

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 246**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10740787 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2454373**

54 Título: **Potenciación de la producción a través de transducción mecánica**

30 Prioridad:

**15.07.2009 US 225694 P**

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

**05.02.2015**

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)  
1 North Waukegan Road  
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**PIPARIA, REEMA y  
CORREIA, IVAN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 528 246 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**

Potenciación de la producción a través de transducción mecánica

**5 Antecedentes de la invención**

Las células de ovario de hámster chino (CHO) son la línea celular huésped de mamífero de uso más habitual para producir proteínas recombinantes en la industria biofarmacéutica. Los procesos de cultivo celular con células de mamífero, incluidas las células CHO, para producir bioterapéuticas se enfrentan con diversos retos, incluidas las comprimidas líneas de tiempo para el desarrollo del producto, escaseces y limitaciones de la proliferación y productividad de las líneas celulares.

La presente invención aborda estos aspectos aplicando un modelo de tenseguridad a las células de mamífero, tales como células CHO. Aplicando fuerzas de tenseguridad a estas células se puede aumentar el nivel de anticuerpo recombinante producido por las células.

**Sumario de la invención**

La presente invención está dirigida a métodos para aumentar la producción de un anticuerpo de interés de una célula huésped, que comprende someter dicha célula a una fuerza de tenseguridad, donde la fuerza de tenseguridad se aplica a la célula en una cantidad eficaz para aumentar la producción de dicho anticuerpo por la célula. Los métodos de la invención están dirigidos a aumentar la producción de un anticuerpo diana de células y/o cultivos celulares. Las fuerzas de tenseguridad puede ser una tensión que se aplica a las células y puede incluir uno o más de los siguientes: tensión mecánica, tensión de cizalladura, efectos de estiramiento y tensión inducida por presión, por ejemplo, presión inducida por ondas de sonido. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es una IgG. En determinadas realizaciones, las células son células de ovario de hámster chino (CHO).

En determinadas realizaciones, las células están flotando en libertad en un cultivo. En realizaciones alternativas, las células son células adherentes capaces de adherirse a un sustrato.

En determinadas realizaciones, la presente invención está dirigida a métodos de aumentar la producción de un anticuerpo recombinante de las células de un cultivo celular aplicando una tensión a las células. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es una IgG. En determinadas realizaciones, las células son células de ovario de hámster chino (CHO).

En determinadas realizaciones de la presente invención, las células sometidas a tensión están cultivadas en un biorreactor comercial.

Un método de la presente invención implica someter a las células que expresan un anticuerpo de interés a una tensión de cizalladura mecánica controlada. En determinadas realizaciones, la tensión por cizalladura (par) se puede aplicar a la superficie de una célula usando perlas ferromagnéticas unidas a membrana recubiertas con anticuerpos que se pueden adherir al citoesqueleto de las células. Las perlas se pueden magnetizar en una dirección aplicando un campo magnético de torsión más débil.

Métodos alternativas de la presente invención implican someter a las células que expresan un anticuerpo de interés a un sistema de cultivo biomecánico capaz de someter a las células adherentes a diversas condiciones de cultivo en tensión biaxial/deformación. En determinadas realizaciones, el sistema de cultivo biomecánico es microscopia de tracción. En determinadas realizaciones, el sistema de cultivo biomecánico permite la obtención de imágenes microscópicas vivas de las células.

En determinadas realizaciones, se puede medir la viabilidad de las células sometidas a tensión. Ejemplos no limitantes de dichos ensayos de viabilidad celular incluyen, entre otros, ensayos de captación de pigmentos (p. ej., ensayos con calceína AM), ensatos de viabilidad celular XTT y ensayos de exclusión de pigmentos (p. ej., ensayos de exclusión de pigmentos con azul tripán, eosina o propidio).

En determinadas realizaciones, se puede analizar la cantidad de anticuerpo secretado por las células sometidas a tensión. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es una IgG que e libera al medio que forma el microambiente de las células.

En determinadas realizaciones, se puede analizar el comportamiento de las células sometidas a tensión. Dicho comportamiento celular incluye, entre otros, la migración y la morfología celular. En determinadas realizaciones se pueden usar técnicas microscópicas, tales como, entre otras, microscopia electrónica de barrido, microscopia de contraste de fases y/o microscopia electrónica de transmisión, con el fin de evaluar los cambios en el comportamiento de las células con el tiempo.

65

**Breve descripción de las figuras**

**Figura 1** Diagrama de flujo que describe la secuencia de procedimientos experimentales para estudiar el modelo de tensegridad en las células CHO.

5

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención está dirigida a métodos de aumentar la producción de anticuerpos a través de la aplicación de fuerzas de tensegridad en células y cultivos celulares. Las fuerzas de tensegridad puede ser una tensión que se aplica a las células y puede incluir uno o más de los siguientes: tensión mecánica, tensión de cizalladura, efectos de estiramiento y tensión inducida por presión, por ejemplo, tensión inducida por ultrasonidos.

