetros como la densidad de siembra, duración de la producción del cultivo; condiciones operativas durante la recolección, entre otros, incluyendo aquellas mencionadas anteriormente son funciones de la línea celular y del medio de cultivo celular. Por tanto, los parámetros pueden determinarse sin experimentación innecesaria por un experto en la técnica de cultivos celulares.

Como en el caso de la temperatura o intervalo de temperaturas durante la etapa de crecimiento, la temperatura o intervalo de temperaturas del cultivo celular durante la etapa de producción puede seleccionarse basándose primariamente en la temperatura o intervalo de temperaturas en el que el cultivo celular permanece viable, a la cual se produce un elevado nivel de proteínas, a la cual la producción o acumulación de productos de desechos metabólicos se minimiza, y/o cualquier combinación de estos u otros factores considerados importantes por el experto. En general, la mayor parte de las células de mamífero permanecen viables y producen elevados 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. En determinadas realizaciones, las células de mamífero permanecen viables y producen elevados niveles de proteína dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 35 °C. En determinadas realizaciones, el cultivo celular se crece 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 a uno o más tiempos durante la etapa de producción. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la(s) temperatura(s) adecuada(s) o intervalo(s) de temperatura(s) en los que crecer las células durante la etapa de producción, dependiendo de las necesidades particulares de las células y de los requerimientos de producción particulares del experto. Las células pueden crecerse durante cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del experto y de las necesidades de las propias células.

En determinadas realizaciones, los cultivos discontinuos o discontinuos alimentados se terminan una vez que el cultivo alcanza una o más condiciones de cultivo relevantes, determinadas por las necesidades del experto. En determinadas realizaciones, los cultivos discontinuos o discontinuos alimentados se terminan una vez que la proteína expresada alcanza un título suficientemente elevado, una vez que la densidad celular alcanza un nivel suficientemente elevado, una vez que la proteína expresada alcanza una densidad celular suficiente, y/o para evitar una producción no deseada o acumulación de productos de desecho metabólico (por ejemplo, lactato y/o amonio). Un experto en la técnica será consciente de otras condiciones de cultivo relevantes que puedan usarse para determinar cuándo un cultivo discontinuo o discontinuo alimentado debe terminarse, basándose en consideraciones experimentales, comerciales, y/o otras consideraciones.

En determinadas realizaciones, después de un ciclo de producción, el producto proteico se recupera del cultivo celular y se aísla posteriormente usando técnicas de separación tradicionales. Por ejemplo, la proteína puede separarse inicialmente mediante centrifugación, reteniendo 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 en un primer paso del proceso de purificación. La lisis de células huésped de mamífero puede lograrse mediante un número de medios conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo la disrupción física mediante perlas de vidrio y exposición a condiciones de elevado pH.

Mediante el uso de procedimientos convencionales de purificación de proteínas, la proteína puede aislarse de manera adicional. Los procedimientos mediante los cuales aislar y purificar el producto proteico deseado son

conocidos en la técnica de cultivos celulares. Los procedimientos específicos dependen de la línea celular usada y del producto buscado.

El compuesto anti senescencia, por ejemplo, carnosina, puede añadirse al medio de cultivo a un tiempo óptimo para el proceso específico de cultivo celular. Para los presentes ejemplos, la adición de carnosina sucede después de que la etapa de crecimiento esté sustancialmente completa y se encuentre en la etapa de transición. Durante la adición, el medio de cultivo celular se está adaptando a la nueva temperatura resultante del cambio de temperatura. La etapa de transición sucede generalmente cuando los agentes se añaden para ayudar a iniciar la etapa de producción. La carnosina, sin embargo, puede añadirse en cualquier punto durante el ciclo de producción que genere resultados óptimos, incluyendo la etapa de crecimiento y la etapa de producción. La carnosina también puede añadirse en combinación con otros componentes, como un medio de alimentación. En determinadas realizaciones, un compuesto anti senescencia se proporciona en un medio de inoculación y está presente en el cultivo celular durante el proceso de cultivo celular completo. En determinadas realizaciones, se proporcionan dos o más compuestos anti senescencia en el medio de cultivo celular. En determinadas realizaciones, dos o más compuestos anti senescencia se proporcionan en un medio de inoculación y están presentes en el cultivo celular durante el proceso de cultivo celular completo. En determinadas realizaciones, se proporcionan dos o más compuestos anti senescencia, en los que un compuesto anti senescencia se proporciona en un medio de inoculación y se encuentra presente en el cultivo celular durante el proceso entero de cultivo celular, mientras que el otro compuesto anti senescencia se proporciona después de que el cultivo celular haya comenzado.

En determinadas realizaciones, la concentración de un compuesto anti senescencia presente en el cultivo celular es diferente para distintos tipos celulares y productos. En determinadas realizaciones, la concentración de carnosina presente es diferente para distintos tipos celulares y productos. Generalmente, la concentración es suficiente para potenciar la productividad y calidad sin efectos tóxicos. Para los presentes ejemplos, el intervalo incluye, pero sin limitación a, de 5 mM a 100 mM. Se apreciará que la concentración de carnosina usada puede variar dependiendo del medio de cultivo celular. La concentración adecuada de carnosina para una línea celular concreta puede necesitar ser determinada mediante experimentos rutinarios a pequeña escala como, por ejemplo, un biorreactor de 2 l, usando procedimientos convencionales. Un experto en la técnica será capaz de determinar una concentración ventajosa u óptima de carnosina u otro compuesto anti senescencia sin experimentación innecesaria usando técnicas de cultivo celular y procedimientos diagnósticos que son conocidos en la técnica.

