

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 074**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2011 E 11717240 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2563904**

54 Título: **Medio de cultivo celular mejorado**

30 Prioridad:

26.04.2010 US 327836 P

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

07.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEIST, CHRISTIAN;
MEISSNER, PETRA y
SCHMIDT, JÖRG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 533 074 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

Medio de cultivo celular mejorado

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se relaciona con el campo general de la biotecnología, particularmente el cultivo de células y su uso para la producción de polipéptidos a escala industrial.

10 La presente invención proporciona medios de cultivo celular que son adecuados para el cultivo de células con una alta viabilidad celular, preferiblemente células de mamífero tales como células CHO, y que se caracterizan por su relación molar de iones sodio con respecto a los de potasio. Los medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención, permiten obtener altas productividades de polipéptidos, cuando se utilizan para la producción de un polipéptido, en particular mediante la expresión recombinante de polipéptidos en sistemas de cultivo de células de mamífero, en particular a escala industrial.

15 Antecedentes técnicos de la Invención

20 La preparación de polipéptidos utilizando la tecnología recombinante, ha desarrollado un procedimiento normalizado durante las últimas dos décadas. El acceso a polipéptidos recombinantes mediante la clonación de genes que codifican para el respectivo polipéptido, seguido por una transformación posterior de huéspedes de expresión adecuados con el gen por ser expresado y la producción final y purificación del producto polipeptídico recombinante obtenido, ha proporcionado acceso a toda una nueva clase de agentes terapéuticos biológicamente diseñados y producidos.

La industria farmacéutica prepara cada vez más compuestos farmacéuticamente activos utilizando la tecnología de ADN recombinante, seguida por procesos de producción desarrollados en el campo de la bioingeniería.

25 Tales productos biológicos incluyen anticuerpos monoclonales, que se han desarrollado como opciones importantes de tratamiento en varios campos médicos, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios, inmunosupresión, oncología y similares.

30 El desarrollo de tales agentes terapéuticos de origen biológico, requiere una producción a escala industrial, proporcionando de esta manera acceso a grandes cantidades del polipéptido recombinante. Los sistemas de expresión preferidos son cultivos de células de mamífero, que son superiores a la mayoría de los demás sistemas eucarióticos basados en células de insecto, de levadura o similares, o incluso los tradicionales sistemas de expresión en procariones.

Sin embargo, el cultivo de células de mamífero incluye grandes desafíos, especialmente a escala industrial. Las instalaciones de producción para los cultivos de células de mamífero requieren una completa optimización de numerosas condiciones del proceso.

35 Uno de los parámetros de proceso más importantes para controlar el proceso de producción general, es el medio en el cual se cultivan las células y tiene lugar la producción el polipéptido. Los medios de cultivo celular adecuados deben proporcionar cultivos celulares con todos los nutrientes necesarios, lo cual es especialmente difícil si no se agregan a los medios componentes de origen animal, tales como suero o proteínas, por ejemplo factores de crecimiento.

40 En consecuencia, se han desarrollado una gran variedad de diferentes medios de cultivo celular. En algunos casos, el foco ha estado en la composición general y se han propuesto medios con una amplia variedad de diferentes sustancias (Patente Norteamericana US 5 122 469; Patentes Europeas EP 0 481 791, EP 0 283 942). En otros casos, se han sugerido ingredientes particulares para mejorar el cultivo celular. Las principales metas han sido mejorar ya sea el crecimiento, o la supervivencia de las células, o la cantidad y calidad de los polipéptidos expresados de manera recombinante.

45 Los aspectos específicos abordados en los documentos de la técnica anterior, entre otros, se encuentran la contribución de iones traza particulares (por ejemplo, Publicación de Patente Internacional WO 02/066603; Patentes Europeas EP 0 872 487, EP 1 360 314 A2), vitaminas tales como el ácido ascórbico (e.g. Patente Norteamericana US 6 838 284), carbohidratos (Patente Europea EP 1 543 106) o el contenido de aminoácidos específicos, en combinación con características adicionales (por ejemplo, Patente Europea EP 0 501 435; Patentes Norteamericanas US 5 830 761, US 7 294 484).

Los principales iones y sus concentraciones en los medios de cultivo celular, se mantienen constantes en gran

medida y permanecen sin consideración ni alteración. Todos los tipos clásicos de medios, tales como el DMEM, DMEM/F12 BME o RPMI 1640, utilizan rangos relativamente estrechos y fijos para las concentraciones de los iones en general, y de los cationes monovalentes Na^+ y K^+ , en particular. Esto concuerda con el hecho de que el balance iónicos del grueso de los iones en general, y de los cationes monovalentes Na^+ y K^+ en particular, sea más bien una propiedad universal de la mayoría de las células de mamífero.

Más detalladamente, el gradiente transmembranal de iones sodio y potasio, es una propiedad básica de las células de mamífero con alta concentración de iones potasio en el interior de la célula y alta concentración de iones sodio fuera de la célula. La bomba de sodio y potasio es una de las principales bombas iónicas de la membrana celular, la cual es electrogénica y contribuye a establecer y mantener el respectivo gradiente de iones sodio y potasio a través de la membrana (Kaplan, Membrane cation transport and the control of proliferation of mammalian cells. *Annu Rev Physiol.*; 40: 19-41 (1978)). La bomba utiliza aproximadamente 30% de la energía de las células y es uno de los procesos de mayor consumo de energía de las mismas. Numerosos procesos bioquímicos básicos están acoplados con el gradiente electroquímico de iones sodio, tal como por ejemplo el intercambio Na^+/Ca^+ o el transporte de aminoácidos al interior de las células. Las concentraciones de iones sodio y potasio fuera de una célula, por lo tanto, son parámetros de primordial importancia que tienen influencia sobre el gradiente de estos iones a lo largo de la membrana y el estado básico de las células.

De conformidad con la concentración típica de iones sodio en el interior y exterior de una célula de mamífero genérica (Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell* (1994)), casi siempre se escogen concentraciones de sodio de aproximadamente 145 mM, junto con concentraciones del ión potasio de alrededor de 5 mM. Para la mayoría de los tipos de medios de cultivo, esto da como resultado una relación entre los iones de sodio y potasio, que varía dentro del rango de aproximadamente 20-30 (véase la Tabla 1 más adelante, y por ejemplo la Patente Norteamericana US 5 135 866).

Sólo unos pocos documentos de la técnica anterior describen medios de cultivo celular adecuados para el cultivo de células de mamífero o la producción de proteínas recombinantes, que mencionen relaciones específicas de iones sodio y potasio. Estos documentos sugieren composiciones de medios con relaciones específicamente altas, en el alto rango de aproximadamente 30,7 en la Patente Norteamericana US 5.232.848, o en un rango de entre aproximadamente 25 y 35, alcanzando de esta manera incluso valores más altos (Patentes Europeas EP 0 283 942; EP 0 389 786). Otros medios tales como el HAM-F12 o medios de cultivo de células de animales definidos, tales como los propuestos en la Solicitud de Patente Norteamericana US 2008/0261259, también sugieren específicamente valores más altos (por ejemplo, de 27,9 a 57,5 en la Solicitud de Patente Norteamericana US 2008/0261259). Sólo muy pocos documentos describen medios de cultivo que tengan una relación de iones sodio con respecto a potasio, menor de 20, por ejemplo de 11,5-30 (Patente Norteamericana US 7.294.484); o una relación de aproximadamente 15 (Patente Norteamericana US 6.180.401). Estos documentos todavía utilizan relaciones mayores de 10 y tampoco asignan una ventaja particular al cambio de este parámetro, a los valores como los aquí mencionados.

