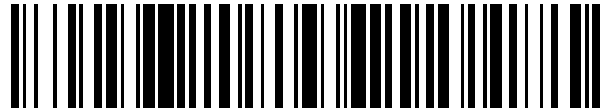


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 986**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2007 E 07868688 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2078071**

54 Título: **Medios diseñados racionalmente para un cultivo celular**

30 Prioridad:

08.11.2006 US 858289 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LUAN, YEN-TUNG;
WANG, WENGE;
NOLAN, RYAN y
DRAPEAU, DENIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 538 986 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medios diseñados racionalmente para un cultivo celular

Campo de la invención

5 La divulgación se refiere a procedimientos para diseñar racionalmente medios de cultivo celular para su uso en cultivos celulares empleados, por ejemplo, en la producción de polipéptidos; medios de cultivo celular diseñados con los procedimientos desvelados; a procedimientos para producir grandes cantidades de un polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, usando dichos medios; a polipéptidos producidos usando los procedimientos y los medios desvelados en el presente documento; y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos polipéptidos. La invención es particularmente útil en cultivos celulares a gran escala. Los procedimientos y las composiciones que se desvelan en el presente documento son particularmente útiles para producir cantidades significativas de polipéptidos en cultivos discontinuos, semicontinuos y en perfusión, de células animales.

Técnica anterior relacionada

15 Una gran proporción de productos biotecnológicos, ya sea disponibles en el comercio o únicamente en desarrollo, son agentes terapéuticos proteicos; por tanto, existe la demanda de producción de estos polipéptidos en cultivos celulares. Además, con frecuencia se requiere la maquinaria celular de una célula animal (a diferencia de, por ejemplo, una célula bacteriana) para producir muchas formas de agentes terapéuticos polipeptídicos (tales como proteínas glucosiladas o anticuerpos monoclonales (Acm)) producidos por hibridomas. Por consiguiente, existe una creciente demanda para optimizar la producción de estos polipéptidos en cultivos celulares y particularmente en cultivos de células animales.

20 En comparación con los cultivos de células bacterianas, los cultivos de células animales tienen tasas de producción más bajas y típicamente generan rendimientos de producción más bajos. Por tanto, una cantidad significativa de investigación se centra en las condiciones de cultivo de células animales que optimicen la producción del polipéptido, es decir, condiciones que soporten una densidad celular elevada y un título elevado. Por ejemplo, se ha determinado que manteniendo las concentraciones de glucosa en medios de cultivo celular a bajas concentraciones y cultivando las células en una fase de producción a una osmolaridad de aproximadamente 400 a 600 mOSm se aumentaba la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células animales, en los que, en todas las fases, el cultivo es también a una concentración de glutamina seleccionada (preferentemente entre aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2 mM). También se ha determinado que el suministro limitado de glucosa a cultivos de células animales en procesos semicontinuos controla la producción de lactato sin requerir el suministro de glucosa a una tasa constante. Además, se sabe que la modificación de la concentración acumulativa total de aminoácidos, la concentración de aminoácidos individuales y las proporciones de aminoácidos individuales entre sí (por ejemplo, glutamina con respecto a asparagina) y de aminoácidos totales (por ejemplo, glutamina con respecto a aminoácidos totales) en los medios de un cultivo celular a gran escala puede dar como resultado una producción de polipéptidos a gran escala sustancialmente mejorada.

35 Tradicionalmente, los estudios del medio de los cultivos de células animales se centran en tres técnicas: 1) enriquecimiento de los componentes del medio del medio de partida y aumento de la frecuencia del suministro del cultivo; 2) aplicación de diseño multifactorial a diferentes fuerzas de medio y diferentes concentraciones de componentes; y 3) análisis del medio acondicionado (consumo) de aminoácidos, vitaminas y otros componentes, y adición de aquellos componentes que estén a bajos niveles o que se hayan agotado. Estos procedimientos generalmente usan respuestas de densidad celular, viabilidad y título como indicadores de optimización.

Sin embargo, los procedimientos anteriores únicamente detectan indirectamente las necesidades de nutrientes de las células en función del resultado final, es decir, densidad, viabilidad y título celular, en lugar de detectar y proporcionar a la célula las necesidades reales de nutrientes para optimizar la producción de proteínas.

Sumario de la invención

45 La presente divulgación proporciona procedimientos para diseñar racionalmente medios de cultivo celular, por ejemplo, medios de cultivo celular a gran escala, para su uso, por ejemplo, en cultivos celulares a gran escala empleados en la producción de polipéptidos; medios de cultivo celular, por ejemplo, medios de cultivo celular a gran escala, diseñados con los procedimientos desvelados; procedimientos para producir grandes cantidades de un polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, usando dichos medios; polipéptidos producidos usando los procedimientos y medios desvelados en el presente documento; y composiciones farmacéuticas que contengan dichos polipéptidos. Estos procedimientos y composiciones son útiles para cultivar, por ejemplo, cultivos celulares discontinuos, semicontinuos y en perfusión. Estos procedimientos y composiciones son particularmente útiles para el cultivo a gran escala, por ejemplo, cultivos discontinuos, semicontinuos y en perfusión, de células animales, por ejemplo, células de mamífero. La invención proporciona un medio de cultivo celular que comprende entre 50 aproximadamente de 7 mM a 30 mM de leucina, entre aproximadamente de 7 mM a 30 mM de lisina, entre 7 mM a 30 mM de treonina, entre 7 mM a 30 mM de prolina y entre 7 mM a 30 mM de valina. La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:

(1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:

- a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y
- b. un medio de cultivo celular que comprende entre 7 mM a 30 mM de leucina, entre aproximadamente 7 mM a aproximadamente 30 mM de lisina, entre 7 mM a 30 mM de treonina, entre 7 mM a 30 mM prolina y entre 7 mM a 30 mM de valina; y

(2) mantener el cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés.

Un medio diseñado racionalmente de la presente divulgación contiene una concentración de un aminoácido que se calcula para su uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para su uso en el mantenimiento celular y una concentración del aminoácido que se calcula para su incorporación en el polipéptido de interés.

En una realización, la divulgación proporciona un procedimiento para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende proporcionar un cultivo celular, que comprende células, que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, y un medio de cultivo celular deseado, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para su uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para su uso en el mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para su incorporación en el polipéptido de interés; y, el mantenimiento del cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés. En una realización de la divulgación, el medio de cultivo celular deseado comprende una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de acuerdo con la fórmula $A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$, en la que X es una concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se usa para su incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título de polipéptido, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular y F es un factor inicial.

En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento para producir un polipéptido en un cultivo celular, que comprende proporcionar un cultivo celular, que comprende células, que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y un medio de cultivo celular de partida, en el que el volumen del medio de cultivo celular de partida es aproximadamente 60-99 % del volumen de un volumen de medio de cultivo celular deseado; proporcionar al cultivo celular un suministro del medio de cultivo celular, en el que el volumen del suministro del medio de cultivo celular es aproximadamente 1-40 % del volumen del medio de cultivo celular deseado, y en el que el medio de cultivo celular deseado resultante comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para su uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para su uso en el mantenimiento celular y una concentración del aminoácido que se calcula para su incorporación en el polipéptido de interés; y, el mantenimiento del cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés. En una realización de la invención, el medio de cultivo celular deseado resultante comprende una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de acuerdo con la fórmula $A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$, en la que X es una concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se usa para su incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título del polipéptido, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor inicial; y el mantenimiento del cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés. En otra realización de la invención, el medio de cultivo celular de partida comprende una concentración, B, del aminoácido de acuerdo con la fórmula $B=[A-(Z*V)]/(1-V)$, en la que Z es una concentración del aminoácido en el suministro del medio de cultivo celular y V es un volumen del suministro del medio de cultivo celular como una proporción del volumen del medio de cultivo celular deseado. En otra realización de los procedimientos desvelados en el presente documento, Y es de 0 a aproximadamente 1,5. En otra realización más de los procedimientos desvelados en el presente documento, F es de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5. En una realización adicional de los procedimientos desvelados en el presente documento, Y es de 0 a aproximadamente 1,5 y F es de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5.

En una realización de los procedimientos desvelados en el presente documento, el medio de cultivo celular deseado comprende más que o igual a aproximadamente 3 mM de tirosina. En otras realizaciones de los procedimientos desvelados en el presente documento, el medio de cultivo celular deseado comprende: entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de leucina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de lisina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de treonina; entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de prolina; y/o entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM de valina. En una realización adicional de los procedimientos desvelados en el presente documento, la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, prolina y valina en el medio de cultivo celular deseado es entre aproximadamente 35 mM y aproximadamente 150 mM. En otra realización más, la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, prolina, y valina en el medio de cultivo celular deseado es entre aproximadamente 60 % y aproximadamente 80 % de la concentración de los aminoácidos esenciales totales en el medio de cultivo celular deseado.

En una realización de los procedimientos desvelados en el presente documento, la concentración combinada de los aminoácidos esenciales en el medio de cultivo celular deseado es entre aproximadamente 30 % y aproximadamente 50 % de la concentración de los aminoácidos totales en el medio de cultivo celular deseado. En otra realización de

los procedimientos desvelados en el presente documento, la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado es entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM. En una realización adicional de los procedimientos desvelados en el presente documento, la concentración de prolina en el cultivo celular se mantiene a más de aproximadamente 1 mM. En otra realización adicional de los procedimientos desvelados en el presente documento, la concentración de prolina en el cultivo celular se mantiene a más de aproximadamente 2 mM. En algunas realizaciones de los procedimientos de producción de un polipéptido, el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala. En otras realizaciones, las células son células animales.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona polipéptidos producidos de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento. Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido producido de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento de cultivo celular que comprende: proporcionar un cultivo celular, que comprende: células; y un medio de cultivo celular deseado que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para su uso en masa celular y una concentración del aminoácido que se calcula para su uso en el mantenimiento celular; y el mantenimiento del cultivo celular en condiciones que permitan el crecimiento y la replicación de las células en el cultivo celular. En una realización de la invención, el medio de cultivo celular deseado comprende una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A' , de acuerdo con la fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en la que X es una concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, M es un multiplicador para una densidad celular pico deseada del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor inicial. En algunas realizaciones de los procedimientos del cultivo celular, el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala. En otras realizaciones, las células son células animales.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un medio de cultivo celular, que comprende una concentración total de aminoácidos de entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM. Otro aspecto de la divulgación proporciona un medio de cultivo celular para su uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración total de aminoácidos de entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un medio de cultivo celular para su uso en la producción de un polipéptido de interés, que comprende una concentración de un aminoácido que se calcula para su uso en masa celular, una concentración del aminoácido que se calcula para su uso en el mantenimiento celular, y una concentración del aminoácido que se calcula para su incorporación en el polipéptido de interés. En una realización de la invención, el medio de cultivo celular para su uso en la producción de un polipéptido de interés comprende una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A , de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en la que X es una concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, P es una concentración del aminoácido que se usa para su incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título del polipéptido, M es un multiplicador para la densidad celular pico deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para la concentración deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor inicial.

Otro aspecto adicional de la divulgación proporciona un medio de cultivo celular, que comprende una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A' , de acuerdo con la fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en la que X es una concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, M es un multiplicador para la densidad celular pico deseada del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular, y F es un factor inicial. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo celular a gran escala. En otras realizaciones, el medio de cultivo celular es un medio de cultivo de células animales.

Otro aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para determinar una concentración optimizada de un aminoácido usado en un medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en un cultivo celular, que comprende: determinar la concentración de aminoácidos necesaria para la masa celular de las células en el cultivo celular a una densidad celular diana; determinar la concentración de aminoácidos necesaria para producir el polipéptido de interés en el cultivo celular a un título del polipéptido diana; determinar la concentración de aminoácidos necesaria para el mantenimiento celular de las células en el cultivo celular; y añadir las concentraciones para proporcionar una concentración optimizada del aminoácido usado en el medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en el cultivo celular.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un procedimiento para determinar una concentración de aminoácidos optimizada, A , de un aminoácido usado en un medio de cultivo celular para la producción de un polipéptido de interés en un cultivo celular, que comprende: determinar la concentración de aminoácidos, X , necesaria para la masa celular de las células en un conjunto de densidades celulares; determinar la concentración de aminoácidos, P , necesaria para producir el polipéptido de interés en un conjunto de títulos de polipéptido; y determinar la concentración de aminoácidos optimizada, A de acuerdo con la fórmula $A = [(M \cdot X) + (N \cdot P) + (M \cdot Y \cdot X)] \cdot F$, en la que M es un multiplicador para una densidad celular diana deseada del cultivo celular, N es un multiplicador para una concentración diana deseada del polipéptido de interés, Y es un factor de mantenimiento celular; y F es un factor inicial. En algunas realizaciones de los procedimientos para determinar una concentración de aminoácidos optimizada, el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala. En otras realizaciones, las células son células

animales.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La **Figura 1** representa la densidad celular (eje Y; "Densidad Celular (10^6 células/ml)") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en el medio diseñado racionalmente del Ejemplo 2.
- 10 La **Figura 2** representa el título (eje Y; "Título (g/l)") del anticuerpo anti-IL-22 a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en el medio diseñado racionalmente del Ejemplo 2.
- 15 La **Figura 3** representa la densidad celular (eje Y; "Densidad Celular (10^6 células/ml)") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en el medio diseñado racionalmente del Ejemplo 3.
- 20 La **Figura 4** representa el título (eje Y; "Título (g/l)") del anticuerpo anti-IL-22 a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en el medio diseñado racionalmente del Ejemplo 3.
- 25 La **Figura 5** representa el título (eje Y; "Título (g/l)") del anticuerpo anti-IL-22 a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio Tradicional" (un medio basado en requisitos de cultivo de células tradicionales, véase, por ejemplo, la solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2006/0121568), en "Medio de Diseño Racional" preparado usando los procedimientos del presente documento, o "Medio Tradicional + Prolina", que contiene un prolina adicional de 3,7 mM añadida al "Medio Tradicional" (véase el Ejemplo 4).
- 30 La **Figura 6** representa la densidad celular (eje Y; "Densidad Celular (10^6 células/ml)") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio Tradicional", "Medio de Diseño Racional" o "Medio Tradicional + Prolina" (véase el Ejemplo 4).
- 35 La **Figura 7** representa la viabilidad celular (eje Y; "Viabilidad [%]") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio Tradicional", "Medio de Diseño Racional" o "Medio Tradicional + Prolina" (véase el Ejemplo 4).
- 40 La **Figura 8** representa la concentración del aminoácido indicado (eje Y; "[μ M]") ((**Figura 8A**) prolina; (**Figura 8B**) treonina; (**Figura 8C**) valina; (**Figura 8D**) triptófano; o (**Figura 8E**) tirosina) a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio Tradicional", "Medio de Diseño Racional" o en "Medio Tradicional + Prolina" (véase el Ejemplo 4).
- 45 La **Figura 9** representa la densidad celular (eje Y; "Densidad Celular (10^6 células/ml)") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio de Diseño Racional" o en "Medio de Diseño Racional sin factores de mantenimiento ni iniciales". La figura es representativa de 5 copias independientes (n=5) (véase el Ejemplo 6).
- 50 La **Figura 10** representa la viabilidad celular (eje X; "Viabilidad [%]") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio de Diseño Racional" o en "Medio de Diseño Racional sin factores de mantenimiento ni iniciales". La figura es representativa de 5 copias independientes (n=5) (véase el Ejemplo 6).
- 55 La **Figura 11** representa el título del anticuerpo (eje Y; "Título (g/l)") a lo largo del tiempo (eje X; "Días") para células CHO modificadas genéticamente para expresar anti-IL-22. Las células se cultivaron en "Medio de Diseño Racional" o en "Medio de Diseño Racional sin factores de mantenimiento ni iniciales". La figura es representativa de 5 copias independientes (n=5) (véase el Ejemplo 6).