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

Otra ventaja es que el compuesto anti senescencia como carnosina disminuye la cantidad de agregados de elevado peso molecular y/o el número de especies ácidas. Disminuir la cantidad de agregados de elevado peso molecular y especies ácidas simplifica la purificación del producto proteico. Permitir que la proteína se aisle de una manera más eficiente disminuye el coste de producción del producto proteico. En determinadas realizaciones, se usa un compuesto anti senescencia distinto de carnosina para disminuir la cantidad de agregados de elevado peso molecular y/o especies ácidas. En determinadas realizaciones, se usan dos o más compuestos anti senescencia para disminuir la cantidad de agregados de elevado peso molecular y/o especies ácidas.

En determinadas realizaciones, las células se crecen de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de cultivo celular descritos en las Patentes de los EE.UU con Números de serie 11/213.308, 11/213.317 y 11/213.633 cada una de las cuales se registró el 25 de agosto de 2005, y cada una de las cuales se incorporó en el presente documento a modo de referencia en su conjunto. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las células pueden crecerse en un medio de cultivo en el que la concentración acumulativa de aminoácidos es mayor de aproximadamente 70 mM. En determinadas realizaciones, las células pueden crecerse en un medio de cultivo en el que la relación molar de glutamina acumulativa a asparagina acumulativa es menor de aproximadamente 2. En determinadas realizaciones, las células pueden crecerse en un medio de cultivo en el que la relación molar de glutamina acumulativa a aminoácido acumulado total es menor de aproximadamente 0,2. En determinadas realizaciones, las células pueden crecerse en un medio de cultivo en el que la relación molar de iones inorgánicos acumulativos a aminoácidos acumulativos totales sea de aproximadamente 0,4 a 1. En determinadas realizaciones, las células pueden crecerse en un medio de cultivo en el que la concentración acumulativa de glutamina y asparagina esté aproximadamente entre 16 y 36 mM. En determinadas realizaciones, las células pueden crecerse en un medio de cultivo que contenga 2, 3, 4 o todas las 5 de las condiciones del medio precedentes. El uso de dichos medios permite elevados niveles de producción de proteína y disminuye la acumulación de determinados factores no deseados como amonio y/o lactato.

En algunas realizaciones, las células se crecen en una o más de las condiciones descritas en la solicitud de patente provisional de los EE.UU con N° de serie 60/830.658, presentada el 13 de julio de 2006 e incorporada al presente

documento a modo de referencia en su conjunto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se crecen en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración de entre aproximadamente 10 y 600 nM. En algunas realizaciones, las células se crecen en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración de entre aproximadamente 20 y 100 nM. En determinadas realizaciones, las células se crecen en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración aproximadamente de 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 unidos covalentemente en una o más cadenas de oligosacáridos).

En determinadas realizaciones de la invención, las proteínas producidas de acuerdo con uno o más de los procedimientos de la presente invención tendrán una actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de compuestos farmacéuticos. Las proteínas producidas de acuerdo con uno o más de los procedimientos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse primeramente para su dispensación mediante cualquier vía disponible incluyendo, pero sin limitación a, vía parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosal, rectal, y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención típicamente incluyen una proteína purificada expresada por una línea celular de mamífero, un agente de dispensación (es decir, un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, tensoactivo, etc., como se describe anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse en las composiciones principios activos suplementarios.

Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración pretendida. Dichas formulaciones serán conocidas para los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones, una proteína producida de acuerdo con la presente invención se formula en forma oral y/o parenteral. En determinadas realizaciones, para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación, dichas formas orales y/o parenterales se formulan como formas de dosificación unitarias, en las 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 técnica conocerá formulaciones en dosificación unitaria apropiadas para proteínas producidas de acuerdo con la presente invención.

Determinadas realizaciones y aspectos se discuten en detalle anteriormente. La presente divulgación se ilustra además por los siguientes ejemplos no limitantes. Los expertos en la técnica entenderán, sin embargo, que varias modificaciones a estas realizaciones se encuentran dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Se indica que la adición de carnosina y/o otros compuestos anti senescencia es igualmente aplicable a otros cultivos de líneas celulares de mamífero y productos proteicos. Las reivindicaciones y equivalentes de las mismas definen el alcance de la presente invención, que no está, y no debe estar, limitada a, o, por la presente descripción de determinadas realizaciones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Experimentos de carnosina a escala de disco

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 cambió la temperatura de 37 °C a 31 °C en el día 4. El pH del biorreactor se mantuvo a 7,00 y el oxígeno disuelto se encontraba al 30 % de saturación de aire. El medio de cultivo celular se recogió del biorreactor en el día 4, día 7 y en el día 10 y se puso en discos de cultivo con un volumen de trabajo de 8. ml y se colocaron en un incubador a 31 °C, donde se cultivaron los discos de cultivo hasta el día 12. Las células se suplementaron con un medio de alimentación en los días 5 y 7. En el día 5, se añadió un 10 % (v/v) de medio de alimentación a los medios de cultivo y en el día 7 se añadió un 5 % (v/v) de medio de alimentación a los cultivos celulares. Se añadieron 10 mM de carnosina en los días 4, 7, y 10, respectivamente, a los discos y el medio de cultivo celular se recogió en el día 12.