Además de los efectos relacionados con el balance iónico entre iones particulares, también la contribución de los principales iones a la osmolaridad general del medio, se le debe tomar en cuenta. La mayoría de los medios de cultivo convencionales, tales como por ejemplo el DMEM, MEM alfa o medio de Fischer, están caracterizados por una alta cantidad de cloruro de sodio.

La Publicación de Patente Internacional WO 02/101019, describe el alto contenido de glucosa en el medio, en combinación con el uso de una más alta osmolaridad. La alta concentración de glucosa entre aproximadamente 2-40 g/l, se ha alcanzado reduciendo o incluso eliminando por completo agentes tales como el cloruro de sodio, manteniendo de esta manera la osmolaridad dentro de un nivel dado.

Considerando los desafíos anteriores y las desventajas existentes, existe una continua necesidad, en el campo de la biotecnología industrial, de medios de cultivo celular mejorados, que permitan producir polipéptidos recombinantes a escala industrial.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona medios de cultivo celular con una reducida relación de Na^+/K^+ ; es decir, una relación de Na^+/K^+ por debajo de un valor de aproximadamente 10. Esto se alcanza mediante la disminución del número total de iones sodio e incrementando el contenido total de iones potasio. Se ha encontrado que tales relaciones bajas ejercen varios efectos benéficos, en particular una mejor viabilidad, crecimiento y productividad de las células de mamífero.

Así pues, la presente invención proporciona un medio de cultivo celular optimizado para el crecimiento de células de mamífero, así como para la producción de polipéptidos, que está caracterizado por una relación de iones sodio con respecto a potasio, medida como el contenido molar, de entre aproximadamente 10 a 1 y aproximadamente 1 a 1,

alternativamente entre aproximadamente 8 a 1 y aproximadamente 6 a 1. La implementación de esta característica, puede incluir concentraciones de iones sodio en el rango de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 90 mM y de iones potasio de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 mM.

5 En otro aspecto, la optimización del medio de cultivo celular incluye seleccionar un contenido total de aminoácidos de entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, alternativamente de entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. Esta característica se puede combinar con una particular baja relación molar entre los iones totales y la concentración total de aminoácidos, de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 4.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso en donde el medio de cultivo celular de conformidad con la invención, se utiliza para cultivar células de mamífero para la producción de un polipéptido recombinante deseado. El proceso incluye cultivar células de mamífero en un medio de conformidad con la invención, y expresar el polipéptido recombinante.

Algunas implementaciones del proceso incluyen las condiciones de cultivo, en donde la temperatura y/o el pH del medio se modifican al menos una vez durante el cultivo. Como opción adicional, la alimentación se realiza mediante un proceso por alimentado por lotes.

15 Los productos polipeptídicos deseados incluyen polipéptidos glucosilados y, en particular, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

Las células de mamífero utilizadas en el proceso de la presente invención, de preferencia que se seleccionan del grupo que consiste de células CHO, células HEK y células SP2/0.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un medio de cultivo de conformidad con la invención, en donde los diferentes componentes se mezclan unos con otros. En particular, la concentración de cloruro de sodio agregada a la composición del medio de cultivo, puede estar en el rango de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 15 mM. La concentración de cloruro de potasio que puede ser agregada a la composición de medio de cultivo, puede estar en el rango de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 mM.

25 Breve Descripción de los Dibujos

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes Ejemplos y figuras. Los Ejemplos, sin embargo, no pretenden limitar los alcances de la invención.

30 La Fig. 1 muestra la densidad de células viables de un clon de células CHO productor del mAb1, como función del tiempo de cultivo en cultivos en matraces en agitación (véase el Ejemplo 1), utilizando un medio con una relación reducida de Na^+/K^+ , como la descrita por la presente invención. Además, se ilustra el efecto de una temperatura constante versus un cambio de temperatura.

La Fig. 2 muestra la viabilidad de un clon de células CHO productor del mAb1 (véase el Ejemplo 1), utilizando un medio de cultivo con una relación reducida de Na^+/K^+ y el efecto de una temperatura constante versus un cambio de temperatura, en el día 3.

35 La Fig. 3 muestra el título de producto como función del tiempo de cultivo, en cultivos en matraces en agitación de un clon de células CHO productor del mAb1, con y sin un cambio de temperatura (véase el Ejemplo 1). Las células fueron cultivadas en un medio con una relación reducida de Na^+/K^+ de conformidad con la invención.

40 La Fig. 4 muestra la concentración de lactato sobre el tiempo de cultivo, en un clon productor de mAb2 (véase el Ejemplo 2). Las células fueron cultivadas en un medio con una relación reducida de Na^+/K^+ de conformidad con la invención.

45 La Fig. 5 muestra la densidad de células viables como función del tiempo de cultivo, en un biorreactor de 300 L con un clon de células CHO. Las condiciones de cultivo incluyeron una modificación de temperatura (día 5) y dos cambios de pH, debido a la regulación de pH con un punto de ajuste y una banda inactiva (véase también el Ejemplo 2). Las células se cultivaron en un medio con una relación reducida de Na^+/K^+ de conformidad con la presente invención.

La Fig. 6 muestra el título de producto como función del tiempo de cultivo, en un biorreactor de 300 L con un clon de células CHO. El proceso combinó una temperatura con dos cambios de pH (véanse también la Fig. 5 y el Ejemplo 2). Las células se cultivaron en un medio con una relación reducida de Na^+/K^+ de conformidad con la presente invención.

Descripción Detallada de la Invención

5 Los medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención, se utilizan para el crecimiento de células de mamífero, de preferencia células CHO, células HEK y células SP2/0, y para la producción de polipéptidos recombinantes utilizando tales células. Las células CHO son especialmente preferidas. El término medio de cultivo celular se refiere a una solución acuosa de nutrientes que pueden ser utilizados por las células en crecimiento, por un periodo de tiempo prolongado. Típicamente, los medios de cultivo celular incluyen los siguientes componentes: una fuente de energía, la cual normalmente será un compuesto carbohidrato, de preferencia glucosa, aminoácidos, de preferencia el conjunto básico de aminoácidos, incluyendo todos los aminoácidos esenciales; vitaminas y/u otros compuestos orgánicos, que son requeridos a bajas concentraciones, ácidos grasos libres y compuestos inorgánicos, incluyendo elementos traza, sales inorgánicas, compuestos amortiguadores y nucleósidos y bases.

10 El medio de cultivo celular de conformidad con la presente invención, se puede utilizar en varios procesos de cultivo celular. El cultivo de células se puede llevar a cabo en cultivo adherente, por ejemplo en un cultivo en monocapa, o de preferencia en un cultivo en suspensión.

15 El uso de los medios de cultivo celular en el campo de la industria farmacéutica, por ejemplo para la producción de polipéptidos recombinantes terapéuticamente activos, generalmente no permite el uso de ningún material de origen biológico, debido a aspectos de seguridad y contaminación. Por lo tanto, el medio de cultivo celular de conformidad con la presente invención, de preferencia es un medio libre de suero y/o libre de proteínas. El término "libre de suero y/o libre de proteínas" representa un medio químicamente definido en su totalidad, que no contiene aditivos de ninguna fuente animal, tales como hidrolizados de tejidos, por ejemplo suero fetal bovino o similares. Además, de preferencia no se agregan proteínas, especialmente factores de crecimiento tales como la insulina, transferrina o similares, al cultivo celular de conformidad con la presente invención. Preferiblemente, el medio de cultivo celular de conformidad con la presente invención, tampoco es suplementado con una fuente de proteína hidrolizada tal como peptona de soja, trigo o arroz, o hidrolizado de levadura o similares.