Descripción detallada de la invención

La expresión "cultivo discontinuo" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que todos los componentes que finalmente se usarán en el cultivo de las células, incluyendo el medio así como las propias células, se proporcionan al inicio del proceso de cultivo. Un cultivo discontinuo se detiene típicamente en algún punto y las células y/o los componentes presentes en el medio se recogen y opcionalmente se purifican.

La expresión "cultivo semicontinuo" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en algún momento después de iniciar el proceso de cultivo. Los componentes proporcionados típicamente comprenden complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Un cultivo semicontinuo se detiene típicamente en algún punto y las células y/o los componentes presentes en el medio se recogen y opcionalmente se purifican. En una realización preferida de la presente invención, el cultivo celular es un cultivo de células animales, por ejemplo, un cultivo de células de mamífero, es decir, un cultivo discontinuo o semicontinuo.

La expresión "cultivo en perfusión" como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que los componentes adicionales se proporcionan al cultivo de manera continuada o semicontinuada después de iniciar el proceso de cultivo. Los componentes proporcionados típicamente comprenden

complementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Las partes de las células y/o componentes en el medio se recogen típicamente en una base continua o semi-discontinúa y opcionalmente se purifican.

5 El término “biorreactor” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier recipiente usado para el crecimiento de un cultivo de células procariotas o eucariotas, por ejemplo, un cultivo de células animales (tal como un cultivo de células de mamífero). El biorreactor puede tener cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células, por ejemplo, células de mamífero. Típicamente, el biorreactor tendrá un volumen de al menos 30 ml y puede tener 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.0000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor, incluyendo, pero sin limitación, el pH y la temperatura, están típicamente controladas durante el periodo de cultivo. El biorreactor puede estar compuesto de cualquier material que sea adecuado para contener cultivos de células de mamífero suspendidas en medios en las condiciones de cultivo de la presente invención, incluyendo vidrio, plástico o metal. La expresión “biorreactor de producción” como se usa en el presente documento se refiere al biorreactor final usado en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen de un biorreactor de producción de cultivo celular a gran escala es generalmente mayor de 10 15 aproximadamente 100 ml, típicamente al menos aproximadamente 10 litros y puede ser de 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.0000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Un experto habitual en la técnica conocerá, y podrá seleccionar, biorreactores adecuados para usar en la realización práctica de la presente invención.

Las expresiones “densidad celular”, “concentración celular” o similares, como se usa en el presente documento, se refieren a ese número, peso, masa, etc. de células presente en un volumen de medio determinado. Una “densidad celular pico” o similar se refiere al número máximo de células que puede alcanzarse en un volumen de medio determinado, y un “densidad celular pico deseada” o similar se refiere al número máximo de células que un profesional desea obtener (por ejemplo, dianas) en un volumen celular determinado. Las variaciones de dicho valor (o valores) diana serán claras para los expertos en la técnica, por ejemplo, un experto puede expresar un valor (o valores) diana en términos de masa celular deseada, y dicho valor (o valores) diana puede ser una o más unidades de medición apropiadas (por ejemplo, unidades pico deseadas de masa celular).

La expresión “viabilidad celular” como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir en un conjunto determinado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término como se usa en el presente documento también se refiere a esa parte de células que están vivas en un momento particular en relación al número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

30 Las expresiones “cultivo” y “cultivo celular” como se usan en el presente documento se refieren a una población de células que se suspende en un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o crecimiento de la población de células. Como se usa en el presente documento, estos términos pueden referirse a la combinación que comprende la población de células (por ejemplo, el cultivo de células animales) y el medio en el que se suspende la población.

35 La expresión “densidad celular viable integrada” o “CVI” como se usa en el presente documento se refiere a la densidad promedio de células viables durante el transcurso del cultivo multiplicada por la cantidad de tiempo que tarda en desarrollarse el cultivo. Suponiendo que la cantidad producida de polipéptido y/o de proteína es proporcional al número de células viables presentes durante el transcurso del cultivo, la densidad celular viable integrada es una herramienta útil para estimar la cantidad de polipéptido y/o de proteína producidos durante el 40 transcurso del cultivo.

Las expresiones “medio”, “medio de cultivo celular” y “medio de cultivo” como se usan en el presente documento se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren el crecimiento del animal, por ejemplo, células de mamífero. Típicamente, estas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos, necesarios para el crecimiento mínimo y/o la supervivencia de la célula. La solución también puede contener componentes que potencien el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluyendo hormonas y factores de crecimiento. Preferentemente la solución se formula a un pH y a una concentración salina óptimos para la supervivencia y proliferación de las células. En una realización, el medio es un medio definido. Los medios definidos son medios en los que todos los componentes tienen una estructura química conocida. En otra realización de la invención, el medio puede contener uno o más aminoácidos derivados de cualquier fuente o procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, uno o más aminoácidos derivados bien de la adición o (adiciones) de un solo aminoácido o de la adición o (adiciones) de un hidrolizado de proteínas o peptona (incluyendo una o más fuentes de animales o vegetales).

El término “siembra” como se usa en el presente documento se refiere al proceso de proporcionar un cultivo celular a un biorreactor u otro recipiente. Las células pueden haberse propagado previamente en otro biorreactor o recipiente. Como alternativa, las células pueden haberse congelado y descongelado antes, por ejemplo, inmediatamente antes, de proporcionarlas al recipiente o biorreactor. El término se refiere a cualquier número de células, incluyendo una sola célula.

El término “título” como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de polipéptido de interés producida por un cultivo celular animal, dividido entre una cantidad determinada de volumen de medio; por tanto

“título” se refiere a una concentración. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de polipéptido por mililitro de medio.

Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” incluye una proteína que comprende al menos uno, y típicamente dos, dominios VH o partes de los mismos, y/o al menos uno, y típicamente dos, dominios VL o partes de los mismos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están interconectadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro. Los anticuerpos, o una parte de los mismos, pueden obtenerse a partir de cualquier origen, incluyendo, pero sin limitación, roedor, primate (por ejemplo, primate humano o no humano), camélido, etc. o pueden producirse de manera recombinante, por ejemplo, quimérico, humanizado y/o generado *in vitro*, por ejemplo, por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb, que consta de un dominio VH; (vi) un dominio variable de cadena pesada de camélido o camelizado (VHH); (vii) un Fv monocatenario (Fvmc; véase más adelante); (viii) un anticuerpo biespecífico; y (ix) uno o más fragmentos de una molécula de inmunoglobulina fusionada con una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, éstos pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que los permita constituirse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (Fvmc)); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242:423-26; Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5879-83). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén incluidos en la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos pueden obtenerse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y la función de los fragmentos se evalúa de la misma manera que la de los anticuerpos intactos.

El “fragmento de unión a antígeno” puede, opcionalmente, incluir además un residuo que potencie uno o más de, por ejemplo, estabilidad, función celular efectora o fijación del complemento. Por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede incluir adicionalmente un residuo pegilado, albúmina o una región constante de cadena pesada y/o ligera.

A excepción de los anticuerpos “biespecíficos” o “bifuncionales”, se entiende que cada uno de los sitios de unión de un anticuerpo es idéntico. Un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-21; Kostelny y col. (1992) *J. Immunol.* 148: 1547-53.

La frase “proteína” o “producto de proteína” se refiere a una o más cadenas de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, el término “proteína” es sinónimo de “polipéptido” y, como generalmente se entiende en la técnica, se refiere a al menos una cadena de aminoácidos unida mediante enlaces peptídicos secuenciales. En determinadas realizaciones, una “proteína de interés” o un “polipéptido de interés” es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógena que se ha transformado en una célula hospedadora. En determinadas realizaciones, cuando la “proteína de interés” está codificada por un ADN exógeno con el que la célula hospedadora se ha transformado, la secuencia de ácido nucleico del ADN exógeno determina la secuencia de aminoácidos. En determinadas realizaciones, una “proteína de interés” es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es endógena a la célula hospedadora. En determinadas realizaciones, la expresión de dicha proteína endógena de interés se altera transfectando una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico exógena que puede, por ejemplo, contener una o más secuencias reguladoras y/o codificar una proteína que potencie la expresión de la proteína de interés. Los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden usarse para producir cualquier proteína de interés, incluyendo, pero sin limitación, proteínas que tienen propiedades farmacéuticas, de diagnóstico, agrícolas y/o cualquiera de una diversidad de otras propiedades que son útiles en aplicaciones comerciales, experimentales y/u otras. Además, una proteína de interés puede ser una proteína terapéutica. En particular, una proteína terapéutica es una proteína que tiene un efecto biológico en una región en el organismo en la cual actúa o en una región del organismo en la cual actúa remotamente mediante productos intermedios. Ejemplos de productos terapéuticos de proteína se analizan con más detalle más adelante. En determinadas realizaciones, las proteínas producidas usando los procedimientos y/o las composiciones de la presente invención pueden procesarse y/o modificarse. Por ejemplo, una proteína para producirse de acuerdo con la presente invención puede estar glucosilada.

La presente invención puede usarse para cultivar células para la producción ventajosa de cualquier proteína terapéutica, tal como enzimas, receptores, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales), proteínas de fusión Fc, citocinas, hormonas, factores reguladores, factores de crecimiento, factores de coagulación/coagulantes, agentes de unión a antígeno, etc., farmacéutica o comercialmente relevantes. Un experto

habitual en la técnica será consciente de que pueden producirse otras proteínas de acuerdo con la presente invención, y podrán usar los procedimientos desvelados en el presente documento para producir dichas proteínas.

Construcciones de expresión y generación de células hospedadoras recombinantes

5 La presente invención usa células hospedadoras recombinantes, por ejemplo, células hospedadoras procariotas o eucariotas, es decir, células transfectadas con una construcción de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés. La frase "células animales" incluye células de invertebrados, de vertebrados no mamíferos (por ejemplo, aves, reptiles y anfibios), y de mamíferos. Como ejemplos no limitantes de células de invertebrados se incluyen las siguientes células de insecto: *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori* (gusano de seda / polilla de seda).

10 Diversas líneas celulares de mamíferos son células hospedadoras adecuadas para la expresión recombinante de polipéptidos de interés. Las líneas celulares hospedadoras de mamíferos incluyen, por ejemplo, células COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, células L, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDPC-1, PC12, M1x, mielomas murinos (por ejemplo, SP2/0 y NS0) y C2C12, así como líneas celulares de primate transformadas, hibridomas, células diploides normales y cepas celulares derivadas de cultivos *in vitro* de tejido primario y de explantes primarios. Cualquier célula eucariota que sea capaz de expresar el polipéptido de interés puede usarse en los procedimientos del diseño de medios desvelados. Las numerosas líneas celulares se encuentran disponibles de fuentes comerciales tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). En una realización de la invención, el cultivo celular, por ejemplo, el cultivo celular a gran escala, emplea células de hibridoma. La construcción de células de hibridoma productoras de anticuerpos es muy conocida en la técnica. En una realización de la invención, el cultivo celular, por ejemplo, el cultivo celular a gran escala, emplea células CHO.

25 Como alternativa, puede ser posible producir de manera recombinante polipéptidos de interés en eucariotas inferiores tales como levaduras, o en procariotas tales como bacterias. Las cepas de levadura adecuadas incluyen cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar el polipéptido de interés. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar el polipéptido de interés. La expresión en bacterias puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Por tanto, para producir material activo o más activo, puede ser necesario el replegamiento de la proteína recombinante. En la técnica se conocen diversos procedimientos para obtener proteínas heterólogas correctamente plegadas a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos procedimientos generalmente implican solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión y después desnaturalizar completamente la proteína usando un agente caotrópico. Cuando en la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína existen restos de cisteína, a menudo es necesario realizar el replegamiento en un entorno que permita la formación correcta de enlaces disulfuro (un sistema redox). Los procedimientos generales de replegamiento se desvelan en Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185: 187-95, en el documento EP 0433225, y en la Patente de Estados Unidos N° 5.399.677.

40 La presente invención usa construcciones, en forma de plásmidos, vectores y casetes de transcripción o expresión, que comprenden al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés. Los vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" o "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmido. En la presente memoria descriptiva, un "plásmido" y un "vector" puede usarse indistintamente dado que el plásmido es la forma de vector más común. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que realizan funciones equivalentes, incluyendo, pero sin limitación, vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, alfavirus modificados, adenovirus y adenovirus asociados).

50 Las construcciones que son adecuadas para la expresión de proteínas en células animales son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar unidos operativamente a una secuencia de control de expresión, tales como las presentes en los vectores de expresión pMT2 o pED desvelados, por ejemplo, en Kaufman y col. (1991) Nuc. Acids Res. 19: 4485-90. Otras secuencias de control de expresión adecuadas se encuentran en vectores conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación: HaloTag™ pHT2, pACT, pBIND, pCAT®3, pCI, pHrg, pHRL (Promega, Madison, WI); pcDNA3.1, pcDNA3.1-E, pcDNA4/HisMAX, pcDNA4/His-MAX-E, pcDNA3.1/Hygro, pcDNA3.1/Zeo, pZeoSV2, pRc/CMV2, pBudCE4 pRc/RSV (Invitrogen, Carlsbad, CA); Vectores pCMV-3Tag, Vector pCMV-Script® , Vectores pCMV-Tag, Vectores pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA); pDNR-Dual, pDNR-CMV (Clontech, Palo Alto, CA); y pSMEDA (Wyeth, Madison, WI). También se conocen procedimientos generales de expresión de proteínas recombinantes, y se ilustran, por ejemplo, en Kaufman (1990) Meth. Enzymol. 185: 537-66.

Como se define en el presente documento "unido operativamente" significa ligado enzimática o químicamente para formar un enlace covalente entre el polinucleótido a expresar y la secuencia de control de expresión de una manera que la célula hospedadora transfectada exprese la proteína codificada.

Las construcciones de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias reguladoras (por ejemplo, secuencias que regulan cualquier vector de replicación (por ejemplo, orígenes de replicación, transcripción de secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido (o péptido) de interés) o expresión del polipéptido codificado), secuencias etiqueta, tales como histidina y genes marcadores de selección. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y cualquier otro elemento de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación, sitios de corte y empalme de la transcripción) que controlan la transcripción, replicación o traducción. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los expertos en la técnica reconocerán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, dependerá de diversos factores, incluyendo la elección de la célula hospedadora y el nivel de expresión de la proteína que se desea. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de proteínas en células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína, tales como promotores y/o potenciadores derivados del promotor FF-1a y BGH poli A, citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, el promotor/potenciador de CMV), el virus 40 de Simio (SV40) (por ejemplo, el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor principal tardío de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Los elementos reguladores virales y secuencias de los mismos, se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.168.062; 4.510.245; y 4.968.615.