La Figura 1a muestra el efecto de las adiciones de carnosina en la cantidad de picos ácidos en el cultivo en el día 7. La Figura 1b muestra el efecto de la carnosina en los agregados de elevado peso molecular en el cultivo del día 7. La Figura 1c ilustra el efecto de las adiciones de carnosina en el día 4, versus día 7, versus día 10 en los picos ácidos. La Figura 1d muestra los mismos resultados del experimento excepto para agregados de elevado peso molecular. En general, la carnosina tuvo un efecto positivo disminuyendo tanto los picos ácidos como los agregados de elevado peso molecular en los discos cultivados.

### Ejemplo 2

Efectos de la adición de carnosina al medio de cultivo celular

Se inocularon 5 biorreactores con  $0,9 \times 10^6$  células/ml con un de 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 5 % (v/v) de un medio de

5 alimentación en los días 3, 5, 7, y 12 de un ciclo de 14 días. Se añadió una alimentación en el día 10 de un 5 % (v/v) del medio de alimentación a dos de los biorreactores control y a uno que contenía carnosina. Las condiciones de los biorreactores se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, a un pH de 7,00, y un nivel de oxígeno disuelto al 30 % de saturación de aire. La velocidad de agitación fue de 200 rpm y el aire rociado tenía una combinación de aire y un 7 % de dióxido de carbono.

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

15 La Figura 2a muestra la densidad diaria de células viables. La Figura 2b muestra que la viabilidad celular diaria de los biorreactores con carnosina era mayor tras ser recogidas en comparación con dos biorreactores sin ella. La Figura 2c muestra el título diario de los biorreactores y que los dos biorreactores con carnosina presente tenían un título mayor en el momento de la recolección. Los cultivos con carnosina tenían una productividad celular específica acumulativa mejor mostrada en la Figura 2d. La Figura 2e muestra la cantidad de agregados de elevado peso molecular y muestra una disminución de agregados de elevado peso molecular en los biorreactores con presencia de carnosina.

### Ejemplo 3

Efecto de adiciones de diferentes concentraciones de carnosina

20 Se inocularon 4 biorreactores con  $0,4 \times 10^6$  células/ml con 1 l de volumen de trabajo de una línea celular MYO-29 en un medio de inoculación sin suero. Todos los biorreactores se alimentaron al 5 % (v/v) de un medio de alimentación en el día 7 de un ciclo de 14 días. Las condiciones del biorreactor se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, un pH de 7,00, y un nivel de oxígeno disuelto a un 30 % de saturación de aire. La tasa de agitación fue de 200 rpm y el gas rociado tenía una combinación de aire y un 7 % de dióxido de carbono.

25 Todas las células se cultivaron durante 4 días y en este punto la temperatura se cambió en todos los biorreactores a 31 °C. También en el día 4, se añadieron 20 mM de carnosina a un biorreactor, a un segundo se le añadieron 40 mM de carnosina, y los controles no tenían carnosina añadida. Todos los biorreactores se recogieron en el día 12 del ciclo de producción. Se tomaron muestras durante el ciclo para evaluar el progreso del medio de cultivo celular. Los controles rindieron en general como se esperaba, a excepción de un control que tenía un número de viabilidades diarias ligeramente menor de lo que se había visto anteriormente.

30

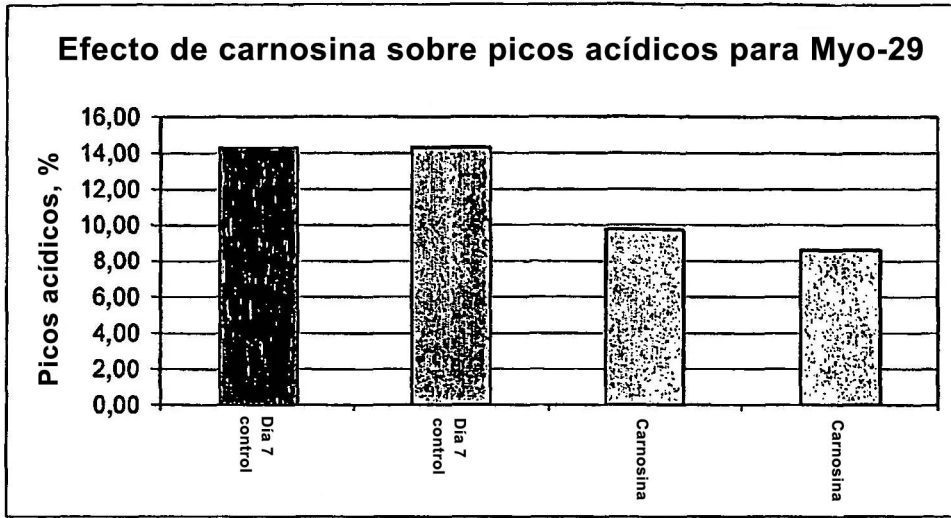
35 La Figura 3a muestra la densidad de células viables diaria, los diferentes biorreactores son prácticamente similares con la excepción del biorreactor con 40 mM de carnosina. La Figura 3b muestra que la viabilidad celular diaria de los biorreactores con carnosina tenía una mayor viabilidad tras ser recolectadas en comparación con los biorreactores 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 40 mM de carnosina tenía una productividad celular específica acumulativa mayor. (Figura 3d). La Figura 3e muestra la cantidad de agregados de elevado peso molecular; en general hay una disminución en agregados de elevado peso molecular con las adiciones de carnosina en comparación con los controles.