25 La osmolaridad y pH de los medios se ajustan a valores que permitan el crecimiento de las células, por ejemplo a valores entre aproximadamente pH 6.8 y aproximadamente pH 7.2. La osmolaridad de los medios al inicio del cultivo, típicamente está entre aproximadamente 280 y aproximadamente 365 mOsm, pero también se puede incrementar gradualmente durante el cultivo con la adición de soluciones de alimentación a valores menores de, o de aproximadamente 600 mOsm/kg. De preferencia, los medios de conformidad con la presente invención tienen una osmolaridad inicial de entre aproximadamente 285 y aproximadamente 365 mOsm/kg.

30 La temperatura del cultivo celular se selecciona en un rango en el que las células sean viables y crezcan. Una temperatura típica para el cultivo celular está en el rango de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 38°C. Por ejemplo, las células se hacen crecer inicialmente a temperaturas de aproximadamente 36 a aproximadamente 37°C, lo cual es óptimo para las células CHO. Sin embargo, la temperatura exacta se puede adaptar a las necesidades de las células y también puede cambiar durante el cultivo, para permitir su viabilidad, crecimiento o producción óptimos.

35 El primer aspecto de la presente invención se refiere al balance iónico entre los iones de sodio y potasio en el cultivo celular. La presente invención describe una relación molar de iones de sodio con respecto a potasio, que está entre aproximadamente 10 a 1 y aproximadamente 1 a 1. En otras implementaciones de la invención, la relación se selecciona de entre aproximadamente 9 a 1 y aproximadamente 5 a 1. Alternativamente, la relación está entre aproximadamente 8 a 1 y aproximadamente 6 a 1.

40 La concentración de los iones sodio y potasio y la respectiva relación, se define en la presente mediante su contenido molar. La concentración de iones sodio y potasio se determina calculando el número total de estos iones en el medio de crecimiento, después de que las sales respectivas han sido agregadas y disueltas en la solución del medio.

45 Para alcanzar la concentración de sodio requerida, normalmente se agregan diferentes sales al medio. Las sales de sodio comúnmente utilizadas son, por ejemplo NaCl, sales de fosfato monobásico o dibásico de sodio, carbonato de sodio, citrato de sodio, iones traza tales como selenito de sodio, pero no se limitan a estos ejemplos. Asimismo, la base hidróxido de sodio (NaOH) que puede ser agregada al medio para ajustar el pH, contribuye con el contenido total de iones sodio. El término ión a este respecto, se refiere al estado disociado. Por lo tanto, calcular el contenido molar de iones significa tomar en cuenta la valencia de los iones. Por ende, agregar cloruro de sodio (NaCl) 1 mM a un medio, contribuiría con 1 mM de iones sodio, mientras que el fosfato dibásico de sodio 1 mM (Na₂HPO₄), de conformidad con esto, contribuiría con 2 mM de iones sodio. De conformidad con la presente invención, la concentración de sodio utilizada en los medios está entre aproximadamente 50 y 90 mM. Alternativamente, la concentración del ión sodio se selecciona de tal modo que sea aproximadamente de 65 a aproximadamente 85 mM.

55 La sal de potasio que se utiliza para los medios, típicamente es KCl, pero también incluye, por ejemplo, K₂SO₄ o

fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄). La sal de potasio no está limitada a estos ejemplos particulares. Alternativamente, la concentración de potasio empleada en los medios está entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 mM, o aproximadamente 10.7 mM.

5 La Tabla 1 muestra ejemplos de medios que se utilizan tradicionalmente para el crecimiento de células de mamífero. Estos medios clásicos, tales como el DMEM, DMEM/F12, BGJ y otros, tienen una relación particularmente alta de iones Na/K. Los medios de conformidad con la presente invención, están caracterizados por una relación particularmente baja de Na/K, menor de aproximadamente 10 a 1 (véase la Tabla 2). Los medios de conformidad con la presente invención son adecuados para cultivar células CHO y otras células de mamífero, y muestran un mejor crecimiento de las células y/o permiten una mejor producción de polipéptidos. Dos ejemplos de tales medios se muestran en la Tabla 3, la cual ilustra la composición de dos medios de ejemplo y cómo una baja relación de Na/K se puede alcanzar. Efectos sinérgicos entre la baja relación de iones sodio con respecto a potasio y las otras características de los medios, tienen incluso un efecto ventajoso adicional sobre el crecimiento de las células y la producción de proteínas recombinantes.

15 Además de la concentración particular de iones sodio y potasio, y su relación específica, los presentes medios también están caracterizados por una concentración particularmente baja de cloruro de sodio (NaCl), que es agregado a la mezcla de los componentes de los medios. De preferencia, se utilizan concentraciones de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 mM. Esta baja cantidad de cloruro de sodio es inusual. En algunas implementaciones de la presente invención, la concentración de cloruro de sodio (en mM) es incluso más baja que la concentración (en mM) de la respectiva sal de potasio que es agregada. Además, los medios de conformidad con la presente invención a menudo muestran un contenido total bajo de iones cloruro. Como lo muestran los ejemplos de la Tabla 2, esto da como resultado concentraciones iniciales de cloruro de entre aproximadamente 36 y 46 mM. En su mayoría, las sales inorgánicas tales como NaCl o CaCl₂ contribuyen a este valor, pero también los componentes del medio tales como cloruro de colina, o los aminoácidos tales como por ejemplo clorhidrato de L-histidina o clorhidrato de L-lisina se podrían agregar a la concentración total.

25 Otra ventaja de las composiciones de los medios de cultivo de conformidad con la presente invención, es la combinación de una baja relación molar de Na/K, junto con una concentración inicial de aminoácidos que varía dentro del rango de entre aproximadamente 40 mM, alternativamente de aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. Los medios clásicos utilizan concentraciones comparativamente bajas de aminoácidos y/o relaciones altas de Na/K. La combinación de ambas características puede proporcionar efectos adicionales que son ventajosos para el crecimiento de las células y para la producción de polipéptidos.

30 La Tabla 2 muestra diferentes implementaciones de estos parámetros de conformidad con la presente invención. Además de su contenido total de aminoácidos, los medios adecuados de conformidad con la presente invención optimizados para el crecimiento celular, de preferencia contienen concentraciones iniciales de aminoácidos de conformidad con los siguientes rangos.

35

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	4.0 - 6.0, de preferencia 4.5 - 5.5
Asparagina monohidratada	3.0 - 6.0, de preferencia 4.0 - 5.5
Ácido aspártico	2.5 - 4.0, de preferencia 3.0 - 3.6
Glicina	0.3 - 0.8, de preferencia 0.5 - 0.7
40 Histidina, HCl H ₂ O	0.6 - 1.0, de preferencia 0.7 - 0.9
Isoleucina	2.0 - 6.0, de preferencia 2.9 - 4.0
Leucina	3.0 - 7.0, de preferencia 3.5 - 6.0
Clorhidrato de lisina	2.0 - 4.0, de preferencia 2.5 - 3.5
Metionina	1.0 - 1.5, de preferencia 1.2 - 1.4
Fenilalanina	1.0 - 2.0, de preferencia 1.3 - 1.8
Prolina	2.5 - 6.0, de preferencia 3.0 - 5.5
Serina	3.0 - 8.0, de preferencia 4.0 - 7.0
Treonina	2.0 - 3.5, de preferencia 2.5 - 3.1
Triptofano	0.4 - 1.0, de preferencia 0.5 - 0.8
45 Valina	2.5 - 5.0, de preferencia 3.0 - 4.5
Tirosina	1.0 - 2.0, de preferencia 1.2 - 1.8
Cistina	0.5 - 1.0, de preferencia 0.6 - 0.9
Glutamina	5.5 - 9.5, de preferencia 6.2 - 8.2

Los medios de la presente invención adicionalmente especificados por aminoácidos como los definidos en la tabla anterior, se pueden utilizar favorablemente en los procesos de cultivo celular mejorados de conformidad con la presente invención.

En una realización particularmente preferida, los medios de conformidad con la presente invención están optimizados para la producción, y de preferencia contienen concentraciones iniciales de aminoácidos de conformidad con los siguientes rangos.