Pueden seleccionarse o construirse vectores adecuados, que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo, secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. En el procedimiento desvelado también puede usarse la expresión de proteínas inducibles, conseguida usando vectores con secuencias promotoras inducibles, tales como los vectores inducibles por tetraciclina, por ejemplo, pTet-On™ y pTet-Off™ (Clontech, Palo Alto, CA). Para más detalles con respecto a vectores de expresión, véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2ª ed.) eds. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células, expresión génica y análisis de proteínas, también se describen con detalle en Current Protocols in Molecular Biology (2ª ed.) eds. Ausubel y col., Wiley & Sons, Alameda, CA (1992).

Un polinucleótido insertado en una construcción de expresión para producir un polipéptido de interés puede codificar cualquier polipéptido que sea capaz de expresarse en la célula hospedadora usada en el cultivo celular. Por tanto, el polinucleótido puede codificar productos génicos de longitud completa, partes de genes de longitud completa, péptidos o proteínas de fusión. Dichos polinucleótidos pueden consistir en ADN genómico o ADNc y pueden proceder de cualquier animal. Los polinucleótidos pueden aislarse de células o de organismos mediante procedimientos bien conocidos en la materia, por ejemplo, PCR o RT-PCR, o pueden producirse mediante procedimientos convencionales de síntesis química. Dichos polinucleótidos químicamente sintéticos pueden poseer propiedades biológicas en común con polinucleótidos naturales, y por tanto pueden emplearse como sustitutos de polinucleótidos naturales.

Los polipéptidos también pueden producirse de manera recombinante uniendo operativamente el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés con secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, tales como vectores de baculovirus y empleando un sistema de expresión de células de insecto. Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus/Sf9 se encuentran disponibles en el comercio en forma de kit (por ejemplo, el kit MAXBAC®, Invitrogen, Carlsbad, CA).

La transfección de células hospedadoras, por ejemplo, células de animales, con la construcción de expresión puede realizarse mediante numerosos procedimientos bien conocidos en la técnica. Las células pueden transfectarse de manera transitoria o transfectarse de manera estable. Existen diversos procedimientos diferentes bien establecidos para suministrar moléculas, particularmente ácidos nucleicos, a células hospedadoras, por ejemplo, células animales. Dependiendo del tipo celular, de la transcripción deseada (es decir, transitoria o estable), y de los requisitos experimentales específicos, tales como transfección de líneas celulares dificultosas o células primarias, el tipo de molécula transfectada (ADN genómico, ADN, oligonucleótidos), o la construcción de expresión seleccionada, cada uno de estos procedimientos de transferencia poseen ventajas y desventajas conocidas por los expertos en la técnica. Los procedimientos de transcripción comunes incluyen, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada con liposomas, transfección mediada con DEAE dextrano, pistolas génicas, electroporación, suministro de nanopartículas, poliaminas, episomas, y polietileniminas. Además, en el comercio se encuentran disponibles numerosos kits de transfección y reactivos de compañías tales como Invitrogen (VOYAGER™, LIPOFECTIN®), EMD Biosciences, San Diego, CA (GENEJUICE™), Qiagen, Germantown, MD (SUPERFECT™), Orbigen, San Diego, CA (SAPPHIRE™), y muchas otras conocidas por los expertos en la técnica. También pueden encontrarse protocolos de transfección en Basic Methods in Molecular Biology (2ª ed.) eds. Davis y col., Appleton y Lange, CT (1994).

La presente invención usa cultivos celulares, por ejemplo, cultivos celulares animales a gran escala, para producir grandes cantidades del polipéptido de interés. Los procedimientos de transfección transitoria a gran escala se desvelan en Large-scale Mammalian Cell Culture Technology (Biotechnology and Bioprocessing Series) ed. Lubiniecki, Marcel Dekker, NY (1990); Kunaparaju y col. (2005) Biotechnol. Bioeng. 91:670-77; Maiorella y col.

(1988) *Bio/Technology* 6:1406-10; Baldi y col., citado anteriormente; Lan Pham y col., citado anteriormente; Meissner y col., citado anteriormente; Durocher y col., citado anteriormente). En general, la expresión génica transitoria a gran escala en cultivos de células de mamíferos pueden emplear uno cualquiera de los diversos tipos comunes de modos de transfección, por ejemplo, polietilenimina, pulso de campo eléctrico, CALFECTION™ o fosfato de calcio, para conseguir una alta eficiencia de transfección a escalas o volúmenes deseados, por ejemplo, más de 10 litros (Derouazi y col., citado anteriormente; Rols y col. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206(1): 115-21; Wurm y Bernard (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10(2): 156-59; Schlaeger y Christensen (1999) *Cytotechnology* 30(1-3):71-83; Jordan y col. (1998) *Cytotechnology* 26(1): 39-47; Lindell y col. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* 1676(2): 155-61). Estos cultivos a gran escala crecen generalmente en biorreactores, agitadores o incubadoras con placas agitadoras y también pueden conocerse como cultivos “con agitación centrífuga” o “en suspensión”. Por tanto, en oposición a las transfecciones tradicionales, en las que las células se unen a placas o matraces, los procedimientos desvelados generalmente usan cultivos en suspensión. Los cultivos celulares a gran escala se consideran generalmente que son cultivos celulares que tienen un volumen mayor de aproximadamente 100 ml.

En algunos casos, las líneas celulares que expresan el polipéptido de interés pueden producirse primero y después usarse para sembrar un cultivo celular a gran escala. Las líneas celulares estables que expresan una proteína de interés pueden producirse mediante diversos procedimientos bien conocidos, incluyendo los procedimientos usados para la transfección transitoria desvelados en el presente documento. En general, se producen líneas celulares estables mediante el cultivo prolongado y la selección en un medio químicamente definido. Por ejemplo, las células transfectadas (por ejemplo, mediante precipitación con fosfato de calcio o transfección liposomal) con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés pueden transfectarse simultáneamente con un vector que lleve un gen de resistencia a neomicina, que confiere resistencia a neomicina/geneticina (G418). Las células transfectadas se cultivan después en medios que contienen G418, y las células supervivientes se expanden clonalmente para producir una línea celular que se expresa de manera estable. Después pueden usarse alícuotas de esta línea celular para sembrar un cultivo a gran escala y producir grandes de la proteína de interés.

La transfección de células requiere la optimización de diversas variables, incluyendo la densidad de la siembra celular (por ejemplo, de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 3×10^6 células/ml de cultivo), la concentración de suero (por ejemplo, 0-10 %), la temperatura de incubación (por ejemplo, aproximadamente 20-38 °C), el vehículo o reactivo de transfección (químico o eléctrico), el volumen del cultivo (por ejemplo, aproximadamente 5 ml-20 litros) y el tiempo de incubación (por ejemplo, aproximadamente 24-144 horas). Para cada tipo de célula, variarán los parámetros óptimos. Sin embargo, los proveedores comerciales generalmente proporcionan orientaciones de optimización para transfectar tipos de células particulares, como lo hacen diversas referencias conocidas por los expertos en la técnica que utilizan la transfección de la célula hospedadora seleccionada. Estas fuentes pueden usarse para dirigir la transfección de la célula hospedadora seleccionada, o pueden usarse como un punto de partida a partir del cual puede usarse un procedimiento simple de prueba y error para proporcionar parámetros de transfección óptimos.

Cultivo celular

Los procedimientos típicos para la producción de un polipéptido de interés incluyen cultivos discontinuos y cultivos semicontinuos. Los procesos de cultivo discontinuos comprende tradicionalmente inocular un cultivo de producción a gran escala con un cultivo sembrado de una densidad celular particular, cultivar las células en condiciones conductoras para el cultivo y la viabilidad celular, recoger el cultivo cuando las células alcanzan una densidad celular específica, y purificar el polipéptido expresado. Los procesos de cultivo semicontinuos incluyen una o más etapas adicionales de complementación del cultivo discontinuo con nutrientes y otros componentes que se consumen durante el crecimiento de las células. Un experto habitual en la técnica reconocerá que la presente invención puede emplearse en cualquier sistema en el que se cultiven las células incluyendo, pero sin limitación, sistemas discontinuos, semicontinuos y en perfusión. En determinadas realizaciones preferidas de la presente invención, las células crecen en sistemas semicontinuos.

Un problema persistente y sin resolver con los cultivos tradicionales, por ejemplo, cultivos discontinuos y semicontinuos, es la producción de productos residuales metabólicos, que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento y viabilidad de las células, y sobre la producción de los polipéptidos expresados. Dos productos residuales metabólicos que tienen efectos particularmente perjudiciales son el lactato y el amoniaco, que se producen como resultado del metabolismo de la glucosa y de la glutamina, respectivamente. Además de la producción enzimática del amoniaco como resultado del metabolismo de la glutamina, el amoniaco también se acumuló en los cultivos celulares como resultado de una degradación no metabólica a largo del tiempo.

Las formulaciones de medios tradicionales, incluyendo medios disponibles en el comercio, tales como medio de Ham F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma), contienen niveles relativamente altos de glucosa y glutamina (la última en comparación con otros aminoácidos). Anteriormente, se pensaba que estos componentes eran necesarios en abundancia dado que son fuentes de energía metabólica primaria para las células. Sin embargo, el consumo rápido de estos nutrientes conduce a la acumulación de lactato y amoniaco como se ha descrito anteriormente. Además, niveles iniciales altos de glucosa y glutamina, y la posterior acumulación de lactato y amoniaco, producen una alta osmolaridad, una condición que por sí misma es a menudo perjudicial para el crecimiento celular, la viabilidad celular

y la producción de polipéptidos. El medio diseñado racionalmente, desvelado en el presente documento, puede modificarse para disminuir la acumulación de productos metabólicos dañinos. Dichas modificaciones pueden encontrarse, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2005/0070013 (suministro limitado de glucosa) y 2006/0121568 (modificaciones del contenido y proporciones de aminoácidos).

5 Diseño y formulaciones de medios racionales

Las formulaciones de los medios tradicionales comienzan con un nivel relativamente bajo de aminoácidos totales en comparación con las formulaciones de los medios de la presente invención. Por ejemplo, el medio DME-F12 (una mezcla al 50:50 de Medio Eagle Modificado por Dulbecco y medio de Ham F12) tiene un contenido total de aminoácidos de 7,29 mM, y el medio de cultivo celular tradicional conocido como RPMI-1640 tiene un contenido total de aminoácidos de 6,44 mM (véase, por ejemplo, Morton (1970) *In Vitro* 6: 89-108; Ham (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 53:288-93; Moore y col. (1967) J. Am. Medical Assn. 199: 519-24). Las formulaciones de medios más recientes (tales como los medios desvelados en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2006/0121568) contiene niveles más altos de aminoácidos y nutrientes. Sin embargo, las formulaciones tradicionales no están basadas en requisitos celulares calculados reales, que incluyen crecimiento celular, mantenimiento celular y, para cultivos celulares usados para producir polipéptidos recombinantes, los requisitos de producción. Usando estas variables, en el presente documento se proporcionan procedimientos para determinar formulaciones de medios con concentraciones mucho más altas e incluso no tóxicas, de aminoácidos totales.

Las formulaciones de medios de cultivo celular, por ejemplo, formulaciones de medios de cultivo celular a gran escala, descritas en el presente documento, cuando se usan de acuerdo con, por ejemplo, otras etapas de cultivo descritas en el presente documento, y con, por ejemplo, modificaciones tales como las encontradas en, por ejemplo, la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2006/0121568, optimizan la densidad celular y el título del polipéptido. Una concentración de aminoácidos de las formulaciones de los medios descritas en el presente documento se basa en la concentración del aminoácido (aminoácidos) necesaria para: 1) masa celular; 2) mantenimiento celular; y 3) producción del polipéptido. En una realización de la divulgación, un medio de cultivo celular contiene una concentración del aminoácido (aminoácidos) que se calcula para su uso en masa celular, una concentración del aminoácido (aminoácidos) que se calcula para su uso en el mantenimiento celular, y una concentración de aminoácido (aminoácidos) que se calcula para su incorporación en el polipéptido de interés. En otra realización de la divulgación, un medio de cultivo celular contiene una concentración, A, de un aminoácido que se representa por la fórmula $A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$, en la que X es la concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, P es la concentración del aminoácido que se usa para su incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título del polipéptido, M es el multiplicador para la masa celular deseada (es decir, las unidades pico deseadas de masa celular), N es el multiplicador para la concentración deseada del polipéptido de interés (es decir, el título deseado o diana del polipéptido), Y es el factor de mantenimiento celular; y F es el factor inicial.

La concentración, P, del aminoácido que se usa para su incorporación en el polipéptido de interés por unidad de título del polipéptido en las fórmulas anteriores se basa en la estructura primaria de la proteína recombinante, es decir, el contenido de aminoácidos del polipéptido. Por tanto, P variará en función del polipéptido de interés que vaya a producirse en el cultivo celular a gran escala. P puede después convertirse en el requisito para la concentración diana de aminoácidos del polipéptido de interés usando N, el multiplicador para la concentración deseada del polipéptido de interés (es decir, el título o la diana deseados del polipéptido). En algunos ejemplos representativos de la divulgación, indicados más adelante, la unidad básica del título del polipéptido es de 1 g /l. En la Tabla 1, indicada a continuación, que contiene un cálculo representativo usando las fórmulas proporcionadas en el presente documento, la concentración de aminoácidos del medio de cultivo celular que se necesita para el polipéptido de interés a un título de 10 g/l (columna 4) se determina multiplicando la concentración, P, del aminoácido que se necesita para 1 g/l (columna 2) por el multiplicador, N, donde N=10.