**REIVINDICACIONES**

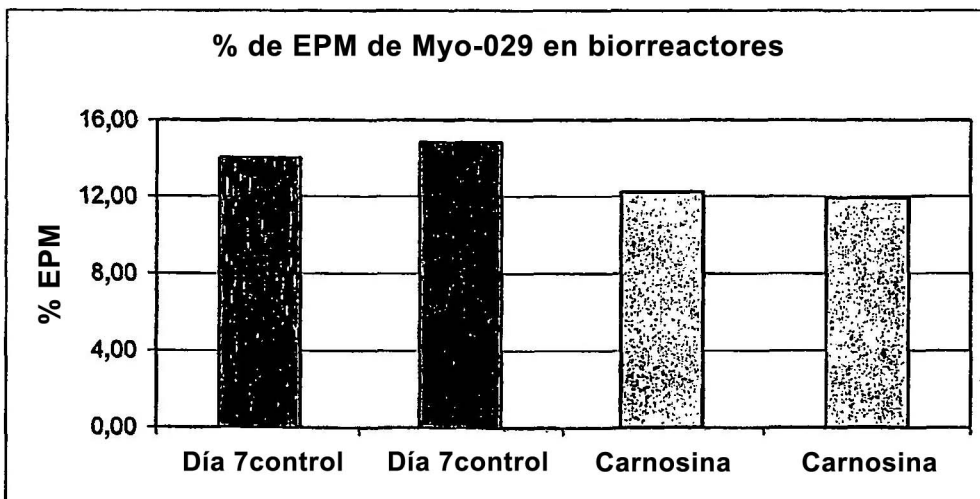
1. Un procedimiento de producción de una proteína en un cultivo celular que comprende las etapas de:
 

Cultivar células de mamífero transformadas con un gen que codifica una proteína de interés, el cual gen se expresa en condiciones de cultivo celular, en un medio de cultivo celular que comprende un compuesto anti senescencia seleccionado de entre carnosina, acetil-carnosina, homocarnosina, anserina, y  $\beta$ -alanina; en el que el compuesto anti senescencia se encuentra a una concentración de entre aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, y mantener el cultivo en condiciones y durante un tiempo suficiente 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 podría observarse en condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carece del compuesto anti senescencia; en el que la característica de cultivo mejorada se selecciona del grupo que consiste en: título aumentado, productividad celular específica aumentada, acumulación de agregados de elevado peso molecular disminuida y acumulación de especies ácidas disminuida, y combinaciones de los mismos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto anti senescencia es carnosina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha célula de mamífero es una célula CHO.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha proteína de interés es un anticuerpo.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un isótopo de IgG.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano recombinante.
7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es específicamente reactivo con el factor de diferenciación del crecimiento 8 (GDF-8) o un epítipo del mismo.
8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo recombinante se une específicamente a BMP-11.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto anti senescencia se encuentra a una concentración de entre aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto anti senescencia está en una concentración de aproximadamente 20 mM.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto anti senescencia se añade en combinación con un medio de alimentación.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se mantiene dicha viabilidad celular en el momento de la recolección.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se aumenta la producción de dicha proteína de interés.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se aumenta la productividad específica de la célula de dicha proteína de interés.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la calidad de dicha proteína de interés se aumenta mediante una disminución de los agregados de elevado peso molecular.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la calidad de dicha proteína de interés se aumenta mediante una disminución en las especies ácidas.