10

Por claridad y no a modo de limitación, esta descripción detallada se divide en las siguientes subsecciones:

15

1. Métodos de aplicación de fuerzas de tensegridad;
2. Modulación de la producción de proteínas diana a través de la aplicación de fuerzas de tensegridad; y
3. Producción a gran escala incorporando optimización de la fuerza de tensegridad.

20

**1. Métodos de aplicación de fuerzas de tensegridad**

La presente invención está dirigida a métodos de aumentar la producción de anticuerpos a través de la aplicación de fuerzas de tensegridad en células y cultivos celulares. En el modelo de tensegridad celular, las fuerzas de tensión son portadas por los microfilamentos del citoesqueleto y los filamentos intermedios y éstas fuerzas se equilibran mediante elementos estructurales interconectados que resisten a la compresión, muy probablemente, adhesiones de hileras de microtúbulos y de la matriz extracelular (MEC). (Véase, por ejemplo, D.E., Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997. 59: pág. 575-99; Ingber, D.E., Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*, 2003. 116 (Pt 8): pág. 1397-408; Ingber, D.E., Tensegrity I. *Cell structure and hierarchical systems biology. J Cell Sci*. 2003 Apr 1; 116 (Pt 7): 1157-73; y Wang, N., J.D. Tytell, y D. Ingber, Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with nucleus. *Molecular cell biology*, January 2009. 10: pág. 75-82). Dichas fuerzas de tensegridad pueden incluir fuerzas de tensión, por ejemplo tensión mecánica dirigida a las células diana o a los cultivos celulares.

25

30

35

En determinadas realizaciones, las fuerzas de tensegridad se reciben y la señal se transluce al interior de una célula mediante un equilibrio de fuerzas complementarias entre microfilamentos tensados, microtúbulos comprimidos y receptores de integrina transmembrana en las células vivas. Cuando la fuerza se aplica a las integrinas, los parámetros termodinámicos y cinéticos pueden cambiar localmente para las moléculas asociadas al citoesqueleto que experimentan físicamente la carga mecánica. Cuando se aplica fuerza a receptores de no adhesión que no se unen al citoesqueleto, la tensión se disipa localmente en la superficie celular y se silencia la respuesta bioquímica. En un ejemplo no limitante, cuando se aplica tensión a las integrinas se añaden nuevos monómeros de tubulina al extremo de un microtúbulo y el microtúbulo se descomprime como resultado de un cambio en la concentración crítica de tubulina. En determinadas realizaciones, las moléculas que están físicamente distorsionadas por la tensión transferida desde las integrinas al citoesqueleto pueden cambiar su cinética, por ejemplo aumentando su constante de velocidad para la conversión química de un sustrato en un producto. De este modo, tanto la estructura del citoesqueleto (arquitectura) como el preesfuerzo (tensión) en el citoesqueleto pueden modular la respuesta celular a la tensión mecánica.

40

45

50

En determinadas realizaciones, la aplicación de la fuerza a través del citoesqueleto se puede transducir a los poros nucleares de una célula y el estiramiento del poro, abriendo los cestillos y otros componentes del complejo del poro nuclear interno, altera la cinética de la abertura del poro o modula su composición molecular de modo que se aumenta el transporte nuclear. Dicho efecto puede incluir sobre el control postranscripcional de la expresión génica.

55

En determinadas realizaciones, la fuerza de tensegridad puede ser una tensión de cizalladura mecánica controlada. En determinadas realizaciones, la tensión de cizalladura se puede aplicar directamente a la superficie celular. La tensión de cizalladura (par) se puede aplicar a la superficie usando perlas magnéticas unidas a la membrana, por ejemplo perlas ferromagnéticas, recubiertas con anticuerpos que se adhieren al citoesqueleto de la célula. Las perlas se pueden magnetizar en una dirección aplicando un campo magnético de torsión. Se pueden tomar imágenes de microscopía electrónica para mostrar cómo las perlas ferromagnéticas se unen a la superficie de las células.

60

La tensión de cizalladura se aplica a las células en una cantidad eficaz para aumentar el nivel de producción de anticuerpos de las células.

65

En determinadas realizaciones, las perlas ferromagnéticas tienen un diámetro de entre 0,25 y 0,5  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 0,5 y 0,75  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 0,75 y 1  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre

aproximadamente 1 y 2  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 2 y 3  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 3 y 4  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 4 y 5  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 5 y 6  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 6 y 7  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 7 y 8  $\mu\text{m}$ , un diámetro de entre aproximadamente 8 y 9  $\mu\text{m}$  o un diámetro de entre aproximadamente 9 y 10  $\mu\text{m}$ . En determinadas realizaciones, las perlas ferromagnéticas tienen un diámetro de entre aproximadamente 1 y 6  $\mu\text{m}$ .