Tabla 1: Determinación representativa de la concentración de aminoácidos inicial ajustada necesaria para un título diana de 10 g/l de anticuerpo a una masa celular deseada, en la que la masa celular deseada se representa por una densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml

1	2 (P)	3 (X)	4 (P x N)	5 (X x M)	6(X x M x Y)	7	8 (A) (Columna 7 x F)
Aminoácido (AA)	Concentración de AA necesaria para un título de anticuerpo inicial de 1 g/l	Concentración de AA necesaria para una masa celular representada por una densidad celular de 10^6 células/ml	Concentración de AA total necesaria para un título de anticuerpo diana de 10 g/l (N=10)	Concentración de AA total necesaria para una densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml (M=15)	Concentración de AA total necesaria para un mantenimiento celular (Y=100 %) o (Y=1)	Concentración de AA total calculada necesaria para un título de anticuerpo diana y densidad celular de pico deseada (Columna 4+5+6)	Concentración de AA inicial ajustada necesaria para un título de anticuerpo diana y densidad celular pico deseada (F=1,3)
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	Columna 7 x 1,3
ALA	0,41	0,30	4,08	4,56	4,56	13,20	17,17
ARG	0,17	0,16	1,73	2,38	2,38	6,50	8,45
ASN	0,26	0,15	2,62	2,23	2,23	7,08	9,21
ASP	0,29	0,29	2,87	4,36	4,36	11,59	15,07
CYS	0,19	0,09	1,88	1,42	1,42	4,73	6,14
GLU	0,40	0,16	4,00	2,33	2,33	8,67	11,26
GLN	0,39	0,29	3,87	4,40	4,40	12,67	16,47
GLY	0,47	0,25	4,72	3,80	3,80	12,33	16,02
HIS	0,16	0,07	1,59	1,07	1,07	3,72	4,83
ILE	0,14	0,16	1,43	2,33	2,33	6,10	7,93
LEU	0,49	0,25	4,88	3,80	3,80	12,49	16,24
LYS	0,52	0,24	5,20	3,55	3,55	12,31	16,00
MET	0,10	0,06	0,97	0,86	0,86	2,69	3,50
PHE	0,23	0,12	2,34	1,78	1,78	5,89	7,65
PRO	0,59	0,16	5,94	2,33	2,33	10,61	13,79
SER	0,97	0,34	9,73	5,11	5,11	19,96	25,94
THR	0,68	0,20	6,80	3,04	3,04	12,88	16,75
TRP	0,16	0,04	1,64	0,56	0,56	2,75	3,58
TYR	0,35	0,12	3,48	1,78	1,78	7,03	9,14
VAL	0,74	0,23	7,36	3,50	3,50	14,36	18,67
Total (mM)	7,71	3,68	77,13	55,21	55,21	187,55	243,82

El multiplicador N puede calcularse, por ejemplo, multiplicando la densidad celular viable integrada (CVI) por la productividad específica (pe) de una línea celular particular ($N=CVI \cdot pe$). Por ejemplo, si la densidad sembrada de una línea celular particular es $0,8 \times 10^6$ células/ml, la densidad celular el día 6 y el día 10 es 15×10^6 células/ml, y la densidad celular el día 18 es 11×10^6 células/ml (es decir, 73 % del valor los días 6 y 15), por tanto la $CVI=211 \times 10^6$ (células/ml)*día (es decir, $[0,8+15]/2+6$ días + $[(15+15)/2+4$ días + $[(15+11)/2]*8$ días). Si la productividad específica (pe) promedio de la línea celular seleccionada es, por ejemplo, $47 \mu\text{g}/10^6$ células/día, entonces $N=10 \text{ g/l}$ el día 18 (es decir, 211×10^6 (células/ml)*día x $47 \mu\text{g}/10^6$ células/día). Un experto en la técnica se dará cuenta que estos cálculos pueden realizarse con cualquier línea celular, o de que N puede calcularse en función de las características y origen de la célula. Como alternativa, el multiplicador N no necesita calcularse a partir de la CVI y pe, y puede ser simplemente un título diana razonable para un cultivo celular particular. Un ejemplo profético, que describe el cálculo de CVI y pe, y la selección adicional de valores N y M razonables, se proporciona como Ejemplo 5 (más adelante).

Como se usa en el presente documento, "masa celular", "densidad celular", y similar, se refiere a un conjunto de células. Por ejemplo, una masa celular puede hacer referencia a un sedimento celular. Como se usa en el presente documento, "masa celular deseada" y similar se refiere a un conjunto de células, por ejemplo, un sedimento celular, que un facultativo desee obtener en un cultivo celular. Como se usa en el presente documento, "unidad de masa celular" y similar refleja una número de formas de representar la masa celular, por ejemplo, número celular, densidad celular, volumen celular, volumen celular envasado, peso celular seco, etc. Un experto en la técnica sabrá cuál es la forma más conveniente o apropiada de representar una unidad de masa celular, etc., para una condición experimental particular. Un experto en la técnica también entenderá que, dependiendo de la unidad de masa celular, M, el multiplicador para la masa deseada, es decir, las unidades pico deseadas de masa celular, se representará por cualquiera de números de células pico deseadas, densidad celular pico deseada, volumen celular pico deseado, volumen celular envasado pico deseado, peso seco pico deseado, etc.

En una realización de la divulgación, la unidad de masa celular se representa por densidad celular y la masa de densidad celular deseada se representa por densidad celular pico deseada. En otra realización, la unidad de masa celular se representa por peso o masa celular en seco. La masa celular deshidratada consiste esencialmente en todas las proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos presentes en la masa celular. Por tanto, la concentración, X, de un aminoácido puede determinarse experimentalmente, centrifugando primero un número de células conocido en un sedimento celular, secando el sedimento celular, y posteriormente exponiendo el sedimento seco a hidrólisis ácida, mediante lo cual se realiza la lisis de las proteínas celulares del sedimento celular a aminoácidos individuales, que después puede cuantificarse con un analizador de aminoácidos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). Esto proporciona la concentración de aminoácidos, X, de un número determinado de células, que después puede convertirse al requisito de aminoácidos para la densidad celular pico deseada usando M, el multiplicador para la densidad celular pico deseada. En la Tabla 1, la concentración total de aminoácidos del medio de cultivo celular que se necesita para la densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml (columna 5) se determina multiplicando la concentración, X, del aminoácido necesaria para 10^6 células/ml (columna 3) por el multiplicador, M, donde $M=15$. Por tanto, en algunos ejemplos representativos de la divulgación, la unidad de masa celular es 10^6 células/ml. Como alternativa, por ejemplo, para un aminoácido que se sabe que es susceptible a degradación, la concentración, X, del aminoácido que se usa en las fórmulas anteriores puede determinarse a partir de valores bibliográficos, por ejemplo, Nyberg y col. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 62: 324-35; Nadeau y col. (2000) *Metab. Eng.* 2: 277-92; y Bonarius (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 50: 299-318, o de los procedimientos desvelados en dichas publicaciones o en publicaciones similares conocidas en la técnica.

Cuando el multiplicador M para la masa celular deseada se representa por una densidad celular pico deseada, M puede seleccionarse, por ejemplo, como la densidad pico de una línea celular particular, por la densidad a la cual la productividad de la línea celular se maximiza, o por la densidad prevista para la línea celular en un periodo de tiempo particular en función de la tasa de crecimiento específica.

La concentración de aminoácidos del medio de cultivo celular que se requiere para el mantenimiento celular, Y, es un porcentaje de la concentración de aminoácidos necesaria para la masa celular deseada, por ejemplo, densidad celular pico deseada. En una realización de la divulgación, el requisito de mantenimiento varía del 0 % al 300 % del requisito de masa celular deseado, que proporciona suficientes nutrientes para el uso de las células sin riesgo de toxicidad inducida por nutrientes. En otra realización de la divulgación, el requisito de mantenimiento varía del 0 % al 150 % del requisito de masa celular deseada, que proporciona suficientes nutrientes para el uso de las células sin riesgo de toxicidad inducida por nutrientes. El requisito de mantenimiento aumenta a medida que aumenta la duración del cultivo (por ejemplo, un mantenimiento de 100-150 % durante un cultivo de 21 días). En la **Tabla 1**, la concentración de aminoácidos de medio de cultivo celular que se requiere para el mantenimiento celular (columna 6) se determina multiplicando la concentración de aminoácidos necesaria para la densidad celular pico deseada (columna 5) por el factor de mantenimiento celular, Y, que en este ejemplo representativo es del 100 %, para permitir un periodo de cultivo prolongado. El factor de mantenimiento, Y, diferirá en células diferentes (y en líneas celulares diferentes) dependiendo de las demandas metabólicas exclusivas de las células en cultivo. Además, los requisitos de mantenimiento para las células en cultivo también diferirán debido a la variabilidad en los procesos, por ejemplo, densidad de inoculación, duración de cultivo, tiempo de cambio de temperatura, etc. Como una orientación inicial, se puede proporcionar, por ejemplo, un mantenimiento de 0 % (diario) para cultivos los días 0 a 5, un mantenimiento de

3 % a 5 % (diario) para cultivos los días 6 a 10, y un mantenimiento de 7 % a 10 % (diario) para cultivos los días 11 a 21. Para un proceso de más de 21 días, pueden proporcionarse cultivos con un mantenimiento de 2 % a 5 % (diario) para aquellos días adicionales. Un experto habitual en la técnica se dará cuenta de que el ajuste del factor de mantenimiento, Y, para optimizar la densidad y el título, es exclusivamente una cuestión rutinaria de prueba y error.

5 El ajuste de la concentración de aminoácidos de acuerdo con el requisito de mantenimiento celular es importante para aumentar la viabilidad y la productividad del cultivo celular, y por tanto es un aspecto importante de la presente divulgación. Por ejemplo, el ajuste de la concentración de aminoácidos de acuerdo con el requisito de mantenimiento celular permite que el cultivo celular soporte mayor densidad celular, viabilidad celular y produzca un título de polipéptido más elevado (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6).

10 Una vez determinados los requisitos de los aminoácidos deseados de: 1) masa celular (columna 5); 2) mantenimiento celular (columna 6); y 3) producción de polipéptido para el título diana (columna 4), puede obtenerse la concentración de aminoácidos total calculada del cultivo celular diana. En la **Tabla 1**, la concentración de aminoácidos total calculada del medio de cultivo celular que se requiere para el cultivo celular diana (columna 7), se determina añadiendo la concentración de aminoácidos del medio de cultivo celular que se requiere para el polipéptido de interés a un título de 10 g/l (columna 4), la concentración de aminoácidos del medio de cultivo celular que se requiere para la densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml (columna 5) y la concentración de aminoácidos del medio de cultivo celular que se requiere para un nivel seleccionado de mantenimiento celular (columna 6).

20 Una vez calculada la concentración de aminoácidos total del medio de cultivo celular que se requiere para obtener el cultivo celular diana como se ha descrito anteriormente, el valor se ajusta a una concentración de aminoácidos del medio de cultivo deseada, A, mediante un factor inicial, F, que tiene en cuenta la fuerza impulsora de la amino transferencia, por ejemplo, los aminoácidos extra necesarios para transferir masa, los aminoácidos extra necesarios para dirigir el transporte a través de la membrana celular, etc. En el presente documento, este valor ajustado, A, se refiere a “la concentración de aminoácidos inicial ajustada” o “concentración optimizada”. La concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, representa la cantidad total acumulativa de uno o más aminoácidos que se suministrará al cultivo, expresada con respecto al volumen final del cultivo, que incluye el volumen del medio de partida, más el volumen de cualquier suministro para el cultivo (cultivos) en perfusión o semicontinuo. El ajuste de la concentración de aminoácidos total con la concentración de aminoácidos inicial ajustada es un aspecto importante de la divulgación porque permite obtener mayor viabilidad celular, densidad celular y título del polipéptidos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6).

30 El factor inicial, F, que aumenta la concentración de aminoácidos total calculada del medio de cultivo celular hasta un 200 %, varía de 1 (aumento de 0 %) a 3 (aumento de 200 %). En una realización de la divulgación, el intervalo de F es entre 1 y 1,5. En otra realización de la divulgación, un valor de F por debajo de 1 puede compensarse modificando la concentración de aminoácidos total calculada de medio de cultivo celular (Tabla 1, columna 7), lo cual puede realizarse modificando la concentración de aminoácidos requerida para la masa celular deseada, la concentración de aminoácidos requerida para el mantenimiento celular, y/o la concentración de aminoácidos requerida para su incorporación en el polipéptido de interés. Por ejemplo, un factor inicial de 0,5 puede compensarse aumentando la concentración de aminoácidos total calculada del medio de cultivo celular mediante, por ejemplo, un factor de dos (o más), lo cual puede realizarse modificando M, X, N, P y/o Y. En la **Tabla 1**, la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, del medio de cultivo celular que se requiere para el título diana y la densidad celular pico deseada (columna 8), se determina multiplicando la concentración de aminoácidos total calculada del medio de cultivo celular (columna 7) por el factor inicial, F, que en el ejemplo representativo de la **Tabla 1** es de 1,3 (correspondiente a un aumento del 30 % sobre la concentración de aminoácidos total calculada del medio de cultivo celular).

45 El medio que contiene la concentración inicial ajustada, A, de un aminoácido se denomina en el presente documento “medio de cultivo celular deseado”. Por tanto, el “medio de cultivo celular deseado” representa un medio objetivo que contiene la concentración inicial ajustada A. Este medio comprende al menos una concentración de aminoácidos determinada por la fórmula anterior. Preferentemente el medio de cultivo celular deseado contiene más de una concentración de aminoácidos determinada por la fórmula anterior. Más preferentemente, el medio de cultivo celular deseado contiene al menos doce concentraciones de aminoácidos ajustadas, por ejemplo, una concentración ajustada de arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina, determinada por la fórmula anterior. Un experto en la técnica entenderá que la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, en el medio de cultivo celular deseado puede conseguirse mediante diversos medios, incluyendo pero sin limitación, la adición individual de uno o más aminoácidos, la adición de peptona u otros hidrolizados de proteína, y/o añadiendo otro medio de cultivo celular concentrado (por ejemplo, un medio de cultivo celular de suministro (o mezcla de medio, por ejemplo, un medio en polvo)) a un medio de cultivo celular de partida (o mezcla de medio de cultivo celular de partida, por ejemplo, un medio en polvo). Un experto en la técnica entenderá que la adición de peptona (u otro hidrolizado de proteína) puede dirigirse por el contenido de aminoácidos del producto de elección de peptona particular, o determinando la concentración de aminoácidos proporcionada por una peptona particular, por ejemplo, en general, 5 g/l de peptona proporcionan una concentración de aminoácidos total de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 50 mM.

La concentración de aminoácidos deseada en el medio de cultivo celular se basa en al menos una concentración de

aminoácidos inicial ajustada, A, determinada por la fórmula de la invención desvelada en el presente documento; sin embargo, esta concentración, así como otras concentraciones de aminoácidos deseadas en el medio de cultivo celular, pueden modificarse de la concentración (concentraciones) de aminoácidos inicial ajustada debido a la influencia de diversos factores. Por ejemplo, durante el cultivo pueden producirse determinados aminoácidos y por lo tanto deben mantenerse a un nivel bajo. Basándose en valores publicados (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente publicada de Estados Unidos N° 2006/0121568) pueden variarse otros aminoácidos. Además, algunos aminoácidos, por ejemplo, la metionina, pueden consumirse a una velocidad mayor por tipos de células particulares, y por tanto debe añadirse en exceso. Incluso otros aminoácidos, tales como la prolina, proporcionan una fuerza impulsora para el crecimiento celular y la producción de polipéptidos (véase el Ejemplo 4), y estos aminoácidos deben proporcionarse, en algunos casos, a una mayor cantidad que la determinada mediante la fórmula anterior de la invención. Además, la concentración de aminoácidos inicial ajustada puede modificarse si se considera que la concentración obtenida usando la fórmula anterior es tóxica (por ejemplo, teniendo en cuenta los niveles de serina, tirosina, metionina y valina). Se encuentra dentro del conocimiento de un experto en la técnica, después de obtener la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de un aminoácido o más para su uso en el medio de cultivo celular deseado, variar la concentración de aminoácidos inicial ajustada basándose en factores tales como los indicados en el presente documento.

Pueden calcularse componentes de medios adicionales, por ejemplo, vitaminas, sales, glucosa, elementos, a partir de (o basándose en) diversas fuentes, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Publicadas de Estados Unidos Nos 2005/0070013 y 2006/0121568. Además, la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de un aminoácido obtenida usando la fórmula anterior puede modificarse para dar una proporción particular en relación con otro aminoácido (por ejemplo, la proporción de glutamina con respecto a asparagina) o encontrarse dentro de una concentración combinada deseada (por ejemplo, la concentración combinada de glutamina y asparagina). Por ejemplo, se sabe que un medio rico en asparagina, pobre en glutamina, combinado con cambios de temperatura, permite la captación de lactato, mediante lo cual se detoxifica un cultivo celular (Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2006/0121568). Por tanto, uno puede querer modificar la concentración inicial ajustada, A, de la glutamina y/o asparagina, para obtener una proporción óptima.