**Figura 1a. Efecto de Carnosina sobre picos ácidos para MYO-29**

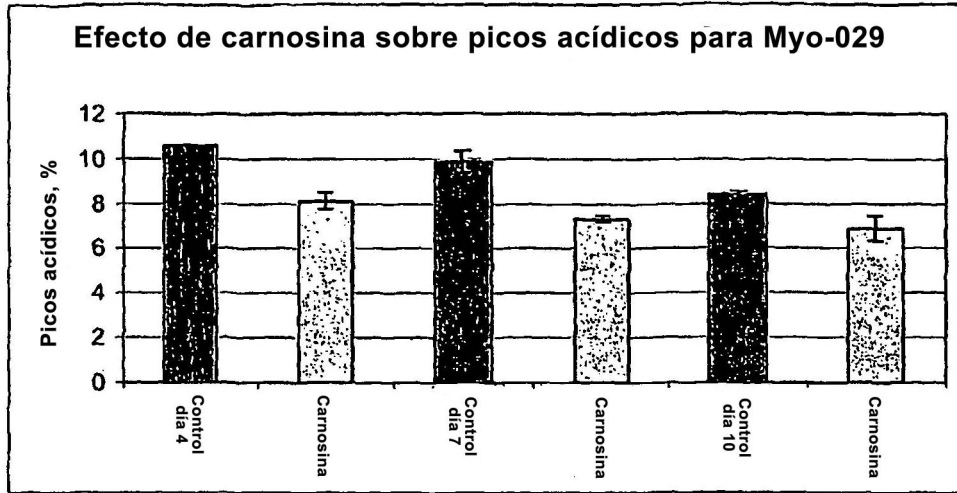


**Figura 1b. Efecto de Carnosina sobre agregados de elevado peso molecular**

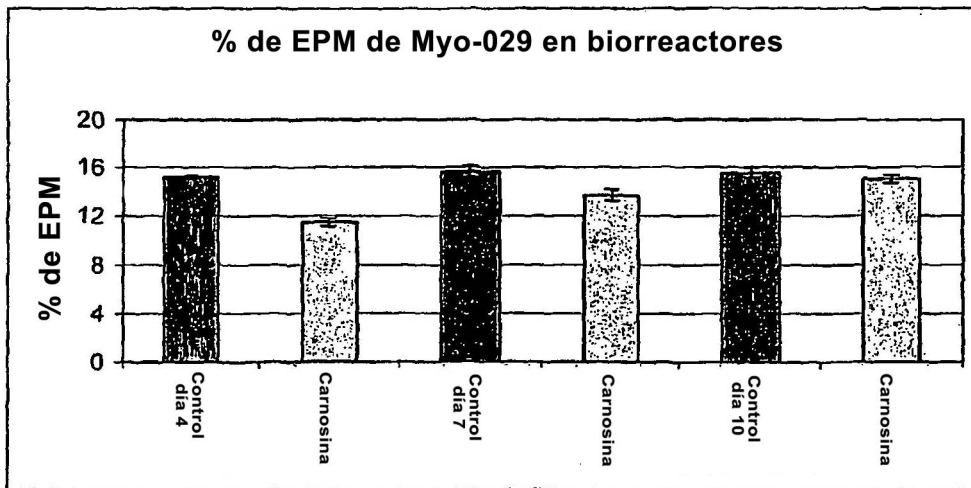




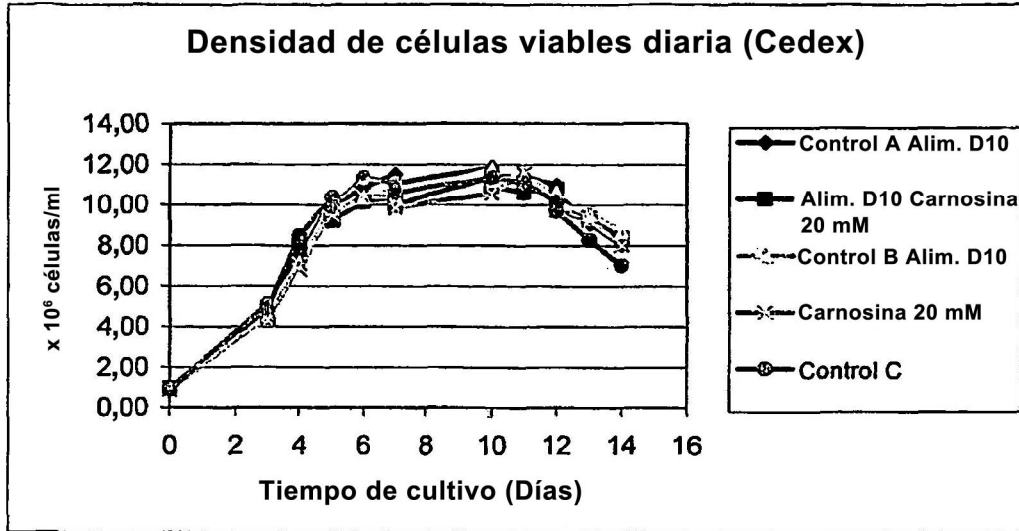
**Figura 1c. Efecto de adiciones de carnosina en diferentes días sobre picos ácidos**