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	4.0 - 6.0, de preferencia 4.5 - 5.5
Asparagina monohidratada	9.0 - 11.0, de preferencia 9.5 - 10.5
Ácido aspártico	2.5 - 4.0, de preferencia 3.0 - 3.6
Glicina	0.3 - 0.8, de preferencia 0.5 - 0.7
Histidina, HCl H ₂ O	1.0 - 1.5, de preferencia 1.1 - 1.3
Isoleucina	5.5 - 7.0, de preferencia 6.0 - 6.9
Leucina	8.0 - 10.0, de preferencia 9 - 9.2
Clorhidrato de lisina	3.0 - 6.0, de preferencia 4.0 - 5.0
Metionina	1.5 - 2.5, de preferencia 1.5 - 2.0
Fenilalanina	2.0 - 3.5, de preferencia 2.5 - 3.0
Prolina	7.5 - 9.0, de preferencia 8.0 - 8.5
Serina	10.5 - 13.0, de preferencia 11.0 - 11.9
Treonina	3.5 - 5.5, de preferencia 4.0 - 5.0
Triptofano	0.9 - 2.0, de preferencia 1.0 - 1.4
Valina	5.5 - 7.5, de preferencia 6.0 - 6.8
Tirosina	1.0 - 3.0, de preferencia 2.0 - 2.5
Cistina	0.5 - 2.0, de preferencia 1.0 - 1.3
Glutamina	5.5 - 9.5, de preferencia 6.2 - 8.2
Ácido glutámico	0.5 - 2.5, de preferencia 1.0 - 1.2

Los medios de producción que contienen aminoácidos como los definidos en la tabla anterior, se pueden usar favorablemente en los procesos de cultivo celular mejorados de conformidad con la presente invención.

En un aspecto adicional de la invención, además de la relación específica entre los iones de sodio y potasio, también es importante el balance general entre la concentración total de iones (que contribuyen a la fuerza iónica general del medio) y los aminoácidos en el medio. La relación entre la concentración total de iones y los aminoácidos en el medio de crecimiento nutriente, en gran medida está dominada por el grueso de las sales inorgánicas, tales como por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de potasio, carbonato ácido de sodio, y otras, que son los principales ingredientes de la mayoría de los tipos de medios de cultivo celular para células de animales. Asimismo, las sales de iones traza, aminoácidos o vitaminas, contribuyen a este valor (por ejemplo, sulfato cúprico, clorhidrato de L-arginina, clorhidrato de L-histidina, cloruro de colina, D-pantotenato de calcio, y otros). Podría ser ventajoso para las células ajustar las concentraciones de estos iones. Por lo tanto, definimos la concentración total de iones aquí como la suma de todas las principales sales orgánicas e inorgánicas agregadas al medio, que son ionizables en un medio en solución acuosa, más la base NaOH y el ácido HCl. Los elementos traza no se incluyen. Por lo tanto, 1 mM de NaCl, NaOH o las sales orgánicas tales como Lisina•HCl o cloruro de colina, contribuirían cada una con 2 mM de iones. 1 mM de MgCl₂, de acuerdo con esto, agregaría 3 mM de iones, mientras que 1 mM de la sal orgánica citrato trisódico, contribuiría con 4 mM.

De conformidad con la presente invención, la relación molar entre los iones y aminoácidos, por lo tanto, se selecciona de entre aproximadamente 1.9 y 4. En alguna implementación, la relación se selecciona dentro del rango de aproximadamente 2.0 a 3.9. Estas relaciones particularmente bajas no sólo son alcanzadas por un contenido relativamente alto de aminoácidos, sino que también por un contenido molar relativamente bajo de iones en el medio. El contenido de iones en el medio generalmente es menor de 250 mM. Por ejemplo, los valores se seleccionan para estar entre aproximadamente 150 y 220 mM, o alternativamente, entre aproximadamente 170 y 200 mM.

En resumen, las características de los medios particulares descritos tienen importantes efectos sobre el metabolismo celular y la fisiología, mientras que al mismo tiempo afectan los parámetros generales tales como la osmolaridad, o por ejemplo la disponibilidad de componentes nutritivos. El balance de las diferentes características de los medios, por lo tanto, produce propiedades únicas que causan efectos sinérgicos inesperados para las células.

Los medios con una baja relación de Na/K generalmente son adecuados para el crecimiento de diferentes células de mamífero y la manufactura de polipéptidos/proteínas recombinantes, en una producción a gran escala. Los términos polipéptidos y proteínas tal como se utilizan en la presente, se refieren a polipéptidos recombinantes que son expresados por las respectivas células de mamífero, después de transfectar las células con la construcción o construcciones de ADN que codifican para el producto de interés. Cualquier polipéptido que pueda ser expresado en una célula huésped, puede ser producido de conformidad con la presente invención. Después de que el o los polipéptidos hayan sido producidos por el proceso de la presente invención, éstos ya sea son secretados

extracelularmente, unidos a las células, o bien permanecen en las células, dependiendo del producto específico y la línea celular utilizada. El producto polipeptídico puede ser recuperado del sobrenadante del cultivo directamente, o después de la lisis de las células, por los procedimientos normalizados. Asimismo, se pueden realizar aislamiento y purificación adicionales mediante las técnicas estándar conocidas por los técnicos en la materia. El polipéptido de la presente invención, también puede ser incluido en una composición farmacéutica.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende cultivar células de mamífero en un medio de conformidad con la presente invención, en donde las condiciones de cultivo comprenden al menos un cambio de temperatura y/o al menos un cambio de pH.

De conformidad con lo anterior, en otro aspecto de la presente invención, podría ser ventajoso cambiar la temperatura en el transcurso del cultivo e incluir uno o más cambios de temperatura que inician en ciertos puntos de tiempo. Un cambio/modificación en la temperatura no se refiere a fluctuaciones espontáneas en la temperatura, sino a cambios en la temperatura de al menos 1°C, o alternativamente al menos 2°C, que son intencionales, y en donde la segunda temperatura se mantiene por al menos un día. Un cambio/modificación se puede implementar alterando el ajuste de temperatura del cultivo. El tiempo depende del estado de crecimiento del cultivo, de un número predeterminado de días después de iniciado el cultivo, o de las necesidades metabólicas de las células. Así pues, la temperatura se puede modificar en un periodo de aproximadamente 1 a 10 días después de iniciado el cultivo. De preferencia, se realiza una modificación de temperatura durante la fase de crecimiento de las células o hacia el final de esta fase. Dependiendo del volumen del recipiente de cultivo, el cambio podría ocurrir rápidamente o más lentamente, y durar varias horas. En un ejemplo, tal cambio de temperatura se implementa durante la fase de crecimiento del cultivo, cuando la densidad está entre aproximadamente 40 y aproximadamente 90% de la densidad máxima. En un ejemplo, la primera temperatura está entre aproximadamente 33 y aproximadamente 38°C, mientras que en otros ejemplos la primera temperatura está entre aproximadamente 36 y aproximadamente 38°C. La segunda temperatura está entre aproximadamente 30 y aproximadamente 37°C, o alternativamente entre aproximadamente 32 y aproximadamente 34°C.