Se observará, a partir del ejemplo representativo de la Tabla 1 que la concentración combinada de las concentraciones de aminoácidos iniciales ajustadas para su uso en el medio de cultivo celular deseado es alta, es decir, más de 243 mM. Por tanto, en el presente documento se desvela el descubrimiento de que puede usarse una alta concentración de aminoácidos en un medio de cultivo celular deseado sin toxicidad o sin perjudicar al título si esta concentración se basa en los requisitos de aminoácidos calculados para una densidad celular y un título de polipéptido diana. En una realización de la invención, la concentración combinada de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado es entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 250 mM. En otras realizaciones, la concentración combinada de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado es mayor de aproximadamente 250 mM, por ejemplo, aproximadamente 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 o 510 mM o cualquier valor intermedio.

La concentración inicial ajustada A, identificada anteriormente, de un aminoácido que se usa en un medio de cultivo celular deseado, puede usarse en cultivos discontinuos, semicontinuos y en perfusión. Cuando se usa en un cultivo discontinuo, la concentración inicial del aminoácido usada en el medio de cultivo celular deseado es la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A. Cuando se usa en cultivos semicontinuos o en perfusión, la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, representa la cantidad total acumulativa de uno o más aminoácidos que se suministrará al cultivo, que incluye el volumen del medio de partida más el volumen de todos los suministros. Por tanto, para los cultivos semicontinuos, que usan suministros continuos (por ejemplo, suministros los días 3-21) o suministros periódicos (por ejemplo, suministros cada 2-3 días), en medio de partida se modifica para que contenga una concentración de partida del aminoácido, B, de acuerdo con la fórmula $B=[A-(Z*V)]/(1-V)$, en la que Z es la concentración del aminoácido en el medio de cultivo celular de suministro, y V es el volumen del medio de cultivo de suministro como una proporción del volumen del medio de cultivo celular deseado. Un ejemplo representativo de los cálculos que se requieren para obtener la concentración de aminoácidos de partida, B, se proporciona más adelante en la Tabla 2. En la Tabla 2, algunas concentraciones de aminoácidos iniciales ajustadas, A (columna 2) se convierten a la concentración de aminoácidos de los medios de partida, B (columna 5), basándose en un volumen de suministro del 17 % (V=17 %), y a la concentración de aminoácidos del medio de suministro, Z (columna 4). En este ejemplo, diversas concentraciones de aminoácidos iniciales ajustadas, A (columna 2) y concentraciones de aminoácidos de partida, B (columna 5) se modifican a los valores mostrados en negrita en las columnas 3 y 6. La modificación de las concentraciones de asparagina, ácido aspártico, glutamina y cisteína se basó en las concentraciones sugeridas en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2006/0121568; la metionina se ajustó al 50 % para compensar su consumo a una mayor cantidad que la esperada; la alanina, el ácido glutámico y la glicina se produjeron en los cultivos (y por tanto se mantuvieron a un nivel bajo); y las concentraciones de serina, tirosina y valina disminuyeron a niveles no tóxicos. Por lo tanto se entenderá que la concentración de aminoácidos de partida, B, puede basarse bien en la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, o en la concentración de aminoácidos inicial ajustada modificada.

Un experto en la técnica apreciará que el medio de suministro usado para obtener el medio de cultivo celular deseado durante un cultivo celular semicontinuo y en perfusión debe estar tan altamente concentrado como sea posible para impedir que se desborde del recipiente (por ejemplo, un biorreactor o un matraz agitador) en el que se

realiza el cultivo e impedir la dilución de los componentes del medio. En los ejemplos expuestos en la Tabla 2, se indica un medio de suministro preferido como "Medio de Suministro" y en la columna 4 se indican las concentraciones de aminoácidos, Z, del Medio de Suministro. Sin embargo, puede usarse cualquier medio de suministro altamente concentrado o cualquier procedimiento que proporcione aminoácidos altamente concentrados al medio de cultivo celular de partida, siempre que en el volumen diana se consiga la concentración de aminoácidos inicial ajustada deseada, A. Dichos procedimientos que proporcionan aminoácidos altamente concentrados a un cultivo celular se usan comúnmente y son muy conocidos por el experto en la técnica.

Un experto en la técnica entenderá que la concentración de partida de aminoácido, B, en el medio de cultivo celular de partida puede conseguirse mediante cualquiera de los diversos medios, incluyendo, pero sin limitación, la adición individual de uno o más aminoácidos, la adición de peptona y/u otro hidrolizado de proteína, y/o la adición de otro medio de cultivo concentrado (o mezcla de medio, por ejemplo, un medio en polvo) al medio de cultivo celular de partida (o una mezcla de medio de cultivo celular de partida, por ejemplo, un medio en polvo). Un experto en la técnica también entenderá que la concentración de aminoácido, Z, en el medio de cultivo celular de suministro puede conseguirse mediante cualquiera de los diversos medios, incluyendo, pero sin limitación, la adición individual de uno o más aminoácidos, la adición de peptona y/u otro hidrolizado de proteína, y/o la adición de otro medio de cultivo concentrado (o mezcla de medio, por ejemplo, un medio en polvo) al medio de cultivo celular de suministro (o mezcla de medio de cultivo celular de suministro, por ejemplo, un medio en polvo).

A partir del ejemplo representativo de la Tabla 2 se observará que la concentración combinada de aminoácidos para su uso en el medio de cultivo celular de partida es alta, es decir, más de 125 mM. Por tanto, en el presente documento se desvela el descubrimiento de que puede usarse una alta concentración de aminoácidos sin toxicidad o sin perjudicar el título en un medio de cultivo celular de partida si la concentración de aminoácidos de partida se basa en los requisitos de aminoácidos calculados para una densidad celular pico deseada y un título de polipéptido deseado. En una realización de la invención, la concentración combinada de aminoácidos es de entre aproximadamente 70 mM y aproximadamente 510 mM. En una realización de la invención, la concentración combinada de aminoácidos es de entre aproximadamente 120 mM y aproximadamente 350 mM. En otra realización de la invención, la concentración combinada de los aminoácidos en el medio de cultivo celular de partida es de entre aproximadamente 70 mM y aproximadamente 140 mM. En otra realización de la invención, la concentración combinada de aminoácidos en el medio de cultivo celular de partida es mayor de aproximadamente 140 mM.

Tabla 2. Determinación representativa de la concentración de aminoácidos de partida para un título diana A de 10 g/l de anticuerpo, una densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml y un suministro del 17 %

1	2 (A)	3	4 (Z)	5 (B)	6
Aminoácido (AA)	Concentración de AA inicial ajustada requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada	Modificación de la concentración de AA inicial ajustada requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada	Concentración de AA del medio de suministro	Concentración de AA de partida requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada (V=17 %)	Concentración de AA de partida modificada requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada
	mM	mM	mM	mM	mM
ALA	17,17	0,20	6,4	-1,07	0,2
ARG	8,45	8,45	35,13	2,99	2,99
ASN	9,21	24,00	56	17,45	17,45
ASP	15,07	1,70	16	-1,23	1,7
CYS	6,14	0,40	0	0,48	0,4
GLU	11,26	0,20	6,4	-1,07	0,2
GLN	16,47	4,00	0	4,82	4,2
GLY	16,02	4,00	6,4	3,51	3,51

(Continuación)

1	2 (A)	3	4 (Z)	5 (B)	6
Aminoácido (AA)	Concentración de AA inicial ajustada requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada	Modificación de la concentración de AA inicial ajustada requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada	Concentración de AA del medio de suministro	Concentración de AA de partida requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada (V=17 %)	Concentración de AA de partida modificada requerida para un título diana y una densidad celular pico deseada
	mM	mM	mM	mM	mM
HIS	4,83	4,83	11,2	3,53	3,53
ILE	7,93	7,93	28,82	3,65	3,65
LEU	16,24	16,24	41,53	11,06,	11,06
LYS	16,00	16,00	32	12,72	12,72
MET	3,50	5,25	12,8	3,71	3,71
PHE	7,65	7,65	16	5,94	5,94
PRO	13,79	13,79	19,2	12,68	12,68
SER	25,94	25,94	48,15	21,39	10,2
THR	16,75	16,75	25,6	14,94	14,94
TRP	3,58	3,58	5,11	3,27	3,27
TYR	9,14	9,14	12,75	8,40	5,2
VAL	18,67	18,67	25,6	17,25	10,2
Total (mM)	243,82		405,09		127,73

5 Como se muestra en la **Tabla 3A** y en la **Tabla 3B**, la determinación de la concentración de aminoácidos inicial ajustada de un aminoácido, A, usada en un medio de cultivo celular deseado, y la determinación de la concentración de aminoácidos de partida, B, usada en el medio de cultivo celular de partida, puede calcularse para cualquier título de polipéptido diana deseado y densidad celular (diana) pico deseada. La densidad celular pico deseada del cultivo a gran escala varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 40×10^6 células/ml para un cultivo semicontinuo. En una realización de la divulgación, la densidad celular pico deseada varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 20×10^6 células/ml. El título diana del cultivo a gran escala varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 25 g/l. En otra realización adicional de la divulgación, el título diana del cultivo a gran escala varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 g/l. Por ejemplo, en la Tabla 3, la densidad celular pico deseada varía de 10 a 15×10^6 células/ml, y el título diana varía de 3 a 10 g/l.

15 **Tabla 3A:** Ejemplos representativos de las concentraciones de aminoácidos iniciales ajustadas, A, para diversos títulos diana (como se representa mediante un multiplicador para el título del polipéptido diana, N) y densidades celulares deseadas (como se representa mediante un multiplicador para la densidad celular pico deseada, M).

A	N=10 M=15	N=5 M= 12,5	N=3 M=10
Concentración de aminoácidos	mM	mM	mM
ALA	17,2	12,5	9,50

(Continuación)

A	N=10 M=15	N=5 M= 12,5	N=3 M=10
Concentración de aminoácidos	mM	mM	mM
ARG	8,5	6,3	4,81
ASN	9,2	6,5	4,89
ASP	15,1	11,3	8,68
CYS	6,1	4,3	3,20
GLU	11,3	7,7	5,60
GLN	16,5	12,1	9,14
GLY	16,0	11,3	8,43
HIS	4,8	3,3	2,46
ILE	7,9	6,0	4,60
LEU	16,2	11,4	8,50
LYS	16,0	11,1	8,18
MET	3,5	2,5	1,87
PHE	7,7	5,4	3,99
PRO	13,8	8,9	6,36
SER	25,9	17,4	12,66
THR	16,8	11,0	7,93
TRP	3,6	2,3	1,61
TYR	9,1	6,1	4,43
VAL	18,7	12,4	8,94
Total	243,8	169,8	125,8

5 **Tabla 3B.** Ejemplos representativos de concentraciones de aminoácidos de medios de partida B, para diversos títulos diana (como se representa mediante un multiplicador para el título del polipéptido diana, N) y densidades celulares pico deseadas (como se representa por un multiplicador para una densidad celular pico deseada, M); las concentraciones de aminoácidos de los medios de partida se determinaron restando modificaciones del suministro y otras de las concentraciones de aminoácidos iniciales ajustadas

B	N=10 M=15	N=5 M= 12,5	N=3 M=10
Concentración de aminoácidos	mM	mM	mM
ALA	0,2	0,2	0,20
ARG	3,0	1,9	1,68
ASN	17,4	14,6	10,77

(Continuación)

B	N=10 M=15	N=5 M= 12,5	N=3 M=10
Concentración de aminoácidos	mM	mM	mM
ASP	1,7	1,7	1,70
CYS	0,4	0,4	0,40
GLU	0,2	0,2	0,20
GLN	4,0	4,0	4,00
GLY	3,5	3,6	3,75
HIS	3,5	2,2	1,56
ILE	3,6	2,5	2,10
LEU	11,1	6,9	5,09
LYS	12,7	7,9	5,73
MET	3,7	2,4	1,78
PHE	5,9	3,8	2,75
PRO	12,7	7,4	5,04
SER	10,2	10,2	9,00
THR	14,9	8,8	6,10
TRP	3,3	1,8	1,24
TYR	5,2	5,1	3,58
VAL	10,2	10,4	7,22
Total	127,5	95,9	73,89

Usando las fórmulas para la determinar la concentración (concentraciones) de aminoácidos inicial ajustada y desarrollar formulaciones de medios de cultivo celulares deseados para una producción de polipéptido a gran escala, los inventores han identificado diversos criterios que dan como resultado cultivos de alto título y alta densidad celular. Los criterios para producir un título mayor de 5 g/l, que se representan por los valores mostrados en la Tabla 4, incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: tirosina mayor que o igual a aproximadamente 3 mM; prolina entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM; valina entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM; leucina entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM; treonina entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM; lisina entre aproximadamente 7 mM y aproximadamente 30 mM; una concentración combinada de leucina, lisina, prolina, treonina y valina que es entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 150 mM; una concentración combinada de leucina, lisina, treonina y valina que es entre aproximadamente 60 % a aproximadamente 80 % de los aminoácidos esenciales totales en el medio de cultivo celular deseado; una concentración combinada de los aminoácidos esenciales en el medio de cultivo celular deseado que es entre aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 % de los aminoácidos totales en el medio de cultivo celular deseado; y/o una concentración combinada de aminoácidos totales entre aproximadamente 75 mM y aproximadamente 510 mM:

Tabla 4: Ejemplos representativos del contenido y relaciones de aminoácidos para los medios diseñados racionalmente para diversos títulos diana y densidades celulares pico deseadas (como se ha indicado anteriormente, la unidad básica de título de polipéptido es 1 g/l, y la unidad básica de masa celular es 10^6 células/ml).

ES 2 538 986 T3

Aminoácido	N=5 M=10 Y=0 F=1 (mM)	N=10 M=10 Y=2 F=1,3 (mM)	N=10 M=10 Y=1 F=1,3 (mM)	N=10 M=20 Y=1 F=1,3 (mM)	N=15 M=30 Y=1,5 F=1,3 (mM)
ALA	5,08	13,21	15,86	23,77	37,62
ARG	2,46	6,39	7,51	11,65	18,88
ASN	2,80	7,28	8,98	12,85	19,62
ASP	4,34	11,29	13,15	20,71	33,94
CYS	1,89	4,91	6,14	8,60	12,91
GLU	3,55	9,24	11,84	15,89	22,96
GLN	4,87	12,66	15,18	22,80	36,15
GLY	4,90	12,73	15,79	22,39	33,93
<i>HIS</i>	1,50	3,91	4,94	6,78	10,01
<i>ILE</i>	2,27	5,91	6,84	10,88	17,96
LEU	4,98	12,94	16,12	22,71	34,25
LYS	4,97	12,92	16,30	22,46	33,23
<i>MET</i>	1,06	2,76	3,39	4,88	7,50
PHE	2,35	6,11	7,63	10,71	16,09
PRO	4,53	11,77	15,63	19,67	26,75
SER	8,27	21,51	27,83	36,70	52,21
THR	5,43	14,11	18,53	23,81	33,04
<i>TRP</i>	1,19	3,10	4,16	5,13	6,82
TYR	2,92	7,60	9,87	12,94	18,33
VAL	6,01	15,63	20,42	26,48	37,10
Concentración total	75,37	195,97	246,11	341,81	509,28
Total de aa esenciales	32,22	83,78	105,84	145,49	214,87
Total de aa en negrita	21,39	55,61	71,37	95,46	137,61
aa en negrita/aa esenciales	66 %	66 %	67 %	66 %	64 %
aa en negrita/Total	28 %	28 %	29 %	28 %	27 %
aa esenciales/Total	43 %	43 %	43 %	43 %	42 %

En la **Tabla 4**, los aminoácidos (aa) en negrita son valina, treonina, leucina y lisina, los aminoácidos en cursiva son aminoácidos esenciales (por ejemplo, arginina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, triptófano, treonina y valina; y para los cultivos de células CHO, la prolina es adicionalmente un aminoácido esencial; un experto en la técnica conoce variaciones en la definición de aminoácidos esenciales según se aplique a diferentes células, etc.). La **Tabla 4** proporciona medios de cultivo celular deseados representativos para células CHO a diversas densidades celulares diana (M), títulos diana (N), requisitos de mantenimiento celular (Y), y ajustes iniciales (F).