**Figura 1d. Efecto de adiciones de Carnosina en diferentes días sobre agregados de elevado peso molecular**



**Figura 2a. Efecto de Carnosina sobre la densidad de células viables diaria**



**Figura 2b. Efecto de Carnosina sobre la viabilidad celular diaria**

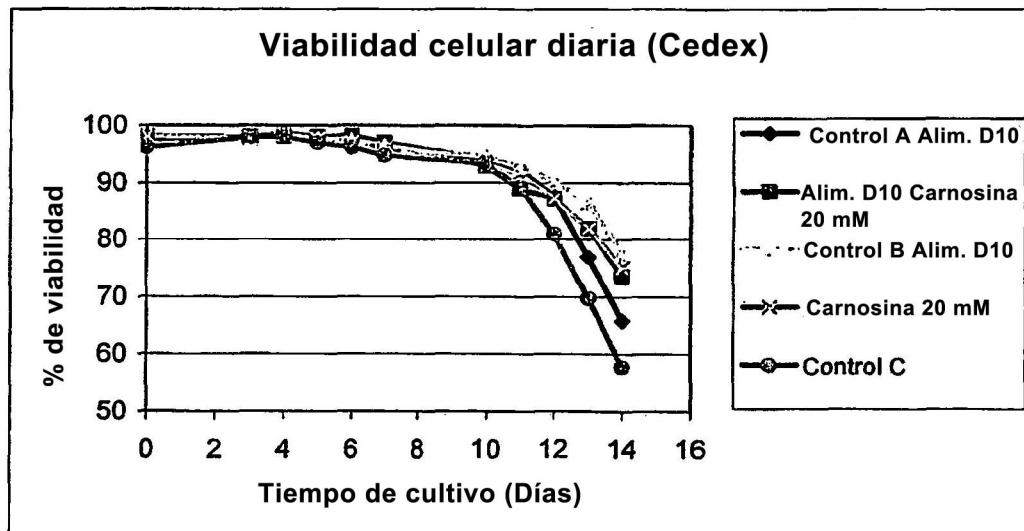


Figura 2c. Efecto de Carnosina sobre el título diario

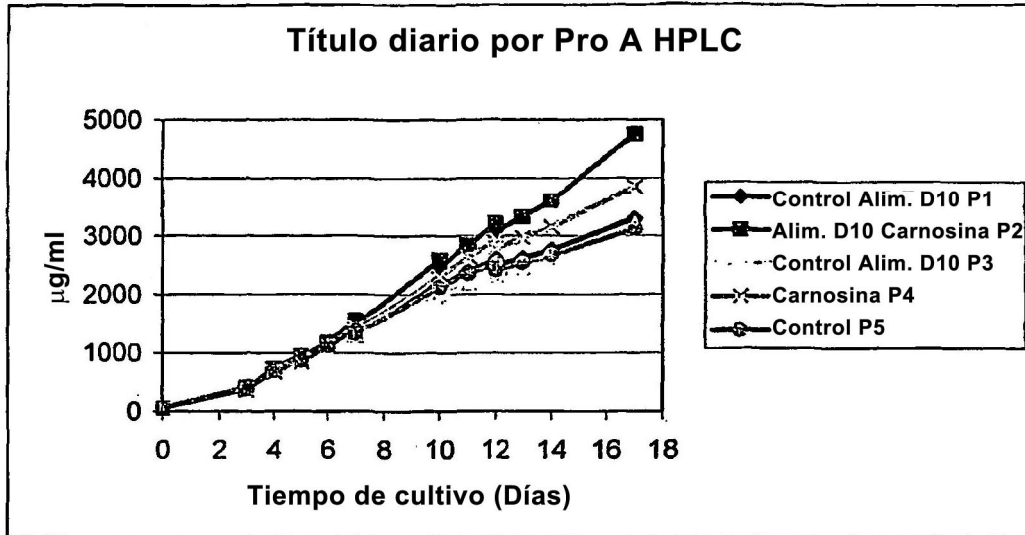
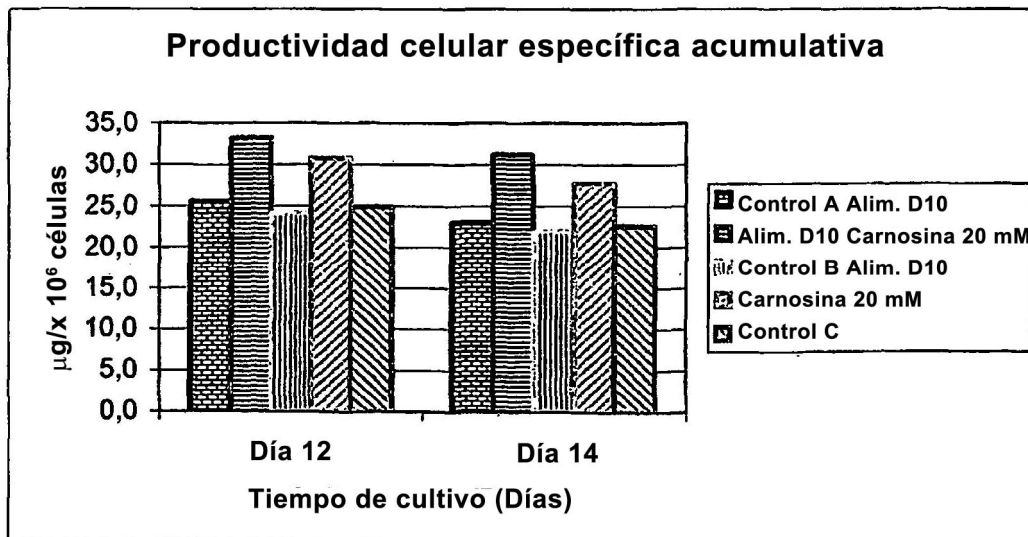
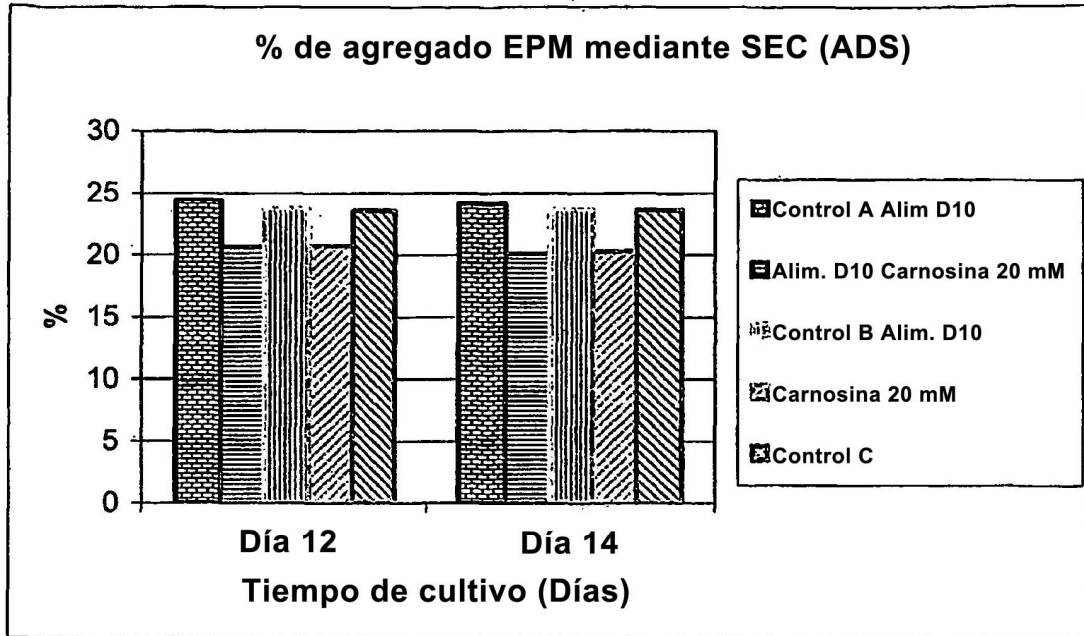