En otro aspecto de la presente invención, podría ser ventajoso cambiar el pH en el transcurso del cultivo, incluyendo una o más modificaciones de pH. En otros aspectos de la invención, las modificaciones en la temperatura también se pueden combinar con una o más modificaciones del pH. Mientras que el primer pH (por ejemplo pH de 7.0) se elige para que sea favorable para una rápida expansión de las células, es ventajoso modificar el pH del cultivo, una vez que se haya alcanzado cierta densidad celular. Este cambio o modificación del pH se realiza cambiando el ajuste de pH del biorreactor/recipiente de cultivo, o definiendo un punto de ajuste de pH en combinación con una banda inactiva. Un cambio de pH no se refiere a pequeñas fluctuaciones en el pH, sino que más bien se refiere a un cambio intencional. El segundo valor de pH (por ejemplo 6.8) se selecciona para reducir la muerte celular y permitir una alta tasa de producción de polipéptidos específicos de la célula, de una calidad adecuada. El segundo pH se puede mantener hasta el final del cultivo o se pueden introducir modificaciones adicionales de pH. En una implementación, podría ser útil cambiar el pH en al menos 0.2. En una realización, el primer pH se selecciona para que esté dentro del rango de pH 6.8 y 7.5. En otra realización, el primer pH se selecciona para que esté dentro del rango de pH 6.8 y 7.2. El segundo valor de pH que se alcanza después de la modificación de pH, puede estar en el rango de entre pH 6.0 y pH 7.5, o alternativamente entre 6.5 y 6.8.

El medio de cultivo celular de conformidad con la presente invención, se puede emplear en varios procesos de cultivo celular. El cultivo de células se puede llevar a cabo en un cultivo adherente, por ejemplo en un cultivo en monocapa, o de preferencia en un cultivo en suspensión.

El cultivo de células a gran escala se puede utilizar, por ejemplo, por los diversos procesos de fermentación establecidos en la biotecnología industrial. Se pueden aplicar procesos de cultivo celular continuos y discontinuos, empleando los medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención. Otras tecnologías de reactor conocidas, por ejemplo las tecnologías de percusión o similares, también se pueden utilizar. Los procesos por lotes son una realización preferida.

El cultivo celular por lotes incluye el cultivo por lotes con alimentación, o el cultivo por lotes individuales. El término "cultivo celular por lotes con alimentación" se refiere al cultivo celular en el que las células de mamífero y el medio de cultivo celular son suplementados al recipiente de cultivo inicialmente, y se alimentan nutrientes adicionales de manera continua o en incrementos discretos, al medio de cultivo durante el proceso de cultivo, con o sin la cosecha periódica de células y/o producto antes de terminar el cultivo. El término "cultivo por lotes individuales", se refiere a un procedimiento en el cual todos los componentes del cultivo celular, incluyendo las células de mamífero y el medio de cultivo celular, son suministrados al recipiente de cultivo al inicio del proceso de cultivo.

De conformidad con una realización preferida de la presente invención, la alimentación de los cultivos se realiza en un proceso por lotes con alimentación. Tal alimentación es benéfica para que las células reemplacen componentes del medio y nutrientes que se agotan en el medio durante el proceso del cultivo. Típicamente, las soluciones alimentadas comprenden aminoácidos, al menos un carbohidrato como fuente de energía, elementos traza,

5 vitaminas o iones específicos. Las soluciones alimentadas se agregan dependiendo de las necesidades de las células, las cuales ya sea se basan en un programa predeterminado dependiendo de la línea celular particular, o en el clon celular y el producto, o las necesidades medidas durante el proceso de cultivo. Es particularmente ventajoso utilizar soluciones alimentadas concentradas, con el fin de evitar incrementar en gran medida el volumen y diluir el medio. En algunas realizaciones, también podría ser útil tener al menos dos diferentes soluciones de alimentación. Esto permite la dosificación independiente de dos o más diferentes grupos de nutrientes y componentes para las células, y de esta manera ajustar mejor las condiciones de alimentación referentes al suministro óptimo de ciertos nutrientes.

10 En otra realización de la presente invención, una de las dos soluciones de alimentación agregadas al medio de cultivo celular, es una alimentación que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina. De preferencia, la alimentación contiene el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina a concentraciones respectivas en el rango de aproximadamente 6.5 g/l y aproximadamente 8.0 g/l, y en el rango de aproximadamente 9 g/l y aproximadamente 11 g/l, en una solución acuosa a pH alcalino mayor de 10. En una realización particular, la solución de alimentación concentrada comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina, a concentraciones de 10.06 g/l de L-tirosina y 7.25 g/l de cistina, a un pH mayor de 10.

15 El medio de alimentación que comprende cistina y tirosina como el anteriormente descrito, puede ser agregado ya sea basándose en el consumo medido de los respectivos aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.8% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo, por día, de preferencia a aproximadamente 0.4% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo celular, por día.

20 En algunos ejemplos, la otra solución de alimentación contiene todos los demás aminoácidos que también están presentes en el medio básico, excepto tirosina y cistina. En algunos ejemplos, esta solución de alimentación adicional puede consistir de componentes selectos particulares, tales como aminoácidos o carbohidratos. En una realización preferida adicional de la presente invención, este medio de alimentación concentrado de preferencia contiene aminoácidos selectos de conformidad con los siguientes rangos de concentración.

Aminoácidos	Medio de Alimentación Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	12.0 - 17, de preferencia 13.5 - 16.0
Histidina, HCl H ₂ O	5.5 - 7.5, de preferencia 5.9 - 7.0
Isoleucina	21 - 28.0, de preferencia 22.0 - 27
Leucina	32 - 42, de preferencia 34.5 - 40.0
30 Clorhidrato de lisina	17.0 - 22.0, de preferencia 17.5 - 21.5
Metionina	5.5 - 8.0, de preferencia 6.0 - 7.5
Fenilalanina	8.5 - 12.0, de preferencia 9.0 - 10.5
Prolina	18.0 - 24, de preferencia 18.5 - 22.0
Serina	39.0 - 49.0, de preferencia 39.5 - 46.5
Treonina	14.5 - 19.0, de preferencia 15.0 - 18.5
Triptofano	30 - 5.0, de preferencia 3.5 - 4.9
Valina	23.0 - 29.0, de preferencia 23.8 - 27.5
Glutamina	175.0 - 220.0, de preferencia 176.0 - 201

35 De preferencia, también se agregan carbohidratos tales como glucosa a este medio de alimentación concentrado, estando las concentraciones preferidas entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 1400 mmol/l, o alternativamente entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 1395 mmol/l.

40 El medio de alimentación tal como se acaba de describir que de preferencia incluye un carbohidrato tal como glucosa, se puede agregar ya sea con base en el consumo medido de los respectivos aminoácidos, o de conformidad con un programa fijo, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 4% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo celular, por día, de preferencia a aproximadamente 2% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo celular, por día.

45 Las células cultivadas en el medio de cultivo celular de conformidad con la presente invención, incluyen células de mamífero y no mamífero. Las células que no son de mamífero, incluyen células de insecto o similares. Sin embargo, se prefieren las células de mamífero. Los términos célula, línea celular y cultivo celular, se pueden utilizar indistintamente en la presente.

50 Ejemplos de células de mamífero incluyen retinoblastos humanos, células de carcinoma cervical humano, línea de riñón embrionario humano, células de pulmón humano, células de hígado humano, células PER.C6 (una línea celular derivada de retinoblastos humanos), línea de hepatoma humano y líneas de células humanas tales como AGE1.HN; línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40; células de riñón de mono, células de riñón de mono

verde africano, células de ovario de hámster chino/-DHFR, células de riñón de hámster neonato; células sertoli murinas; células de tumor mamario murino, células de riñón canino; células de hígado de rata búfalo; células TRI; células MRC 5; células FS4; siendo preferida la línea celular de células CHO para practicar la presente invención.

5 En una realización preferida de la presente invención, estas células pueden ser diferentes cepas de las células CHO, tales como las células CHO K1 de tipo silvestre, CHO dhfr- (Dux1) o CHO dhfr- (DG44), pero también pueden ser células HEK, células Sp2/0. Estas células típicamente son transfectadas con una o más construcciones de ADN que codifican para el o los polipéptidos de interés. Cualquier polipéptido que pueda ser expresado en estas células huésped, puede ser producido de conformidad con la presente invención.