5

Un experto en la técnica reconocerá que los medios de la divulgación diseñados racionalmente pueden usarse bien para producir un polipéptido de interés, o puede usarse en un cultivo celular que no esté diseñado para la producción de polipéptidos. Por consiguiente, en los procedimientos de cultivo celular desvelados, por ejemplo, para el crecimiento, la replicación y/o el mantenimiento eficaz de cultivos celulares, por ejemplo, cultivos celulares a gran escala, que no contienen células hospedadoras modificadas técnicamente para producir un polipéptido exógeno de interés, o que no se cultivan para producir un polipéptido endógeno de interés, puede usarse un medio diseñado racionalmente. En dicho caso, el medio de cultivo celular deseado no representa necesariamente el aminoácido (aminoácidos) necesario para su incorporación en el polipéptido de interés y en lugar de ello contiene una concentración (concentraciones) de aminoácidos basada en la concentración del aminoácido (aminoácidos) requerida para: 1) una masa celular deseada y 2) un mantenimiento celular. Dicho medio de cultivo celular deseado usado en los procedimientos de cultivo celular desvelados, contiene una concentración de aminoácidos inicial ajustada A', de acuerdo con la fórmula $A' = [(M \cdot X) + (Y \cdot M \cdot X)] \cdot F$, en la que X es una concentración del aminoácido que se usa por unidad de masa celular, M es un multiplicador para una masa celular pico deseada (por ejemplo, densidad celular pico deseada, etc.) del cultivo celular, Y es un factor de mantenimiento celular y F es un factor inicial. Un medio de cultivo celular deseado producido de acuerdo con esta fórmula se proporciona por tanto a un cultivo celular en condiciones que permitan el crecimiento y la replicación de las células en el cultivo celular. En una realización de la invención, el procedimiento de cultivo celular usa un cultivo celular a gran escala. En otra realización de la invención, el procedimiento de cultivo celular usa células animales.

Adición de prolina a medios de cultivo celulares

Usando los procedimientos de diseño de medios racionales desvelados en el presente documento, se ha determinado que manteniendo altos los niveles de prolina durante el periodo de cultivo del cultivo celular, por ejemplo, un cultivo celular a gran escala, se produce un aumento en el título del polipéptido y un aumento de la densidad celular. Este "umbral" de prolina varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM, y el nivel de prolina en el cultivo celular mantenido por encima de este umbral parece ser una fuerza impulsora para producir cultivos celulares a gran escala de alta densidad celular y alto título. Curiosamente, el aumento del título del polipéptido y de la viabilidad celular, impulsado por prolina, aumenta simultáneamente el requisito del cultivo para aminoácidos adicionales (para satisfacer el aumento de la tasa de consumo), lo que explica, al menos parcialmente, por qué las formulaciones de los medios diseñados racionalmente del presente documento contienen altas concentraciones de aminoácidos.

Proporcionar un cultivo celular

En la técnica se conocen diversos procedimientos de preparación de células de mamífero para la producción de polipéptidos mediante cultivo discontinuo y semicontinuo. Como se ha descrito anteriormente, en la línea celular hospedadora, puede introducirse un ácido nucleico suficiente para conseguir la expresión (típicamente un vector que contiene el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés y cualquier elemento de control genético unido operativamente) mediante diversas técnicas bien conocidas. Típicamente, las células se exploran para determinar cuáles de las células hospedadoras han captado realmente el vector y expresan el polipéptido o la proteína de interés. Los procedimientos tradicionales para detectar una proteína o un polipéptido de interés particular expresado por células de mamífero incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía por inmunofluorescencia, SDS-PAGE, transferencia de Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), ensayos de actividad biológica y cromatografía de afinidad. Un experto habitual en la técnica conocerá otras técnicas apropiadas para detectar polipéptidos o proteínas expresados. Si múltiples células hospedadoras expresan el polipéptido o la proteína de interés, algunas de las técnicas indicadas, o todas, pueden usarse para determinar cuáles de las células expresan el polipéptido o la proteína a los niveles más altos.

Una vez que se ha identificado la célula que expresa el polipéptido o la proteína de interés, la célula se propaga en el cultivo mediante cualquiera de los diversos procedimientos bien conocidos por un experto habitual en la técnica. La célula que expresa el polipéptido o la proteína de interés se propagan típicamente haciendo que crezca a una temperatura y en un medio que sea favorable para la supervivencia, crecimiento y viabilidad de la célula. El cultivo inicial puede tener cualquier volumen, pero a menudo es un volumen más pequeño que el volumen de cultivo del biorreactor de producción usado en la producción final del polipéptido o proteína de interés, y frecuentemente las células se cambian varias veces de cultivo en biorreactores de mayor volumen antes de sembrarlas en el biorreactor de producción. El cultivo celular puede agitarse o sacudirse para aumentar la oxigenación del medio y dispersión de nutrientes a las células. Como alternativa o de manera adicional, pueden usarse diversos dispositivos de inyección de aire bien conocidos en la técnica para aumentar y controlar la oxigenación del cultivo. De acuerdo con la presente invención, un experto habitual en la técnica comprenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas de un cultivo celular, incluyendo, pero sin limitación, el pH (por ejemplo, de 6,6 a 7,6), la temperatura (por ejemplo, de 25 °C a 42 °C), los niveles de oxígeno y dióxido de carbono (por ejemplo, O₂: del 10 % al 80 % y CO₂: del 7 % a 15 % en todo el cultivo) y la osmolaridad (por ejemplo, una osmolaridad de partida de 260 a 340 mOsm/kg), etc.

Como se usa en el presente documento, el término "inóculo" se usa para referirse a un volumen de células que contiene el ácido nucleico que expresa el polipéptido de interés, que se usa para sembrar el recipiente de producción

en el que se producirá el cultivo de células animales a gran escala, por ejemplo, el biorreactor de producción. En una realización de la invención, el volumen del inóculo es de aproximadamente 60 a 80 % del volumen final.

La densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede seleccionarla un experto habitual en la técnica. De acuerdo con la presente invención, la densidad celular de partida en el biorreactor de producción puede ser tan solo de una célula por volumen de cultivo. En realizaciones preferidas de la presente invención, las densidades celulares de partida en el biorreactor de producción pueden variar de aproximadamente $0,1 \times 10^6$ células viables por ml a aproximadamente 10×10^6 células viables por ml y mayores.

Los cultivos celulares iniciales e intermedios pueden crecer a cualquier densidad deseada antes de sembrar en el siguiente biorreactor intermedio o de producción final. En una realización de la invención, la densidad celular del inóculo es de aproximadamente $0,5-1 \times 10^6$ células/ml. Se prefiere que la mayoría de las células permanezcan vivas antes de sembrar, aunque no se requiere una viabilidad total o casi total. En una realización de la presente invención, las células pueden retirarse del sobrenadante, por ejemplo, por centrifugación a baja velocidad. También puede ser deseable lavar las células retiradas con un medio antes de sembrar al siguiente biorreactor para retirar cualquier producto residual metabólico o componentes del medio no deseados. El medio puede ser el medio en el que previamente se cultivaron las células o puede ser un medio diferente o una solución de lavado seleccionada por el facultativo de la presente invención.

Después, las células pueden diluirse a una densidad apropiada para sembrar en el biorreactor de producción. Las células pueden diluirse en otro medio o solución, por ejemplo, el medio de cultivo celular de partida o el medio de cultivo celular deseado, dependiendo de las necesidades y deseos del facultativo de la presente invención o adaptar requisitos particulares de las propias células (por ejemplo, si las células van a conservarse durante un período de tiempo corto antes de sembrar en el biorreactor de producción).

Fase de crecimiento inicial

Una vez que se siembra en el vaso de producción, como se describe anteriormente, el cultivo celular animal puede mantenerse en la fase de crecimiento inicial usando el medio de cultivo celular deseado obtenido por la fórmula de la invención desvelada en el presente documento y en condiciones favorables para la supervivencia, el crecimiento y la viabilidad del cultivo celular. Las condiciones exactas variarán dependiendo del tipo de célula, del organismo del cual procede la célula y de la naturaleza y carácter del polipéptido o proteína que se expresa.

Un biorreactor de producción puede ser de cualquier volumen que sea apropiado para la producción a gran escala de polipéptidos o proteínas. En una realización preferida, el volumen del biorreactor de producción es de al menos 500 litros. En otras realizaciones preferidas, el volumen del biorreactor de producción es de 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen intermedio. Un experto habitual de la técnica sabrá, y podrá, seleccionar, un biorreactor adecuado para su uso en la realización práctica de la presente invención. El biorreactor de producción puede construirse de cualquier material que sea favorable para el crecimiento y la viabilidad celular, que no interfiera con la expresión o estabilidad de la proteína o polipéptido producido.

La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento inicial se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas al cual el cultivo celular permanece viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, células CHO se cultivan bien a 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien dentro de un intervalo de aproximadamente 35 °C a 39 °C. En una realización de la invención, la temperatura de la fase de crecimiento (día 0 a día 3) es de 37 °C, y la temperatura de la fase de producción (después del día 3) es de 31 °C.

Los expertos habituales en la técnica podrán seleccionar la temperatura, o temperaturas, apropiadas en las que crecen las células, dependiendo de las necesidades de las células y de los requisitos de producción del facultativo.

En una realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene a una sola temperatura constante. En otra realización, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene dentro de un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura puede aumentarse o disminuirse constantemente durante la fase de crecimiento inicial. Como alternativa, la temperatura puede aumentarse o disminuirse en cantidades distintas a diversos tiempos durante la fase de crecimiento inicial. Un experto habitual en la técnica podrá determinar si deben usarse una o múltiples temperaturas, y si la temperatura debe ajustarse constantemente o en cantidades distintas.

Las células pueden crecer durante la fase de crecimiento inicial durante una cantidad de tiempo mayor o menor, dependiendo de las necesidades del facultativo y de los requisitos de las propias células. En una realización, las células crecen durante un periodo de tiempo suficiente hasta alcanzar una densidad celular viable, es decir, un porcentaje determinado de la densidad celular viable máxima que las células alcanzarían eventualmente si se permitiese su crecimiento sin cambios. Por ejemplo, las células pueden crecer durante un periodo de tiempo suficiente hasta alcanzar una densidad celular viable deseada de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento o más de densidad celular viable máxima.

En otra realización se permite que las células crezcan durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de partida del cultivo celular, de la temperatura a la cual crecen las células y de la tasa de crecimiento intrínseca de las células, las células pueden crecer durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días o más. En algunos casos, se permite que las células crezcan durante un mes o

más. Las células crecerían durante 0 días en el biorreactor de producción si su crecimiento en un biorreactor de siembra, a la temperatura de fase de crecimiento inicial, fuese suficiente de manera que la densidad celular viable en el biorreactor de producción en el momento de su inoculación es ya el porcentaje deseado de la densidad celular viable máxima. El facultativo de la presente invención podrá seleccionar la duración de la fase de crecimiento inicial dependiendo de los requisitos de producción del polipéptido o de la proteína y de las necesidades de las propias células.

El cultivo celular puede agitarse o sacudirse durante la fase de cultivo inicial para aumentar la oxigenación y dispersión de los nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto habitual en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento inicial, incluyendo, pero sin limitación el pH, la temperatura, la oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH puede controlarse proporcionando una cantidad apropiada de ácido o base, y la oxigenación puede controlarse mediante dispositivos de inyección de aire muy conocidos en la técnica.

Cambio de las condiciones de cultivo

Al final de la fase de crecimiento inicial, pueden cambiarse una o más condiciones de cultivo de manera que se aplique un segundo conjunto de condiciones de cultivo y se produzca un cambio metabólico en el cultivo. La acumulación de metabolitos inhibidores, más notablemente lactato y amoníaco, inhiben el crecimiento. Un cambio metabólico, realizado, por ejemplo, por un cambio de temperatura, de pH, de osmolaridad o nivel de inductor químico del cultivo celular, puede caracterizarse, por ejemplo, mediante una reducción en la proporción de una tasa de producción de lactato específica con respecto a una tasa de consumo de glucosa específica. En una realización no limitante, las condiciones de cultivo varían cambiando la temperatura del cultivo. En otra realización de la invención, la temperatura cambia el día 1-7. En otra realización de la invención, la temperatura cambia a 29 °C-32 °C. En otra realización de la invención, el cambio de temperatura se produce el día 3, y la temperatura cambia a 31 °C. En la técnica pueden encontrarse enseñanzas con respecto a los cambios de temperatura y metabólicos (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° US 2006/0121568).

Fase de producción posterior

Una vez que las condiciones del cultivo celular se han cambiado como se ha descrito anteriormente, el cultivo celular puede mantenerse para una fase de producción posterior en un segundo conjunto de condiciones de cultivo favorables para la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y apropiadas para la expresión del polipéptido o proteína que se desea a niveles adecuados, por ejemplo, comercialmente adecuados.

Como se ha indicado anteriormente, el cultivo puede cambiarse cambiando una o más de las diversas de condiciones de cultivo incluyendo, pero sin limitación, la temperatura, el pH, la osmolaridad y los niveles de butirato sódico. En una realización, se cambia la temperatura del cultivo. De acuerdo con esta realización, durante la fase de producción posterior, el cultivo se mantiene a una temperatura o a un intervalo de temperatura que es menor que la temperatura o intervalo de temperatura de la fase de crecimiento inicial. Por ejemplo, durante la fase de producción posterior, las células CHO expresan bien polipéptidos y proteínas recombinantes dentro de un intervalo de 25 °C a 35 °C. En una realización de la invención, la fase de la producción comienza después del día 3. En otra realización de la invención, la fase de producción se realiza a 31 °C. Como se explica en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° US 2006/0121568, pueden emplearse múltiples cambios de temperaturas distintas para aumentar la densidad celular o la viabilidad o para aumentar la expresión del polipéptido o proteína recombinante.

De acuerdo con las fórmulas de la presente invención, se selecciona una masa celular (por ejemplo, densidad celular) y un título de producción (por ejemplo, un título diana) deseados para establecer la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, y la concentración de aminoácidos de partida, B. Por tanto, generalmente las células se mantienen en la fase de producción posterior hasta que se alcanza la densidad celular o el título de producción que se desea, o uno o más valores próximos a la densidad celular o título de producción deseados. En una realización, las células se mantienen en la fase de producción posterior hasta que el título del polipéptido recombinante o proteína alcanza un máximo. En otras realizaciones, el cultivo puede recogerse antes de este punto, dependiendo de los requisitos de producción del facultativo o de las necesidades o viabilidad de las propias células. Por ejemplo, las células puede mantenerse durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir una densidad celular viable de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento o más de densidad celular viable máxima. En algunos casos, puede ser deseable permitir que la densidad celular viable alcance un máximo, y después dejar que la densidad celular viable disminuya a algún nivel antes de recoger el cultivo. En un ejemplo extremo, puede ser deseable permitir que la densidad celular viable se acerque o alcance el valor de cero antes de recoger el cultivo.