En determinadas realizaciones, las células son células CHO y las perlas ferromagnéticas se recubren con anticuerpos anti-CHO.

La deformación celular que se produce en respuesta a la aplicación de tensión se puede determinar usando citometría de torsión magnética (MTC), que es una técnica usada para ejercer tensiones mecánicas sobre las células vivas imantando primero y rotando después las perlas ferromagnéticas que están unidas a la superficie de las células. En determinadas realizaciones, el dispositivo para MTC puede consistir en siete componentes principales: (i) un generador de alto voltaje para proporcionar la corriente para imantar las perlas; (ii) una fuente de corriente bipolar [para MTC unidimensional (1D)] para la torsión de las perlas; (iii) un ordenador para controlar el aparato de torsión; (iv) un microscopio invertido para observar la muestra; (v) una cámara dispositivo de carga acoplada (CCD) que usa software capaz de sincronizar la captura de imágenes con función de paso o campos magnéticos de onda oscilatoria; (vi) un dispositivo para mantener la temperatura correcta de las células cultivadas; y (vii) una inserción en el microscopio que sujeta la muestra y contiene dos pares de bobinas para MTC 1D que generan los campos eléctricos alternos usados para imantar y torsionar las perlas.

En determinadas realizaciones, la fuerza de tensegridad puede generarse mediante un sistema de cultivo biomecánico capaz de someter las células a diversas tensiones/fuerzas biaxiales. En un ejemplo no limitante, el sistema de cultivo biomecánico puede ser microscopía de tracción. Por ejemplo, las células se pueden unir a un sustrato, por ejemplo, entre otros, silicona, hidrogel, poli(acrilamida), laminina o elastina. El sustrato puede estar recubierto además con colágeno. Las microperlas, por ejemplo, microperlas fluorescentes, se pueden incluir cerca de la superficie apical del sustrato para trazar la dinámica de la red del citoesqueleto bajo el microscopio. En determinadas realizaciones, las microperlas tienen un diámetro de al menos 0,001  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,005  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,01  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,05  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,1  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,15  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,2  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,25  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,3  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,35  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,4  $\mu\text{m}$ , un diámetro de al menos 0,45  $\mu\text{m}$  o un diámetro de al menos 0,5  $\mu\text{m}$ . En determinadas realizaciones, los microtúbulos tienen un diámetro de 0,2  $\mu\text{m}$ .

La rigidez y la elongación son dos variables que se pueden controlar en el sistema. Por ejemplo, la rigidez se puede controlar ajustando la concentración del sustrato, por ejemplo un sustrato de hidrogel, y las fuerzas de elongación se pueden controlar con la magnitud de las fuerzas aplicadas al sustrato. El sustrato se puede estirar a lo largo de un eje. Por ejemplo, el sustrato se puede estirar simétricamente a lo largo de dos ejes ortogonales usando motores a pasos controlado por ordenador. La elongación y la rigidez se aplican a las células en una cantidad eficaz para aumentar el nivel de producción de anticuerpos de las células.

En determinadas realizaciones, las células se cultivan sobre sustrato en una placa de cultivo celular, por ejemplo una placa de cultivo celular de múltiples pocillos.

En determinadas realizaciones, las fuerzas de tensegridad se pueden generar aplicando presión acústica a las células o al cultivo celular, por ejemplo ondas de ultrasonidos, o cualquier otra onda de sonido de alta o baja frecuencia, que opcionalmente se pueden proporcionar de un modo cíclico. Dicha presión acústica puede cambiar las propiedades de las células. Por ejemplo, a frecuencias de sonido bajas, las células CHO sometidas a tensión de sonido cíclica pueden alterar su expresión y/o ruta secretora y aumentar los niveles de producción de anticuerpos. En determinadas realizaciones, la presión acústica cíclica se aplica a las células en una cantidad eficaz para aumentar el nivel de producción de anticuerpos de las células.

En determinadas realizaciones, se pueden monitorizar la viabilidad y la morfología de las células sometidas a fuerzas de tensegridad. La viabilidad celular se puede determinar usando pigmentos que pueden atravesar las membranas de las células. Por ejemplo, para monitorizar la viabilidad celular se pueden usar marcadores celulares fluorescentes permeables a la membrana, como calceína AM, un marcador celular fluorescente verde. La calceína AM es permeable a la membrana y se puede introducir en las células mediante incubación. Una vez en el interior de las células, la calceína AM se hidroliza a través de la esterasa endógena en calceína fluorescente verde muy cargada negativamente. La calceína fluorescente es retenida por el citoplasma en las células vivas.