10 Otra clase de células que se pueden emplear con los medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención, incluyen las células de hibridoma que comúnmente se usan para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.

15 Los polipéptidos que se pueden producir a partir de los cultivos celulares y medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención, no están limitados. Los polipéptidos pueden ser recombinantes o no recombinantes. El término "polipéptido" tal como se utiliza en la presente, abarca moléculas comprendidas de una cadena de más de dos aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos; moléculas que contienen dos o más de tales cadenas; moléculas que comprenden una o más de tales cadenas, adicionalmente son modificadas, por ejemplo, por glucosilación. El término "polipéptido" abarca las proteínas.

La clase preferida de polipéptidos producidos por los cultivos celulares y los medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención, son anticuerpos recombinantes.

20 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), nanocuerpos, anticuerpos modificados, subunidades de anticuerpos, derivados de anticuerpos, anticuerpos artificiales, combinaciones de anticuerpos con proteínas y fragmentos de anticuerpo suficientemente grandes como para desplegar la actividad biológica deseada. Los anticuerpos monoclonales tal como se utilizan en la presente, pueden ser anticuerpos humanos.

Sin embargo, también se pueden producir polipéptidos diferentes de anticuerpos, utilizando los cultivos celulares y medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención; por ejemplo, polipéptidos tales como proteínas transmembranales, receptores, hormonas, factores de crecimiento, proteasas, proteínas de coagulación y anticoagulantes, proteínas inhibitoras, interleucinas, factores de transporte, proteínas de fusión y similares.

30 Los productos obtenidos a partir de tales procesos de cultivo celular, se pueden emplear para la preparación de preparaciones farmacéuticas. El término "preparación farmacéutica", se refiere a una composición adecuada o adaptada para ser administrada a un mamífero, especialmente un ser humano. En adición, la o las proteínas de conformidad con la presente invención, se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensoactivos, receptores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

35 La Tabla 1 resume las composiciones de medios disponibles en el comercio y medios de cultivo celular adicionales de la técnica anterior: los valores se basan en los valores publicados; las adiciones tales como NaOH, por lo tanto, no están incluidas en los valores. La concentración de sodio o la relación de sodio con respecto a potasio, por lo tanto, más bien está subestimada e incluso más alejada de los valores de la presente invención.

Tabla 1

Medios	Na ⁺ (mM)	NaCl (mM)	K ⁺ (mM)	Relación Na/K	Cl ⁻ (mM)	Iones totales (mM)	AA totales (mM)	Relación Iones/AA
Medios comerciales								
D-MEM/F12	123	120.6	4.2	29	129.1	290	7.0	41.4
Ham F12	147.0	130.1	3.0	49	135.0	305	4.0	76.2
MEM alfa	145.4	117.2	5.3	27	127.0	310.2	9.0	34.5
RPMI 1640	138.7	103.4	5.3	26	109.0	283.6	6.6	42.9
BME	144.4	117.2	5.3	27	126.4	307.1	1.4	219
Fischer	152.3	136.8	5.3	28	144.9	317	5.6	56.6
Otros medios								
US 7294484	48/125/86	19/95/64	4.2	12/30/21	no determinado	ND	> 70	ND
WO 02/101019	10.9/8.1	0/0	20.2/19.9	0.5/0.4	48/31	122.8/78.9	78.1/59.5	1.6/1.3
Medios A/B								

La Tabla 2 describe formulaciones de medios de cultivo celular de conformidad con la presente invención, caracterizadas por su particular relación baja de iones de sodio con respecto a potasio.

5

Tabla 2

Medios	Na ⁺ (mM)	NaCl (mM)	K ⁺ (mM)	Relación Na/K	Cl- (mM)	Iones totales (mM)	AA totales (mM)	Relación Iones/AA
Medio 1	83.6	14.6	10.7	7.8	36.2	195.7	51.1	3.8
Medio 2	69.5	8.6	10.7	6.5	45.5	191.2	90.5	2.1
Medio 3	79.7	8.6	10.7	7.4	41.4	190.6	90.7	2.1
Medio 4	73.4	8.6	10.7	6.9	39.9	177.5	80.2	2.2
Medio 5	67.2	8.6	10.7	6.3	38.3	164.3	69.7	2.4
Medio 6	60.9	8.6	10.7	5.7	36.8	151.1	59.2	2.6

10

La Tabla 3 describe las composiciones de los ejemplos para medios de cultivo celular químicamente definidos de conformidad con la presente invención. Los componentes individuales de estos medios de cultivo celular, están disponibles en fuentes comerciales normales.

Tabla 3

Componentes	Medio 1 Conc. final (mg/L)	Medio 2 Conc. final (mg/L)	Medio 3 Conc. final (mg/L)	Medio 4 Conc. final (mg/L)	Medio 5 Conc. final (mg/L)	Medio 6 Conc. final (mg/L)
CaCl ₂ , anhidro	131	133.2	130.6	130.6	130.6	130.6
KCl, anhidro	800	800	800	800	800	800
MgCl ₂ , anhidro	155	250.4	250.2	226.4	202.6	178.9
NaCl	850.6	500	600	500	500	500
Fosfato ácido disódico, anhidro	710	1065	1775	1508.8	1242.5	976.3
Carbonato ácido de sodio anhidro	2500	2000	2000	2000	2000	2000
L-arginina, base libre	871	871	-	-	-	-
L-arginina • HCl	-	-	1053	1052	1053	1053
L-asparagina • H ₂ O	616	1501	1501	1279.8	1058.6	837.3
Ácido L-aspartico	461	461	461	461	461	461
L-cistina	200.1	304.5	304.5	228.4	152.3	76.1
Sal Na del ácido L-glutámico, hidratada	-	182	-	-	-	-
Ácido L-glutámico	-	-	182	136.5	91	45.5
L-histidina, HCl•H ₂ O	168	268	268	243	218	193
L-isoleucina	394	894	894	769	644	519
L-leucina	499	1199	1199	1025	850	675
L-lisina, HCl	621	821	821	772	722	672
L-metionina	179	279	279	255	230	205
L-fenilalanina	264	464	464	414	364	314
L-prolina	368	968	968	818	668	518
L-serina	432	1232	1232	1032	832	632
L-treonina	333	533	533	484	434	384
L-triptofano	102	252	252	214.5	177	139.5
L-valina	375	775	775	676	576	476
L-tirosina	277.7	422.5	422.5	316.9	211.3	105.6
Glicina	38	38	38	38	38	38
L-glutamina	1169.2	1169.2	1169.2	1169.2	1169.2	1169.2
Biotina	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
D-pantotenato de Ca	4	4	4	4	4	4
Ácido fólico	5	5	5	5	5	5
Mio-inositol	40	140	140	115	90	65
Nicotinamida	4	4	4	4	4	4
Piridoxina•HCl	2	2	2	2	2	2
Riboflavina	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Vitamina B12	2	2	2	2	2	2
Tiamina•HCl	4	4	4	4	4	4
Putrescina, 2HCl	10	110	110	85	60	35
Cloruro de colina	40	240	240	190	140	90
Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₃)	0.03	0.03	-	-	-	-
Selenito de sodio heptahidratado (Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O)	-	-	0.02	0.02	0.02	0.02
Cloruro de manganeso tetrahidratado	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Molibdato de amonio tetrahidratado	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Cloruro de zinc anhidro	3	3	3	3	3	3
Cloruro cúprico dihidratado	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

(continuación)

Componentes	Medio 1 Conc. final (mg/L)	Medio 2 Conc. final (mg/L)	Medio 3 Conc. final (mg/L)	Medio 4 Conc. final (mg/L)	Medio 5 Conc. final (mg/L)	Medio 6 Conc. final (mg/L)
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Etanolamina	10	100	100	77.5	55	32.5
Monotioglicerol	2	-	-	-	-	-
HEPES, forma ácida	17870	4766	4766	3574.5	2383	1191.5
Citrato trisódico dihidratado	911.7	1235.2	911.2	911.2	911.2	911.2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	54.1	54.1	64.1	541	54.1	54.1
F68 plurónico	1000	1000	1000	1000	1000	1000
D-glucosa anhidra	10000	10000	10000	10000	10000	10000
HCl	-	-	-	-	-	-
NaOH	799.2	339.9	519.9	419.9	319.9	220

10 Ejemplos

En los Ejemplos que se describen a continuación, los medios de cultivo celular químicamente definidos 1 y 2, tienen las composiciones como se detallan en la Tabla 3 anterior. Los componentes individuales de estos medios de cultivo celular están disponibles en fuentes comerciales normales.