En otra realización de la presente invención, se permite que las células crezcan durante un período de tiempo definido durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, dependiendo de la concentración del cultivo celular al inicio de la fase de crecimiento posterior, la temperatura a la cual crecen las células, y la tasa de crecimiento intrínseco de las células, las células pueden crecer durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 días o más. En algunos casos, se permite que las células crezcan durante un mes o más. El facultativo de la presente invención podrá seleccionar la duración de la fase de producción posterior dependiendo de los requisitos

de producción del polipéptido o proteína y de las necesidades de las propias células. La duración del cultivo ayudará a determinar la concentración de aminoácidos requerida para el mantenimiento celular, que puede variar en la presente invención, por ejemplo, de 0 % a 150 % de la concentración de aminoácidos requerida para la masa celular.

- 5 En determinados casos, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular, es decir, suministrar nutrientes u otros componentes del medio, que se han agotado o metabolizado por las células, al cultivo celular, durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, podría ser ventajoso complementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes del medio que se ha observado que se han agotado durante el control del cultivo celular (véase más adelante la sección "Control de las Condiciones del Cultivo Celular"). Como alternativa o
10 adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular antes de la siguiente fase de producción. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario complementar el cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, particularmente iones (tales como sodio, cloro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales muy bajas), lípidos, aminoácidos o glucosa (u otra fuente de energía).
- 15 Todos estos componentes complementarios pueden añadirse, es decir, suministrarse, al cultivo celular a la vez, o pueden proporcionarse al cultivo celular en una serie de adiciones. En una realización de la presente invención, los componentes complementarios se proporcionan al medio de cultivo a múltiples tiempos en cantidades proporcionales. En otra realización, puede ser deseable proporcionar inicialmente solo determinados de los componentes complementarios, y proporcionar más tarde el resto de componentes. Incluso en otra realización de la
20 presente invención, al cultivo celular se le suministra de manera continuada estos componentes complementarios.

De acuerdo con la presente invención, el volumen total añadido al cultivo celular debe mantenerse óptimamente a una cantidad mínima. Por ejemplo, el volumen total del medio de suministro, o solución que contiene los componentes complementarios, añadido al cultivo celular puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,
25 45 o 50 % del volumen del cultivo celular antes de proporcionar los componentes complementarios. Por tanto, el medio de suministro debe concentrarse para impedir que se desborde del biorreactor o de la dilución componente del medio. El medio de suministro se proporciona preferentemente al cultivo principal con el mismo pH, temperatura, etc., pero con altas concentraciones de nutrientes con respecto al medio de partida. En una realización de la invención, el medio de suministro es medio de suministro denominado "Medio de Suministro", en la columna 4 de la
Tabla 2.

- 30 En una realización de la divulgación, un cultivo celular con una concentración de aminoácidos de partida, B, se complementa con uno o más aminoácidos adicionales para alcanzar una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A. En otra realización de la invención, el cultivo celular se proporciona con un suministro continuo de aproximadamente 3-21 días, o suministros periódicos cada 2-3 días. En otra realización de la invención, el suministro se produce de aproximadamente el día 3 a aproximadamente el día 20 (para un cultivo de 21 días) como
35 un suministro en bolo. En otra realización de la invención, el suministro se produce periódicamente aproximadamente cada 2-3 días. En otra realización adicional de la invención, el volumen del suministro es de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % del volumen del cultivo celular total.

El cultivo celular puede agitarse o sacudirse durante la fase de producción posterior para aumentar la oxigenación y dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto habitual en la técnica
40 entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular determinadas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento posterior, incluyendo pero sin limitación, el pH, la temperatura, la oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH puede controlarse proporcionando una cantidad apropiada de ácido o base y la oxigenación puede controlarse con dispositivos de inyección de aire muy conocidos en la técnica.

Control de las condiciones del cultivo celular

- 45 En determinadas realizaciones de la presente invención, el facultativo puede encontrar que es beneficioso o necesario controlar periódicamente las condiciones particulares del cultivo celular en crecimiento. El control de las condiciones del cultivo celular, permite al facultativo determinar si el cultivo celular está produciendo el polipéptido recombinante de interés a niveles subóptimos o si el cultivo está casi entrando en una fase de producción subóptima. Para controlar determinadas condiciones de cultivo celular, puede ser necesario retirar pequeñas
50 alícuotas del cultivo para su análisis. Un experto habitual en la técnica entenderá que dicha retirada posiblemente puede introducir contaminación en el cultivo celular, y tomarás las precauciones apropiadas para minimizar el riesgo de que se produzca dicha contaminación.

Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario controlar la temperatura, el pH, la densidad celular, la viabilidad celular, la densidad celular viable integrada, los niveles de lactato, los niveles de amoníaco, la osmolaridad o el título del polipéptido expresado. En el campo en cuestión, se conocen numerosas técnicas que permiten al experto habitual medir estas condiciones. Por ejemplo, la densidad celular puede medirse usando un hemocitómetro, un contador de Coulter, o examinando la densidad celular (CEDEX® Innovatis, Malvern, PA). La densidad celular viable puede determinarse tiñendo una muestra de cultivo con azul de Tripano. Dado que
55 solamente las células muertas captarán el azul del Tripano (es decir, las células viables excluyen el colorante), la

densidad celular viable puede determinarse contando el número total de células, dividiendo el número de células que han captado el colorante entre el número total de células, y tomando el recíproco. Puede usarse HPLC para determinar los niveles de lactato, amoníaco o del polipéptido o proteína expresados. Como alternativa, el nivel del polipéptido o proteína expresado puede terminarse mediante técnicas de biología molecular convencionales tales como tinción de Coomassie de geles de SDS-PAGE, transferencia de Western, ensayos de Bradford, ensayos de Lowry, ensayos de Biuret y absorbancia UV. También puede ser beneficioso o necesario controlar modificaciones postraduccionales del polipéptido o proteína expresado, incluyendo la fosforilación y glucosilación.

Recogida de polipéptidos producidos por el cultivo celular

El polipéptido de interés producido por el cultivo celular puede purificarse después del medio de cultivo o de extractos celulares para su uso en diversas aplicaciones. Formas solubles del polipéptido pueden purificarse de los medios acondicionados. Formas del polipéptido, unidas a membranas, pueden purificarse preparando una fracción de membrana total de la célula de expresión y extrayendo las membranas con un detergente no iónico, tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Pueden prepararse proteínas citosólicas o nucleares sometiendo a lisis las células hospedadoras (mediante fuerza mecánica, bomba Parr, tratamiento con ultrasonidos, detergentes, etc.), retirando la fracción de membrana celular por centrifugación, y conservando el sobrenadante.

El polipéptido puede purificarse usando otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido producido por los procedimientos desvelados puede concentrarse usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de AMICON® o PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación, tal como un medio de filtración en gel. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónico (por ejemplo, una columna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ); conteniendo dicha resina una matriz o un sustrato que tiene grupos colgantes de dietilaminoetil (DEAE) o polietilenimina (PEI). Las matrices usadas para la purificación pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos normalmente empleados en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede usarse una etapa de intercambio catiónico para la purificación de proteínas. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos de sulfopropilo o carboximetilo (por ejemplo, columnas de S-SEPHAROSE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

La purificación del polipéptido del sobrenadante de cultivo también puede incluir una o más etapas en columna sobre resinas de afinidad, tales como A-agarosa concanavalina, AF-HEPARIN650, heparina-TOYOPEARL® o Cibacron blue 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); columnas de cromatografía de interacción hidrófobo usando resinas tales como éter fenílico, éter butílico o éter propílico; o columnas de inmunoafinidad usando anticuerpos contra la proteína marcada. Finalmente, puede emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) que emplea medios de HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos colgantes de metilo u otros alifáticos (por ejemplo, columnas de Ni-NTA), para purificar adicionalmente la proteína. Como alternativa, los polipéptidos pueden expresarse de manera recombinante en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse como una fusión con proteínas tales como la proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), o tiorredoxina (TRX). Los kits para la expresión y purificación de proteínas de fusión se encuentran disponibles en New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), e Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente. Las proteínas también pueden marcarse con un epítipo pequeño (por ejemplo, etiquetas de His, myc o Flag) y posteriormente identificarse o purificarse usando un anticuerpo específico contra el epítipo seleccionado. Los anticuerpos contra epítipos comunes se encuentran disponibles en numerosas fuentes comerciales.

Como una alternativa a los modos de purificación por cromatografía tradicionales (por ejemplo, modos de purificación por cromatografía de flujo continuo y unión a eluyente), los polipéptidos producidos por los procedimientos de la presente invención pueden purificarse realizando una cromatográfica en columna de purificación en un modo de partición débil, una técnica en la que tanto al menos un producto contenido en la preparación como al menos un contaminante o impureza, se unen a una resina o medio cromatográfico. En el modo de partición débil, la al menos una impureza se une más íntimamente al medio en comparación con el producto polipeptídico; y a medida que continua la carga (del fluido de carga), el producto polipeptídico no unido pasa selectivamente a través del medio y se recupera del efluente de la columna. Dicha purificación produce un alto grado de reducción de impurezas, así como una alta recuperación del producto. Dicha purificación puede realizarse en medios y resinas conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, medio de intercambio iónico cargado, resina de cromatografía de interacción hidrófoba, resina de cromatografía de afinidad metálica inmovilizada, y resina de hidroxiapatita. En al menos una realización, la retirada de la impureza/contaminante en condiciones de partición débil se produce a medida que el fluido de carga pasa a través de un medio/resina que se une a al menos 2,8 mg de producto por ml de medio/resina. En al menos otra realización, la retirada de la impureza/contaminante en condiciones de partición débiles se produce a medida que el fluido de carga pasa a través de un medio/resina en condiciones operativas definidas por un coeficiente de partición de al menos 0,1. El producto purificado se recupera del efluente de la columna que contiene el medio/resina.

La **Tabla 5** resume las diferencias en las características entre los modos de flujo continuo (FC), unión a eluyente (U-E) y de partición débil (PD).

Tabla 5: Características de los modos FC/PD/U-E			
	FC	PD	U-E
Kp	< 0,1	0,1-20	>20
Limitación de exposición de carga	Impurezas 10-50 mg Prod/ml (típicam.) pero realmente dependiente de la pureza de carga	Impurezas 50-500 mg Prod/ml (típicam) pero realmente depende de la pureza de carga	Producto + impurezas < 100 mg Prod/ml
Vol. de carga	Moderado, para impurezas diluidas 10-20 CV	Muy alto, para diluir impurezas hasta 50 VC	Inferior, dado que el producto se une en adición a impurezas 5-20 VC
[Producto] en eluato de carga	Igual a la concentración de carga a través de mucha carga	Retardo inicial, después igual a la concentración de carga a través de mucha carga	<5 % de concentración de carga
Residuo [Impureza]	Bajo	Muy bajo	Dependiente de las condiciones de elución, del volumen de conjunto y de la capacidad
Producto unido (Q)	< 1 mg/ml	< 10 – 20 mg/ml	> 10 - 20 mg/ml
Región operativa	Intervalo de condiciones relativamente amplio	Ventana de operación moderada entre los modos FT y U-E	Condiciones de unión rigurosas para carga, intervalo de condiciones de elución amplio
Fase(s) móvil	Isocrático	Isocrático	Cambio en la composición del tampón después de la carga lo que causa elución

El coeficiente de partición (Kp) es la proporción de la concentración del producto adsorbido (Q) con respecto a la concentración del producto en solución (C); por tanto el Kp para el modo de partición débil es intermedio entre el Kp para los modos de flujo continuo y unión a eluyente, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 y 20. Para determinar las condiciones apropiadas, por ejemplo, sal, tampón, pH, etc., para un modo de purificación de partición débil, puede realizarse una exploración de alto rendimiento o un estudio de exploración de purificación discontinua. Por tanto, un experto en la técnica puede determinar coeficientes de partición Kp de productos en función de las condiciones operativas (véase el Ejemplo 7.1).

Los procedimientos de purificación usando un modo de partición débil se describe con detalle en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos 11/372.054 y 11/510.634.

Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones o con otros procedimientos conocidos, pueden emplearse para purificar un polipéptido de interés producido por los procedimientos de cultivo celular animal a gran escala y medios descritos en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos producidos por cultivo celular

Los medios de cultivo celular anteriores, por ejemplo, medios de cultivo celular a gran escala, y los procedimientos para cultivar células, proporcionan polipéptidos de interés, por ejemplo, anticuerpos, receptores solubles, proteínas de fusión, etc. Los polipéptidos producidos por los procedimientos de cultivo celular desvelados, y con los nuevos medios y procedimientos relacionados desvelados en el presente documento, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, pueden usarse *in vitro*, *ex vivo* o incorporarse en composiciones farmacéuticas y administrarse a individuos (por ejemplo, a sujetos humanos) que lo necesiten. Un experto en la técnica conoce diversas estrategias farmacogenómicas a tener en cuenta para determinar si administrar un polipéptido de la invención e incluyen estrategias de asociación de genoma completo, de genes candidatos y de perfiles de expresión génica. Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración deseada (por ejemplo, las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible). Otros ejemplos no limitantes de vías administración incluyen administración parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las composiciones farmacéuticas compatibles con cada vía deseada son muy conocidas en la técnica.

Un polipéptido de la invención puede usarse como una composición farmacéutica cuando se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener, además de un polipéptido de la invención, vehículos, diversos diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente(s) activo(s). Las características del vehículo dependerán de la vía de administración.

La composición farmacéutica de la invención también puede contener factores o agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de trastorno particular al cual se dirigen. Por ejemplo, una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 también puede incluir un agente antidiabético oral. La composición farmacéutica puede contener factores trombolíticos o antitrombóticos tales como activador de plasminógeno y Factor VIII. La composición farmacéutica puede contener adicionalmente agentes antiinflamatorios. Dichos factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con un polipéptido de la invención, o minimizar efectos secundarios causados por los polipéptidos de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un liposoma en el que un polipéptido de la invención se combina, además de con otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas laminares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, mejora de síntomas, curación, o aumento de la tasa de curación, de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, la expresión, administrado en solitario, se refiere solo a ese ingrediente. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, cuando se administra en combinación, en serie o simultáneamente.

En la práctica del procedimiento de tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención se administra un sujeto, por ejemplo, a un mamífero (por ejemplo, a un ser humano). Un polipéptido de la invención puede administrarse de acuerdo con el procedimiento de la invención bien en solitario o en combinación con otras terapias. Cuando se coadministra con uno o más agentes, un polipéptido de la invención puede administrarse bien simultáneamente con el segundo agente, o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico tratante decidirá la secuencia de administración apropiada de los polipéptidos de la invención en combinación con otros agentes.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención se administra por vía oral, el agente de unión estará en forma de comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra de forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un vehículo sólido tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contienen de aproximadamente 5 a 95 % de agente aglutinante, y preferentemente de aproximadamente 25 a 90 % de agente aglutinante. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un vehículo líquido, tal como agua, vaselina, aceites de origen animal o de origen vegetal, tales como aceite de cacahuete (tomando precaución en relación a las alergias al cacahuete), aceite mineral, aceite de semilla de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 90 % en peso del agente aglutinante y preferentemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 % en peso del agente aglutinante.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención se administra por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el polipéptido de la invención estará en forma de una solución acuosa apirógena, parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones proteicas, parenteralmente aceptables, que deben tener en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, se incluye en la experiencia de los expertos en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además del polipéptido de la invención, un vehículo isotónico, tal como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer lactada, u otro vehículo conocido en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes y cualquier otro aditivo (aditivos) conocidos por los expertos en la técnica.