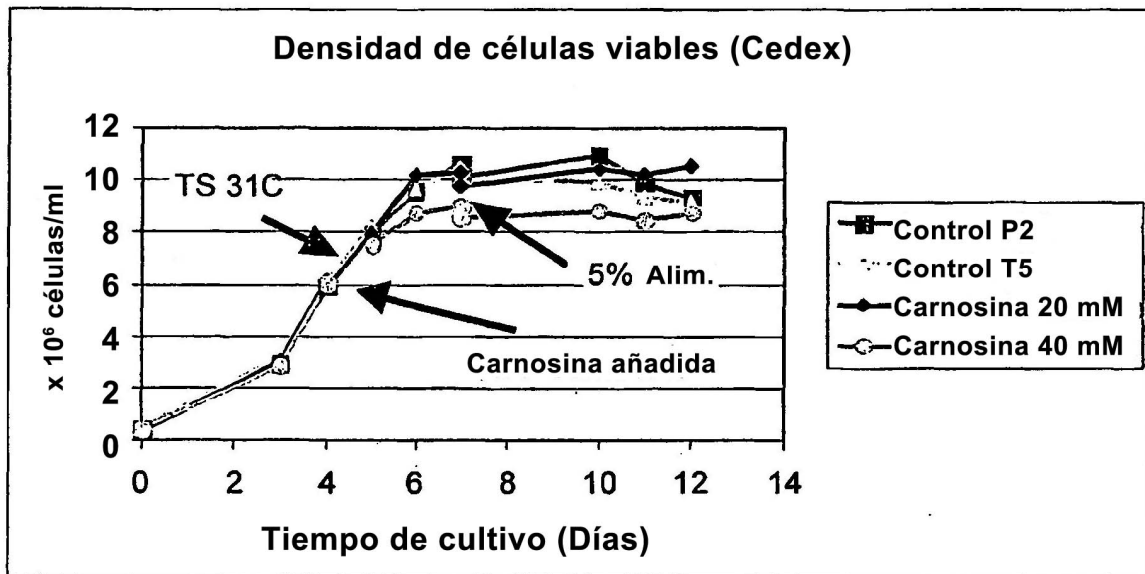
Figura 2d. Efecto de Carnosina sobre la productividad celular específica acumulativa



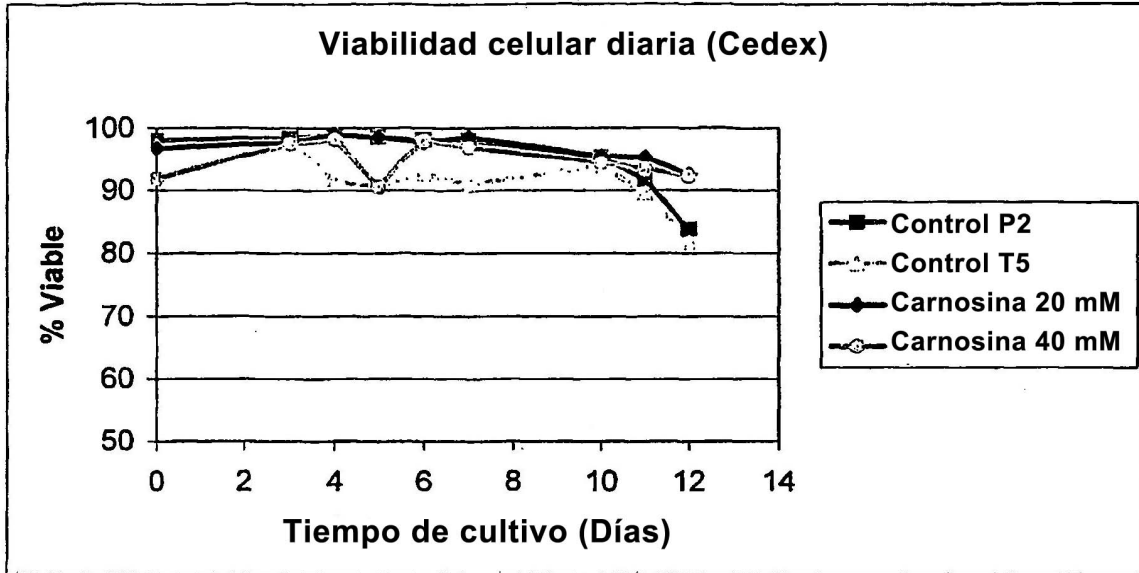
**Figura 2e. Efecto de Carnosina sobre agregados de elevado peso molecular**