15 La Tabla 4 que se presenta a continuación, muestra la composición de un medio de alimentación concentrado, que contiene L-tirosina y cistina. El medio de alimentación se puede agregar ya sea basándose en el consumo medido de los respectivos aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo a razón de 0.4% en peso, por día.

Tabla 4

Componentes	Medio de alimentación (g/L)
NaOH 32%	18.7 mL
L-tirosina	10.06
Cistina	7.25

20 La Tabla 5 que se presenta a continuación, muestra la composición de un medio de alimentación concentrado de ejemplo. El medio de alimentación puede ser agregado ya sea basándose en el consumo medido de aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo a razón de 2% en peso por día.

Tabla 5

Componentes	Medio de alimentación (g/L)
L-arginina, base libre	2.72
L-histidina, HCl-H ₂ O	1.44
L-isoleucina	3.44
L-leucina	5.20
L-lisina, HCl	3.72
L-metionina	1.08
L-fenilalanina	1.72
L-prolina	2.44
L-serina	4.76
L-treonina	2.08
L-triptofano	0.88
L-valina	3.16
L-glutamina	29.23
D-glucosa monohidratada	275.00
HCl al 25%	8.25 mL
NaOH al 32%	5.6 mL

35 Para los experimentos de los ejemplos, se utilizó una línea celular CHO progenitora derivada de la línea celular dhfr (+) CHO-K1, ATCC CCL-61 (Kao *et al.*, Genetics, 1967, 55, 513-524; Kao *et al.*, PNAS, 1968, 60, 1275-1281; Puck *et al.*, J. Exp. Med., 1958, 108, 945-959), mediante la adaptación a las condiciones de medio de cultivo libre de suero, libre de proteína. Dos alícuotas de esta línea celular progenitora fueron transfectadas para expresar dos

diferentes anticuerpos monoclonales, el mAb1 y mAb2, respectivamente.

Ejemplo 1

5 En el Ejemplo 1, dos cultivos en matraces en agitación que contenían el medio 1 fueron inoculados en paralelo con un clon de células CHO productor de mAb1. Los cultivos en matraces en agitación se incubaron en una incubadora de bióxido de carbono a 37°C. En el día 3, un matraz en agitación fue transferido a una incubadora de bióxido de carbono puesta a 33°C. Ambos matraces en agitación fueron alimentados de manera similar con dos soluciones de alimentación. La alimentación fue suplementada de conformidad con un programa fijo, agregando 0.4% de la primera solución de alimentación (Tabla 2) y 2% de la segunda solución de alimentación (Tabla 3) al día, iniciando en el día 5 y terminando hasta el final del cultivo.

10 El cambio de temperatura a 33°C, hace posible un mantenimiento más prolongado de la densidad de células viables y de la viabilidad del cultivo con el tiempo (Figs. 1 y 2), y también alcanzar un título de producto más alto (Fig. 3), en comparación con el cultivo que se mantuvo a 37°C durante todo el transcurso del experimento. Este ejemplo ilustra el beneficio de implementar un cambio de temperatura a 33°C durante un proceso de producción de cultivo celular, basándose en una línea celular CHO.

Ejemplo 2

20 En este ejemplo, un biorreactor de 300 L que contenía el medio 2, fue inoculado con un clon de células CHO productor de mAb2. En el día 5, la temperatura del biorreactor fue cambiada de 36.5°C a 33°C. El punto de pH establecido es 6.90 y la banda inactiva es 0.10. Como resultado, el cultivo inicia a pH 7.00, el pH disminuye a 6.80 entre el día 2 y el día 4, y después progresivamente regresa a 7.00, debido al consumo de ácido láctico por las células (Fig. 4). La modificación a pH 6.80 hace posible reducir la adición de una base, en comparación con un caso en el que se mantuviera un pH constante de 7.00. El regreso a pH 7.00 hace posible reducir la concentración de CO₂ en el medio, en comparación con un caso en el que el pH se dejara a 6.80 después de la primera modificación.

25 En este proceso que combina modificaciones de temperatura y pH, se alcanza una alta densidad de células viables y se minimiza la disminución de la densidad de células viables con respecto al tiempo (Fig. 5), lo cual permite alcanzar en el día 14 un alto título (Fig. 6) del producto con una calidad adecuada. La alimentación se aplicó de manera similar que en el Ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular libre de suero para el crecimiento de células de mamífero, **caracterizado porque** tiene una relación molar de iones sodio con respecto a potasio, de entre 10 a 1 y 1 a 1.
2. El medio de cultivo celular de la reivindicación 1, en donde el medio es un medio libre de proteína.
- 5 3. El medio de cultivo celular de la reivindicación 1 o 2, en donde la relación molar de iones sodio con respecto a potasio, está entre 8 a 1 y 6 a 1.
4. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración de iones sodio está entre 50 y 90 mM.
- 10 5. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración de iones potasio está entre 8 y 12 mM.
6. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración total de aminoácidos está entre 40 y 100 mM.
7. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación molar entre la concentración total de iones y la concentración total de aminoácidos, está entre 1.9 y 4.
- 15 8. Un proceso para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende cultivar células de mamífero en un medio como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y expresar el polipéptido recombinante.
9. El proceso de conformidad con la reivindicación 8, en donde las condiciones de cultivo comprenden al menos una modificación de temperatura y/o al menos una modificación del pH.
- 20 10. El proceso de conformidad con la reivindicación 8 o 9, en donde el cultivo se realiza mediante un proceso por lotes con alimentación.
11. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde los polipéptidos producidos están glucosilados.
12. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 25 13. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde las células de mamífero se seleccionan del grupo que consiste de células CHO, células HEK y células SP2/0.
14. Un proceso para la producción de un medio de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 1, en donde los diferentes componentes se mezclan unos con otros.
- 30 15. El proceso de conformidad con la reivindicación 14, en donde se agrega cloruro de sodio a una concentración entre 7 y 15 mM.
16. El proceso de conformidad con la reivindicación 14 o 15, en donde se agrega cloruro de potasio a una concentración entre 8 y 12 mM.