También se pueden usar pruebas de exclusión de pigmentos para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular o en un cultivo celular. Las células vivas poseen membranas de células intactas que excluyen determinados pigmentos, por ejemplo, azul tripán, eosina y propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. En una prueba de exclusión de pigmentos, una suspensión o cultivo celular se pueden mezclar con pigmentos y examinar visualmente para determinar si las células captan o excluyen el

pigmento. Las células se pueden contar usando, por ejemplo, un hemocitómetro montado sobre un microscopio óptico invertido. Las células viables tienen un citoplasma transparente, mientras que una célula no viable tiene un citoplasma marcado por el pigmento.

- 5 En determinadas realizaciones, la viabilidad celular se puede determinar midiendo la actividad de las enzimas en las células vivas. También se pueden usar métodos de determinar la viabilidad celular para determinar la velocidad de la proliferación celular. Por ejemplo, la actividad de las enzimas mitocondriales, que se inactivan poco después de la muerte celular, se puede medir para determinar la viabilidad celular. En determinadas realizaciones, la actividad de las enzimas mitocondriales se puede medir con un kit de ensayo de viabilidad celular XTT. XTT es un derivado de tetrazolio. Las enzimas mitocondriales en las células vivas reducen el XTT en un producto coloreado naranja muy hidrosoluble. La cantidad de producto hidrosoluble generado a partir de XTT es proporcional al número de células vivas en una muestra y se puede cuantificar midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 475 nm.

- 15 La migración y la morfología celulares son las consecuencias de los cambios en la organización y dinámica subyacentes del citoesqueleto. La migración y la morfología de las células sometidas a las fuerzas de tenseguridad se pueden monitorizar usando técnicas microscópicas para evaluar los cambios en la migración y la morfología de las células en el tiempo. Dichas técnicas microscópicas incluyen, entre otros, microscopia electrónica de barrida, microscopia de contraste de fases y microscopia electrónica de transmisión.

- 20 En determinadas realizaciones, el nivel de anticuerpos secretados por las células o el cultivo celular sometido a las fuerzas de tenseguridad se puede medir para determinar los incrementos de la producción de anticuerpos. En concreto, se puede medir el nivel de anticuerpos secretados por las células en su microambiente. La cantidad de anticuerpos secretados se puede determinar, por ejemplo, poniendo en contacto una solución que contenía los anticuerpos frente a una sustancia de unión a anticuerpos unida a la superficie de un sustrato. Se puede cuantificar la cantidad de anticuerpos unidos. Por ejemplo, los anticuerpos IgG secretados se pueden medir poniendo en contacto el anticuerpo con un ligando de proteína A unido covalentemente a la superficie de una resina polimérica macroporosa. Las células se pueden centrifugar y el sobrenadante recogido se puede inyectar en una columna con proteína A, de modo que se captura la IgG en la muestra. Después, la IgG unida se puede eluir disminuyendo el pH y detectando el material eluido directamente a 280 nm.

- 30 En determinadas realizaciones, una vez obtenida una solución o mezcla que comprende un anticuerpo, la separación del anticuerpo de las otras proteínas producidas por la célula se puede realizar usando una combinación de diferentes técnicas de purificación, incluyendo etapa(s) de separación por intercambio iónico y etapa(s) de separación por interacción hidrofóbica. Las etapas de separación separan las mezclas de proteínas en base a su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. En determinadas realizaciones, la separación se realiza usando cromatografía, incluyendo interacciones catiónicas, aniónicas e hidrofóbicas. Se dispone de varias resinas de cromatografía diferentes para cada una de estas técnicas, lo que permite un ajuste preciso del esquema de purificación a la proteína concreta implicada. La esencia de cada uno de los métodos de separación es que las proteínas se puede deber a atravesar a diferentes velocidades hacia abajo de una columna, lo que consigue una separación física que se incrementa a medida que pasa por la columna hacia abajo o a adherirse de forma selectiva al medio de separación, eluyéndose diferencialmente mediante diferentes disolventes. En algunos casos, el anticuerpo se separa de las impurezas cuando las impurezas se adhieren específicamente a la columna y el anticuerpo no lo hace, es decir, el anticuerpo está presente en el flujo continuo.

- 45 En determinadas realizaciones, las etapas de separación se usan para separar un anticuerpo de una o más proteínas de células huésped. En determinadas realizaciones, las estrategias de purificación excluyen el uso de cromatografía de afinidad de proteína A, por ejemplo purificación de anticuerpos IgG<sub>3</sub>, ya que los anticuerpos IgG<sub>3</sub> se unen a la proteína A de forma ineficiente. Otros factores que permiten el ajuste específico de un esquema de purificación incluyen, entre otros: La presencia o ausencia de una región Fc (p. ej., en el contexto del anticuerpo de longitud completa en comparación con un fragmento Fab del mismo) porque la proteína A se une a la región Fc; las secuencias de las líneas germinales concretas usadas en la generación del anticuerpo de interés; y la composición de aminoácidos del anticuerpo (p. ej., la secuencia primaria del anticuerpo, así como la carga global/hidrofobicidad de la molécula). Los anticuerpos que comparten una o más características se pueden purificar usando estrategias de purificación adaptadas para aprovechar dicha característica.