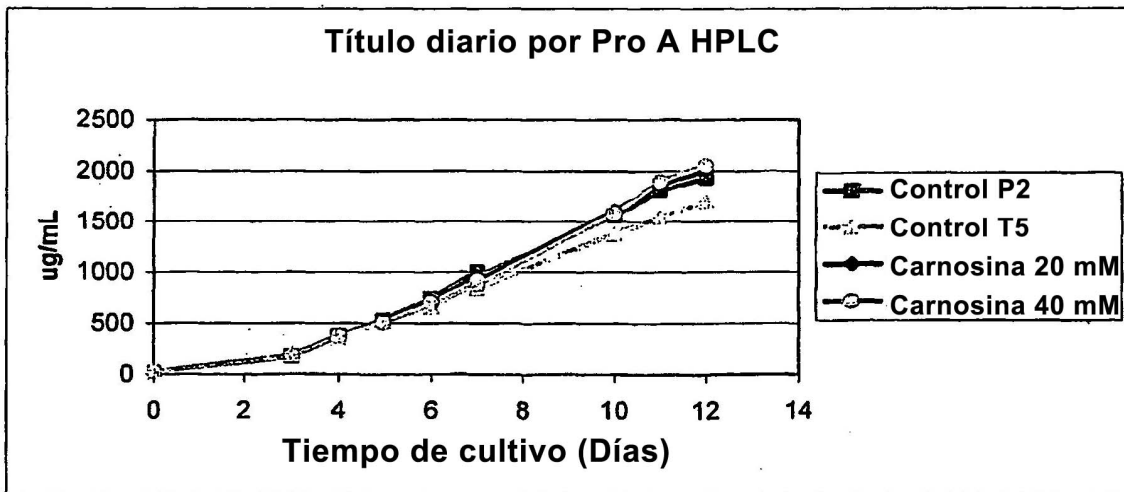
**Figura 3a. Efecto de diferentes concentraciones de Carnosina sobre densidad de células viables**



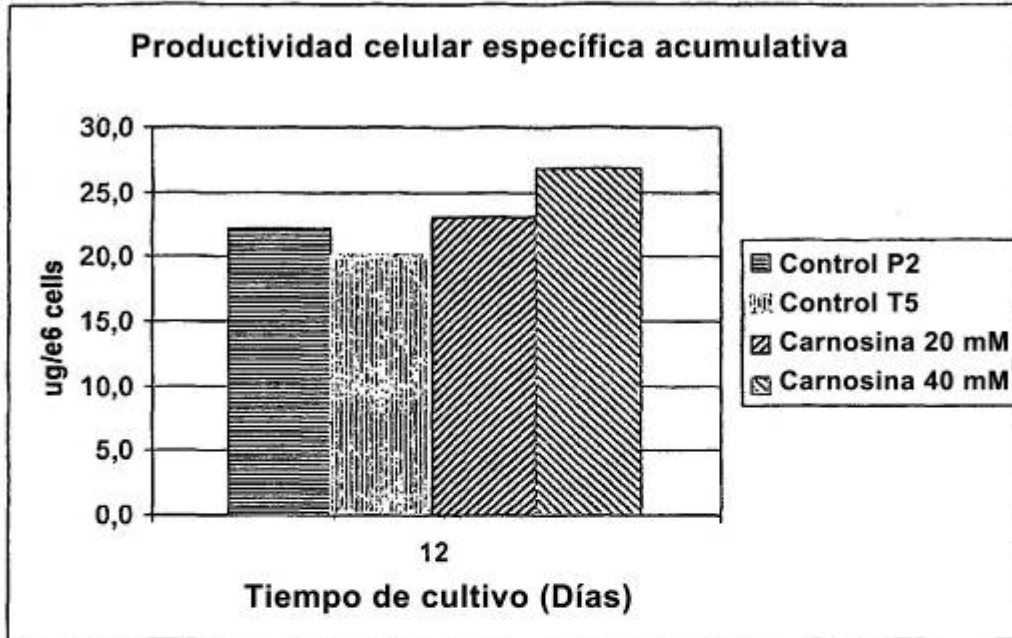
**Figura 3b. Efecto de diferentes concentraciones de Carnosina sobre la viabilidad celular diaria**



**Figura 3c. Efecto de diferentes concentraciones de Carnosina sobre el título diario**



**Figura 3d. Efecto de diferentes concentraciones de Carnosina sobre la productividad celular específica acumulativa**



**Figura 3e. Efecto de diferentes concentraciones de Carnosina sobre agregados de elevado peso molecular**