Fig. 1

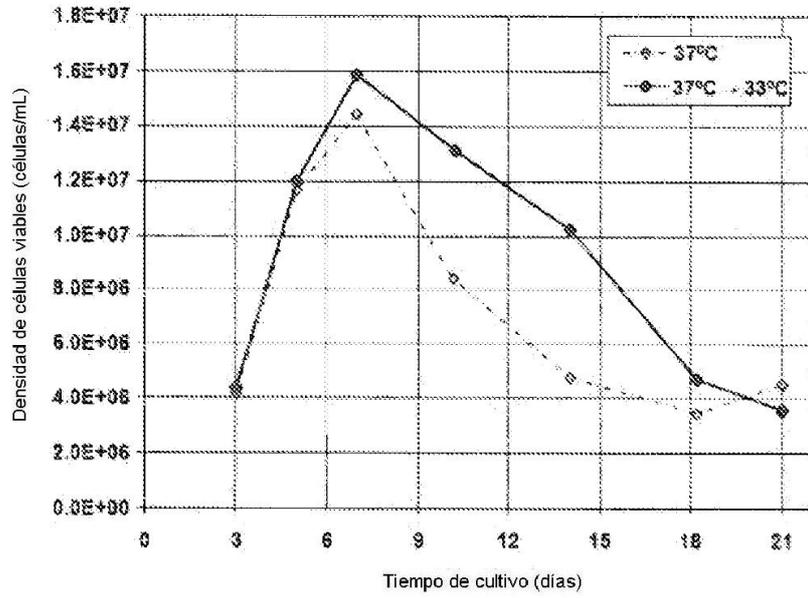


Fig. 2

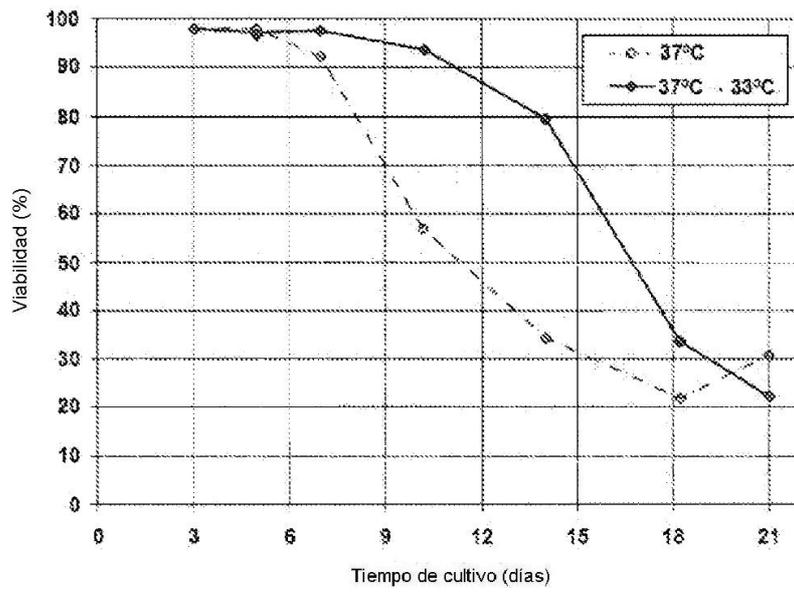


Fig. 3

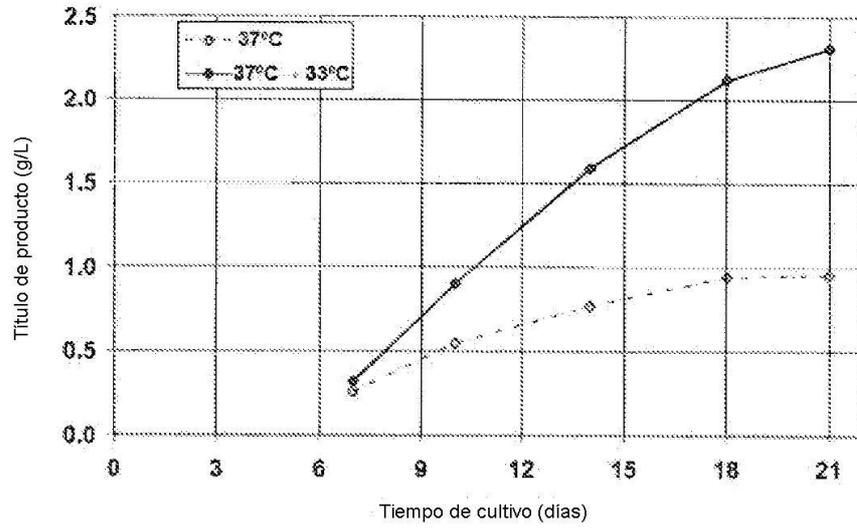


Fig. 4

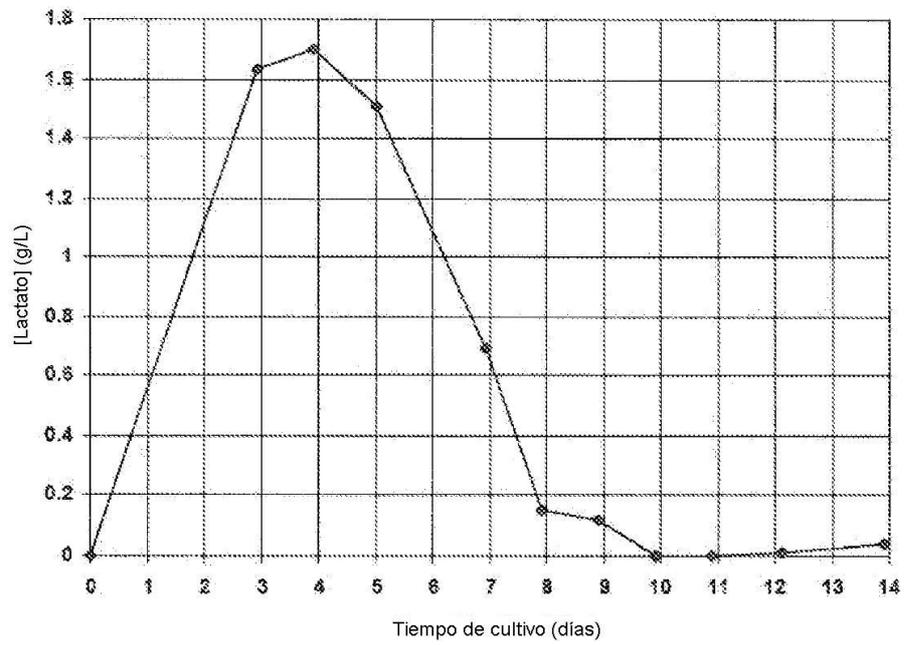


Fig. 5

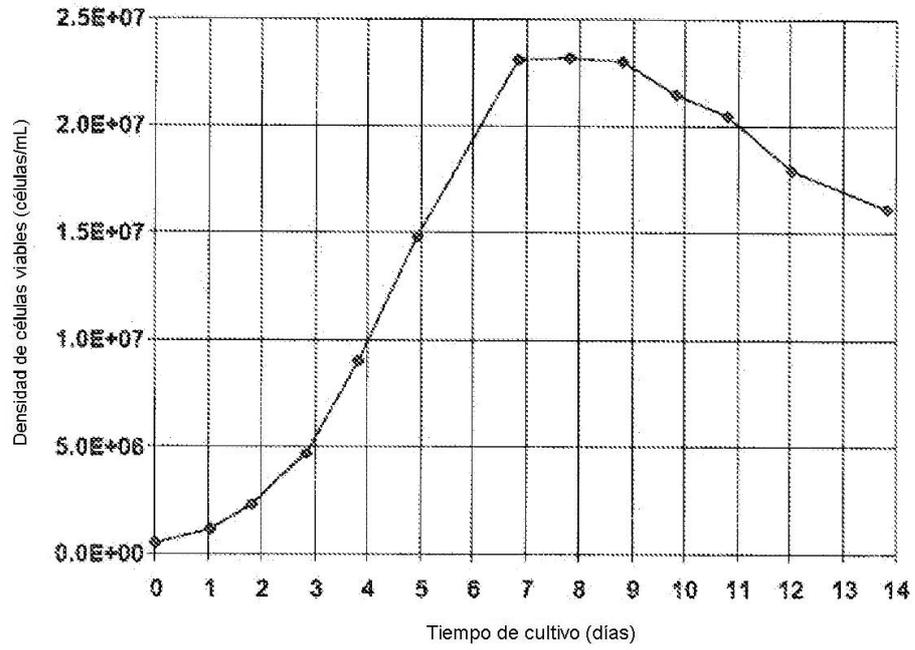


Fig. 6