## 55 **2. Modulación de la producción de anticuerpos diana a través de la aplicación de fuerzas de tenseguridad**

- 60 En los métodos de la invención, la proteína diana es un anticuerpo. Aplicando fuerzas de tenseguridad a las células o cultivo celular se aumenta la producción del anticuerpo diana, por ejemplo un anticuerpo expresado recombinantemente, por las células o el cultivo celular.

El término "anticuerpo" como se usa en esta sección hace referencia a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 65 En determinadas realizaciones, las células y el cultivo celular expresan y secretan el anticuerpo ABT-874.

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) de la presente divulgación se pueden generar mediante varias técnicas, incluida la inmunización de un animal con el antígeno de interés, seguido de metodologías de anticuerpo monoclonal convencional, por ejemplo la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden usar otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema de animales preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión se conocen en la técnica. Las parejas de fusión (p. ej., células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también se conocen.

Preferentemente, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación se pueden preparar en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas se puede obtener a partir del hibridoma no humano de interés y modificar para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murina (p. ej., humana) usando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567 de Cabilly y col.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de CDR murinas se pueden insertar en una estructura humana usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.225.539 de Winter, y las patentes de EE.UU. N° 5.530.101; 5.58.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen y col.).

Para expresar un anticuerpo de la presente divulgación, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o parcial se insertan en uno o más vectores de expresión de modo que los genes estén unidos de forma operativa a las secuencias de control de la transcripción y de la traducción. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.914.128.).

En este contexto, la expresión "unido de forma operativa" quiere decir que un gen del anticuerpo está ligado en un vector tal que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven a la función prevista de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se escogen de modo que sean compatibles con la célula huésped usada para la expresión, por ejemplo células CHO. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en un vector distinto o, más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en un vector de expresión mediante procedimientos estándar (p. ej., ligando sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y en el vector, o ligando los extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Antes de la inserción del anticuerpo o las secuencias de las cadenas ligera o pesada relacionadas con el anticuerpo, el vector de expresión puede portar ya las secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un abordaje a la conversión de un anticuerpo o secuencias de VH y VL relacionadas con el anticuerpo en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera, respectivamente, de forma que el segmento VH esté unido operativamente al o los segmentos CH dentro del vector y el segmento VL esté unido operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente, o como alternativa, el vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la producción de la cadena del anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido señal esté unido dentro del marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulínica).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, un vector de expresión recombinante puede portar una o más secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. Con la expresión "secuencia reguladora" se pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990): Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión proteica en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el potenciador/promotor del CMV), virus 40 de simios (SV40) (tal como el potenciador/promotor del SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)), y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y de sus secuencias, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.168.062 de Stinski, la patente de EE.UU. N° 4.510.245 de Bell y col. y la patente de EE.UU. N° 4.968.615 de Schaffner y col.

Además de los genes de la cadena del anticuerpo y de las secuencias reguladoras, un vector de expresión recombinante puede portar una o más secuencias adicionales, tales como una secuencia que regula la replicación del vector en las células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y/o un gen marcador seleccionable. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel y col.).

Por ejemplo, normalmente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula huésped donde el vector se ha introducido. Entre los genes marcadores seleccionables adecuados se incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped dhfr- con selección con metotrexato/amplificación) y el gen neo (para la selección de G418).

Un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la presente divulgación se puede preparar mediante expresión recombinante de los genes de la cadena ligera y la cadena pesada de la inmunoglobulina en una célula huésped, una célula CHO. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinante que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina del anticuerpo, de forma que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula huésped y se secretan al medio donde se cultivan las células huésped, medio del cual se pueden recuperar los anticuerpos. Las metodologías de ADN recombinante estándar se usan para obtener genes de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, para incorporar estos ácidos nucleicos en vectores de expresión recombinantes y para introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. y col., (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en las patentes de EE.UU. N° 4.816.397 y 6.914.128.

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el(los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada se transfecta(n) una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" están destinadas a abarcar una amplia variedad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionota o eucariota, por ejemplo electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección en DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos en células huésped tanto procarionotas como eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, tales como células huésped de mamífero, es adecuada porque es más probable que dichas células eucariotas, y en particular las células de mamífero, se ensamblen y secreten un anticuerpo inmunológicamente activo y adecuadamente plegado. Se ha notificado que la expresión procarionota de los genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Entre las células huésped adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento son células procarionotas, de levaduras o eucarióticas superiores. Procarionotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo enterobacterias, tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41P divulgado en DD 266,710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* adecuado es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

Además de procarionotas, microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores de codificación de polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común del panadero, es la más usada de entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. No obstante, habitualmente se dispone de una serie de otros géneros, especies y cepas y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivas, tales como *Spodoptera frugiperda* (caterpillar), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Diversas cepas virales para transfección están disponibles públicamente, por ejemplo la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden usar como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden usar cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco como huéspedes.

Células huésped de mamífero adecuadas para expresar anticuerpos recombinantes incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células CHO dhfr- descritas en Urlaub y Chasin, (1980) PNAS USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621),

5 células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la producción del anticuerpo en el medio de cultivo donde crecen las células huésped. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por COS-7, ATCC CRL 1651; línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecer en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino /-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); hepatocitos de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); hepatocitos humanos (Hep G2, HB 8065); tumor mamario 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 línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según lo adecuado para inducir promotores, seleccionando transformantes o amplificando los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo se pueden cultivar en diversos medios. Los medios disponibles comercialmente, tal como medio F10™ de Ham (Sigma), medio mínimo esencial (Minimal Essential Medium™ (MEM)), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium™, (DMEM)), son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes de EE.UU. N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de EE.UU. N° 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped.

Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros actores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, cálcico, magnésico y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones adecuadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las usadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto habitual en la técnica.

Las células huésped también se pueden usar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que variaciones sobre el procedimiento anterior entran dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente divulgación. También se puede usar tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o todo el ADN que codifica una o las dos cadenas ligera y pesada que no es necesario para la unión a un antígeno diana. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncado también están abarcadas por los anticuerpos de la presente divulgación. Además, se pueden producir anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera proceden de un primer anticuerpo y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno diferente, mediante reticulación de un primer anticuerpo a un segundo anticuerpo mediante métodos de reticulación química estándar.

En un sistema adecuado para la expresión recombinante de un anticuerpo, o parte de unión a anticuerpo del mismo, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en las células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato cálcico. Dentro del vector de expresión recombinante, cada uno de los genes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están unidos operativamente a los elementos reguladores potenciadores del CMV/promotor de AdMLP para dirigir los niveles de transcripción altos de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo, se usan técnicas de biología molecular estándar.

Al usar las técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretarse directamente en el medio. En determinadas realizaciones, si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se pueden eliminar las partículas residuales, por ejemplo, las células huésped o las células lisadas (p. ej., resultantes de la homogeneización, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración). Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon™ o Millipore Pellicon™.

### 3. Producción a gran escala de anticuerpos incorporando optimización de la fuerza de tensegridad

En determinadas realizaciones, el modelo de tensegridad puede perfeccionarse de forma que se pueden aplicar las fuerzas de tensegridad a las células que producen anticuerpos comercialmente relevantes, por ejemplo, células cultivadas en biorreactores comerciales.

En determinadas realizaciones se puede aplicar tensión por cizalladura mecánica a las células cultivadas en un biorreactor. Por ejemplo, dicha tensión se puede aplicar a las células mediante agitación vorticial o mezclando las células a una velocidad eficaz para inducir tensión mecánica, por ejemplo estirando la membrana de las células. En determinadas realizaciones, dicha tensión mecánica es eficaz para aumentar la producción de anticuerpos a partir de las células en cultivo.

En determinadas realizaciones, las células cultivadas en un biorreactor se ponen en contacto con una perla magnética, por ejemplo una micropelleta ferromagnética como se ha descrito anteriormente, en las que se puede aplicar tensión de cizalladura (par) a la superficie usando perlas magnéticas unidas a la membrana en una cantidad eficaz para aumentar la producción de anticuerpos en las células.

En determinadas realizaciones se puede aplicar fuerza de tensegridad a las células cultivadas en un biorreactor mediante, por ejemplo, un sistema biomecánico capaz de someter las células a diversas tensiones/fuerzas biaxiales. Por ejemplo, el biorreactor puede comprender un sustrato para que se adhieran las células del cultivo. Dicho sustrato puede incluir una pluralidad de áreas de superficie a la que se adhieren las células. En determinadas realizaciones, el sustrato puede comprender un sustrato de tipo panal al que las células se adhieren. En determinadas realizaciones, el biorreactor incluye perlas u otros sustratos a los que las células se pueden adherir. En determinadas realizaciones, el sustrato se puede estirar o manipular a lo largo de uno o más ejes en una cantidad eficaz para cambiar la morfología o la forma de las células adheridas al sustrato. En determinadas realizaciones, la morfología o la forma de las células se alteran en una cantidad eficaz para aumentar la producción de anticuerpos de las células.

En determinadas realizaciones, las células cultivadas en un biorreactor se someten a fuerzas de tensegridad aplicando presión acústica cíclica a las células. Por ejemplo, se pueden aplicar ondas de ultrasonidos, o cualquier otra onda de sonido de alta o baja frecuencia, a las células en una cantidad eficaz para aumentar la producción de anticuerpos en las células. En determinadas realizaciones, las células están flotando en libertad.

En determinadas realizaciones, las fuerzas de tensegridad pueden producir cambios duraderos o permanentes en las propiedades de las células o cultivo celular, por ejemplo un incremento en la producción de anticuerpos por las células. Dichos cambios en las propiedades celulares se pueden deber a una modificación en la expresión génica. Por ejemplo, aunque no a modo de limitaciones, el estiramiento cíclico de las células CHO adherentes en cultivos en placas puede producir un incremento permanente en la expresión y/o secreción de anticuerpos por las células. Estas células con un incremento de la expresión y/o secreción de anticuerpos se pueden escalar en biorreactores en los que las células se cultivan en suspensión.

## 50 Ejemplos

### 1. Cultivo celular

Se usan células CHO productoras de anticuerpos glicosilados recombinantes (p. ej., ABT-874). Las células CHO en flotación productoras de ABT-874 están adaptadas para el crecimiento en suero. Las células se cultivan en placas de cultivo tisular en condiciones de crecimiento nominal usadas en el reactor de alimentación discontinua.

### 2. Creación de fuerzas de tensegridad en las células

Las células se introducen en el modelo de tensegridad usando dos técnicas diferentes descritas más adelante en las secciones 2.1 y 2.2. Los cambios de transducción mecánica inducidos por estas fuerzas se optimizan y evalúan usando ensayos basados en células.

## 2.1 Citometría por torsión magnética óptica

A varios puntos de tiempo las células se someten a una tensión por cizalladura mecánica controlada aplicada directamente a la superficie celular. La tensión de cizalladura (par) se aplica a la superficie usando perlas ferromagnéticas unidas a la membrana, (diámetro de 1-6  $\mu\text{m}$ ) recubiertas con anticuerpos anti-CHO que se adhieren al citoesqueleto de la célula. Las perlas se imantan en una dirección aplicando un campo magnético de torsión más débil. Se toman imágenes de microscopía electrónica para mostrar la unión de las perlas ferromagnéticas a la superficie de las células CHO.

La deformación celular resultado de la aplicación de la tensión se determina usando citometría de torsión magnética (MTC). La MTC es una técnica usada para ejercer fuerzas mecánicas sobre las células vivas imantando primero y después rotando las perlas ferromagnéticas que están unidas a la superficie de las células. El procedimiento experimental y los parámetros para aplicar el campo magnético son como se describe en el protocolo de Na. S y Wang. N (2008) *Science Signaling* 1(34): p11. En pocas palabras, el dispositivo para MTC consiste en siete componentes principales: (i) un generador de alto voltaje para proporcionar la corriente para imantar las perlas; (ii) una fuente de corriente bipolar [para MTC unidimensional (1D)] para la torsión de las perlas; (iii) un ordenador para controlar el aparato de torsión; (iv) un microscopio invertido para observar la muestra; (v) una cámara dispositivo de carga acoplada (CCD) que usa software capaz de sincronizar la captura de imágenes con función de paso o campos magnéticos de onda oscilatoria; (vi) un dispositivo para mantener la temperatura correcta de las células cultivadas; y (vii) una inserción en el microscopio que sujeta la muestra y contiene dos pares de bobinas para MTC 1D que generan los campos eléctricos alternos usados para imantar y torsionar las perlas (disponible comercialmente en Eberhard EOL Inc., Suiza). Na. S y Wang. N (2008) *Science Signaling* 1(34):p11.

## 2.2 Microscopía por tracción

La microscopía por tracción es un sistema de cultivo biomecánico capaz de someter células adherentes a diversas condiciones de cultivo en tensión/fuerza biaxial y analizar al tiempo que se permite la obtención de imágenes microscópicas in vivo. Las células se unen a un sustrato de hidrogel como poli(acrilamida), que además está recubierto con colágeno. Perlas micropérlas fluorescentes de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro se incluyen cerca de la superficie apical del gel para rastrear la dinámica de la red del citoesqueleto bajo el microscopio. An, S.S., y col., (2006) *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(1): pág. 55-64. La rigidez y el estiramiento son las dos variables controladas en el sistema. La rigidez se controla ajustando la concentración del sustrato hidrogel y las fuerzas de estiramiento están controladas por la magnitud de las fuerzas aplicadas. El hidrogel se estira simétricamente a lo largo de dos ejes ortogonales usando motores por pasos controlados por ordenador. Esta disposición permite controlar múltiples parámetros, incluida la magnitud de la tensión y la tasa de la tensión. Artmann, G.M. y S. Chien, (2008), *Bioengineering in cell and tissue research*. Springer.

El sustrato de hidrogel se estira a un intervalo de aproximadamente 20 segundos durante aproximadamente 30 minutos. Los cambios en la morfología se capturan mediante obtención de imágenes con fluorescencia. Las células se incuban después y los cambios debidos a la transducción mecánica se miden a varios puntos de tiempo mediante ensayos basados en células.

## 3. Análisis cuantitativo de la viabilidad celular

La calceína AM es un marcador celular fluorescente verde de uso extenso. La calceína AM es permeable a la membrana y se puede introducir en las células mediante incubación. Una vez en el interior de las células, la calceína AM (una molécula no fluorescente) se hidroliza a través de la esterasa endógena en calceína fluorescente verde muy cargada negativamente. La calceína fluorescente es retenida por el citoplasma en las células vivas. La calceína AM sirve como herramienta excelente para los estudios de la integridad de la membrana celular y para el trazado a largo plazo debido a su falta de toxicidad celular. Las células se cuantifican adicionalmente obteniendo imágenes de microscopía por fluorescencia usando un microscopio de contraste de fases.

## 4. Análisis cualitativa de la viabilidad celular

### 4.1 Ensayo XTT

El kit de ensayo de viabilidad celular XTT proporciona un sencillo método para la determinación del número de células vivas usando lectores estándar de absorbancia en microplacas. A menudo se usa la determinación del número de células vivas para evaluar la velocidad de proliferación celular y seleccionar agentes citotóxicos. XTT es un derivado de tetrazolio. Mide la viabilidad celular en base a la actividad de las enzimas mitocondriales en células vivas que reducen el XTT y se inactivan poco después de la muerte celular. Durante la incubación se reduce fácilmente a un producto de color naranja muy hidrosoluble. La cantidad de producto hidrosoluble generado a partir de XTT es proporcional al número de células vivas en la muestra y se cuantifica midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 475 nm.

#### 4.2 Prueba de la viabilidad celular mediante exclusión de azul tripán

La prueba de exclusión de pigmento se usa para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen determinados pigmentos, tal como azul tripán, eosina o propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. En esta prueba, una suspensión celular se mezcla con pigmento y después se examina visualmente para determinar si las células captan o excluyen el pigmento. Las células se recuentan usando un hemocitómetro montado sobre un microscopio óptico invertido. Las células viables se distinguen debido a su citoplasma transparente, mientras que las células no viables tienen un citoplasma de color azul.

#### 5. Producción de IgG

Las células usadas en el presente estudio secretan IgG. La IgG se libera directamente al medio que forma el microambiente de la célula. Applied Biosystems ImmunoDetection Sensor Cartridge es un dispositivo de ensayo para la medición de la mayoría de las subclases de IgG (inmunoglobulina G) de varias especies animales. Contiene un ligando de proteína A unido covalentemente a la superficie de una resina polimérica macroporosa. Las células se centrifugan y el sobrenadante recogido se inyecta en la columna de proteína A. La IgG en la muestra es capturada y concentrada en el cartucho sensor. La IgG unida se eluye del cartucho sensor disminuyendo el pH de la fase móvil y detectando el material eluido directamente a 280 nm. Este procedimiento se puede aplicar a la determinación de la concentración de IgG de interés en el cultivo de células de mamífero en base a las muestras de fermentación.

#### 6. Morfología celular

Las variaciones en la migración y la morfología celulares son las consecuencias de los cambios en la organización y dinámica subyacentes del citoesqueleto. Es útil entender los cambios en las estructuras celulares debido a la aplicación de fuerzas externas. El progreso de una célula por su ciclo de vida se basa en un continuo de acontecimientos celulares relacionados causalmente. Para evaluar los cambios en el comportamiento celular con el tiempo se usan técnicas microscópicas de última generación, como microscopia electrónica de barrido, microscopia de contraste de fases, microscopia electrónica de transmisión.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para aumentar la producción de un anticuerpo de interés de una célula huésped, que comprende someter dicha célula a una fuerza de tenseguridad, donde la fuerza de tenseguridad se aplica a la célula en una cantidad eficaz para aumentar la producción de dicho anticuerpo por la célula.
2. El método de la reivindicación 1, donde la fuerza de tenseguridad es una tensión de cizalladura mecánica.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, donde la célula se adhiere a un sustrato y la fuerza de tenseguridad es una tensión biaxial.
4. El método de la reivindicación 1, donde la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 15 5. El método de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es ABT-874.
6. El método de la reivindicación 1, donde la célula se subcultiva en un biorreactor.
7. El método de la reivindicación 7, donde la célula se adhiere a un sustrato.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, donde la fuerza de tenseguridad es una presión acústica cíclica.
9. El método de la reivindicación 8, donde la presión acústica cíclica es ultrasonido.
- 25 10. El método de la reivindicación 2, donde la célula se pone en contacto con una microperla ferromagnética y donde se aplica una fuerza magnética a la microperla ferromagnética.

**Figura 1.**