La cantidad de un polipéptido de la invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que vaya a tratarse y de la naturaleza de los tratamientos previos a los que se ha sometido el paciente. En última instancia, el médico tratante decidirá la cantidad de una composición farmacéutica o polipéptido de la invención con la que tratar cada paciente individual. Inicialmente, el médico tratante administrará dosis bajas de una composición farmacéutica o polipéptido de la invención y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse mayores dosis de una composición farmacéutica o polipéptido de la invención hasta

obtener el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese momento, generalmente, la dosificación no se aumenta más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para tratar a un sujeto que lo necesite debe contener de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg de un polipéptido de la invención por kg de peso corporal.

- 5 La duración de la terapia intravenosa (i.v.) usando una composición farmacéutica de la presente invención variará, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y de la afección que vaya a tratarse y de la posible respuesta particular de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de una composición farmacéutica o un polipéptido de la presente invención pueda estar, por ejemplo, en el intervalo de 1-12, 6-18 o 12-24 h de administración i.v. continua o intermitente. También se contempla terapia subcutánea (s.c.) usando una
10 composición farmacéutica de la presente invención. Estas terapias pueden administrarse diariamente, semanalmente o, más preferentemente, bisemanalmente, o mensualmente. En última instancia, el médico tratante decidirá la duración apropiada de la terapia i.v. o s.c., o la terapia con una molécula pequeña, y la duración de la administración de la terapia, usando la composición farmacéutica de la presente invención.

Ejemplos

- 15 Para ayudar a entender la invención se exponen los siguientes ejemplos, aunque de ninguna manera pretenden, y no deben considerarse, limitantes de la invención. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como técnicas de ADN recombinante. Dichos procedimientos son muy conocidos por los expertos habituales en la técnica.

Ejemplo 1

- 20 Cuantificación de la composición de aminoácidos de células CHO

Para cuantificar la composición de aminoácidos de células CHO que expresaban anticuerpos y de células CHO que expresaban proteínas recombinantes, es decir, el porcentaje molar de cada aminoácido con respecto al total de aminoácidos de masa celular (biomasa), se realizó el siguiente procedimiento. En resumen, se cultivaron tres líneas de células CHO que sobreexpresaban anticuerpos o proteínas recombinantes, más específicamente anticuerpo anti-IL22 (anticuerpo anti-IL-22 humano recombinante), anticuerpo Myo-029 (anticuerpo monoclonal IgG1 anti-GDF8) y la
25 BMP-2 humana recombinante, en un matraz agitador durante un día (BMP-2) o tres días (Myo-029 y anti-IL-22). El último día, los cultivos se recogieron y las células se centrifugaron a una concentración de 10^6 células/ml. Un sedimento que contenía 10^6 células se lavó dos veces con 1 X PBS y el sedimento se resuspendió en 500 µl de HCl 5 N. La suspensión que contenía las células se calentó a 100 °C durante 24 horas, momento en el cual la suspensión se centrifugó al vacío. El sedimento resultante se resuspendió en 500 µl de PBS, y se realizó análisis de aminoácidos usando cromatografía de gas o líquida.

Una hidrólisis ácida determinó que tanto la metionina como el triptófano se degradaban durante la hidrólisis ácida; por tanto, las concentraciones de estos aminoácidos en los Ejemplos 2 y 3 se basaban en valores bibliográficos para las células CHO. Además, se determinó que durante la hidrólisis la glutamina y la asparagina se convertían en sus
35 formas ácidas, ácido glutámico y ácido aspártico, respectivamente; por tanto, las concentraciones de estos cuatro aminoácidos en los Ejemplos 2 y 3 se ajustaron basándose en las proporciones de glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico indicadas en la bibliografía. Por otro lado, se determinó que estas líneas de células CHO poseían composiciones de aminoácidos similares y que coincidían bastante con los valores indicados para otras células de mamífero (datos no mostrados) (véase Bonarius (1996) Biotechnol. Bioeng. 50: 299-318).

40 Ejemplo 2

Densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml y título diana del anticuerpo anti-IL-22 de 9 g/l en células CHO (línea celular 1) con suministro de volumen de 32 % usando medio diseñado racionalmente

Ejemplo 2.1: Medio diseñado racionalmente

Usando las fórmulas desveladas en el presente documento, se determinó la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de los aminoácidos requeridos para producir 15×10^6 células/ml y 9 g/l de anticuerpo anti-IL-22 en la Línea 1 de Células CHO (Tabla 6, columna 2) (el mantenimiento celular se estableció al 50 %, es decir, $Y=0,5$). La concentración de aminoácidos inicial ajustada, A (Tabla 6, columna 2), de una variedad de aminoácidos se ajustó para obtener las concentraciones de aminoácidos totales ajustadas iniciales modificadas mostradas en la columna 3 de la Tabla 6. Se realizaron los siguientes ajustes: los niveles de Asn, Asp y Gln se establecieron de acuerdo con la
50 Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° US2006/0121568A1; 2) dado que los cultivos celulares produjeron Ala, Glu, Gly, sus niveles se ajustaron a niveles más bajos; 3) el nivel de Cys se ajustó debido a que la cistina también se usó en el medio de suministro, y el valor de la cistina en el medio se ajustó al de la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° US2006/0121568A1; 4) los niveles de Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe son del 20 % al 100 % más altos que los de la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, debido a que se usó el
55 suministro en polvo, que contenía un conjunto de composiciones de aminoácidos, para preparar el medio de cultivo celular deseado, de tal manera que no fue posible una coincidencia exacta. La concentración de aminoácidos del medio de partida, B (Tabla 6, columna 4), se calculó a partir de las concentraciones de aminoácido total iniciales

ajustadas modificadas mostradas en la columna 3 de la **Tabla 6**.

Tabla 6: Formulación de medio de cultivo celular deseado

Aminoácido	Concentración de aminoácidos inicial ajustada (mM) (A)	Concentración de aminoácidos inicial ajustada modificada (mM)	Concentración de aminoácidos de partida (mM) (B)
ALA	13,67	2,18	0,20
ARG	6,68	12,56	1,94
ASN	7,42	27,82	14,56
ASP	11,86	6,28	1,70
CYS	4,97	0,27	0,40
GLU	9,23	2,18	0,20
GLN	13,11	2,72	4,00
GLY	12,94	4,52	3,63
HIS	3,93	5,05	2,15
ILE	6,23	10,95	2,54
LEU	13,13	17,96	6,87
LYS	13,01	15,62	7,91
MET	2,82	5,71	2,38
PHE	6,19	7,67	3,76
PRO	11,50	11,15	7,36
SER	21,35	22,34	10,20
THR	13,89	14,18	8,80
TRP	3,00	2,89	1,84
TYR	7,53	7,55	5,10
VAL	15,44	15,24	10,36
Total	197,91	194,85	95,91

Ejemplo 2.2: Densidad celular y título de anticuerpos en respuesta al medio diseñado racionalmente

- 5 Se obtuvieron células de la línea celular 1 (células CHO que expresaban anti-IL-22) de los matraces agitadores que contenían cultivos de 3 días y se inocularon a $0,7 \times 10^6$ células/ml el día 0 en el medio de cultivo celular de partida en un biorreactor de 1 l (Applikon 2L, (Applikon Inc, Foster City, CA)). El día 3 (aproximadamente 80 horas), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y se añadió Medio de Suministro (véase la columna 4 de la **Tabla 2**) al 3,75 % , 4 % , 4 % , 9 % , 2 % , 1 % , 1 % , 1 % , 3 % , 2 % y 1 % en volumen los días 3, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 20, respectivamente, para obtener el medio de cultivo celular deseado, que contenía la concentración de aminoácidos mostrada en la **Tabla 6**, columna 3. Los cultivos celulares se mantuvieron a pH 7,0 en un nivel de oxígeno disuelto al 30 % y con agitación a 200 rpm. Las muestras se extrajeron diariamente para ensayar la densidad celular (instrumento de recuento celular CEDEX® (Innovatis, Malvern, PA)), viabilidad (CEDEX®) y determinados niveles de metabolitos (Nova BioProfile Analyzer, Nova Biomedical Cooperation, Waltham, MA). El medio centrifugado se guardó a -80 °C para el análisis del título de anticuerpos usando HPLC con Proteína A.

Los resultados se muestran en las **Figuras 1 y 2**. Como puede observarse en la **Figura 1**, la mayor densidad celular (aproximadamente 11×10^6 células/ml) se alcanzó el día 11 del cultivo, disminuyendo la densidad celular después de esto. El mayor título de anticuerpos (aproximadamente 7 g/l) se obtuvo el día 21 del cultivo. Por tanto, el medio diseñado racionalmente puede usarse para producir una densidad celular alta y un título de anticuerpos alto.

Ejemplo 3

Densidad celular pico deseada de 15×10^6 células/ml y título de anticuerpo anti-IL-22 diana de 10 g/l en células CHO (línea celular 2) con un suministro de volumen al 33 % usando medio diseñado racionalmente

Ejemplo 3.1: Medio diseñado racionalmente

5 Usando las fórmulas desveladas en el presente documento, se determinó la concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de los aminoácidos requeridos para producir 15×10^6 células/ml y 9 g/l de anticuerpo anti-IL-22 (descrito anteriormente) (el mantenimiento celular se estableció al 50 %, es decir, $Y=0,5$). La concentración de aminoácidos inicial ajustada, A (**Tabla 7**, columna 2) de una variedad de aminoácidos se ajustó como se describe en el Ejemplo 2
10 para obtener las concentraciones de aminoácidos totales ajustadas iniciales modificadas mostradas en la columna 3 de la **Tabla 7**. Además, para esta formulación de medio, tanto el medio de cultivo celular de partida como el medio de suministro se prepararon a partir de polvos existentes con composiciones fijas, y por tanto no fue posible una coincidencia exacta. La concentración de aminoácidos del medio de partida, B (**Tabla 7**, columna 4), se calculó a partir de las concentraciones de aminoácidos totales ajustadas iniciales modificadas mostradas en la columna 3 de la **Tabla 7**.

15 **Tabla 7:** Formulación de medio de cultivo celular deseado

Aminoácido	Concentración de aminoácidos inicial ajustada (mM) (A)	Concentración de aminoácidos inicial ajustada modificada (mM)	Concentración de aminoácidos de partida (mM) (B)
ALA	14,2	2,4	0,4
ARG	6,9	15,2	5,3
ASN	7,8	32,6	21,1
ASP	12,2	6,8	2,3
CYS	5,2	0,3	0,4
GLU	9,7	2,4	0,4
GLN	13,6	2,7	4,0
GLY	13,6	4,5	3,6
HIS	4,1	5,5	2,7
ILE	6,4	13,2	5,4
LEU	13,8	20,0	9,4
LYS	13,7	16,5	8,9
MET	2,9	6,3	3,1
PHE	6,5	8,3	4,5
PRO	12,3	12,5	9,1
SER	22,6	23,8	11,8
THR	14,8	15,7	10,8
TRP	3,2	3,2	2,3
TYR	8,0	7,6	5,1
VAL	16,4	15,4	10,3
Total	207,93	214,8	121,1

Ejemplo 3.2: Densidad celular y título de anticuerpos en respuesta al medio diseñado racionalmente

Se obtuvieron células de la línea celular 2 (células CHO que expresaban anti-IL-22) de matraces agitadores que contenían cultivos de 3 días y las células se inocularon a $0,7 \times 10^6$ células/ml el día 0 en el medio de cultivo celular de partida en un biorreactor de 1 l (Applikon 2L). El día 3 (aproximadamente 80 horas), la temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C y se añadió suministro continuamente (1,8 % por volumen por día) con una bomba suministradora automática para obtener el medio de cultivo celular deseado, que contenía la concentración de aminoácidos mostrada en la **Tabla 7**, columna 3. Los cultivos celulares se mantuvieron a pH 7,0, en un nivel de oxígeno disuelto al 30 % y con agitación a 200 rpm. Las muestras se extrajeron diariamente para ensayar la densidad celular (instrumento de recuento celular CEDEX®), viabilidad (CEDEX®) y diversos niveles de metabolitos (analizador Nova Enzymatic). Los medios centrifugados se guardaron a -80 °C para el análisis de título de anticuerpos usando HPLC con Proteína A.

Los resultados se muestran en las **Figuras 3 y 4**. Como puede observarse en la **Figura 3**, la mayor densidad celular (más de 12×10^6 células/ml) se consiguió el día 10 del cultivo, disminuyendo después de esto la densidad celular. El título de anticuerpo más elevado (más de 10 g/l) se obtuvo el día 19 del cultivo. Por tanto, el medio diseñado racionalmente puede usarse para producir una densidad celular alta y un título de anticuerpos alto.

Ejemplo 4

El efecto de la adición de prolina sobre el rendimiento del cultivo celular

Se cultivaron células CHO que producían el anticuerpo anti-IL-22 en matraces agitadores con pH controlado (matraces de 500 ml con un volumen de trabajo de 100 ml), y se mantuvieron en un agitador a ~100 rpm en una incubadora con CO₂ al 7 %, a temperatura controlada. Las células se sembraron a $0,7 \times 10^6$ células/ml. La duración de cultivo fue de 18 días. Los 3 primeros días las células se mantuvieron a 37 °C, después de lo cual la temperatura se cambió a 31 °C para el resto del cultivo. El pH se controló durante los 3 primeros días con bicarbonato sódico 1 M. El medio de cultivo celular consistía en un medio basado en requisitos de cultivo celular tradicional, denominado "Medio Tradicional" y se formuló un medio diseñado racionalmente, es decir, medio formulado usando el diseño racional desvelado en el presente documento, denominado "Medio de Diseño Racional", para conseguir 10×10^6 células/ml y 10 g/l anticuerpo. Una diferencia importante a destacar entre estas dos formulaciones es que diversos aminoácidos (PRO, THR, GLY, TYR, TRP, VAL, y PHE) están a mayores concentraciones en el "Medio de Diseño Racional" en comparación con el "Medio Tradicional". Una tercera condición presentada es el medio tradicional con una prolina adicional de 3,7 mM añadida para obtener el nivel de prolina en el "Medio de Diseño Racional", denominado "Medio Tradicional + Prolina". Estas formulaciones se presentan más adelante en la **Tabla 8**. Al cultivo se añadió medio de suministro Wyeth de uso interno ("Medio de Suministro", véase la **Tabla 2**) a un volumen total de 23 %, que comprendía suministros diarios del 2 % los días 3-4, 9-14,17, del 1 % los días 5-6, y del 3 % el día 7.

Tabla 8: Formulaciones de medios para estudios con prolina

1	2	3	4
Aminoácido	Medio Tradicional [mM]	Medio de Diseño Racional [mM]	Medio Tradicional + Prolina [mM]
alanina	0,44	0,44	0,44
arginina•HCl	5,32	5,32	5,32
asparagina•H ₂ O	21,08	21,08	21,08
ácido aspártico	2,25	2,25	2,25
glutamina	4,00	4,00	4,00
glutamato	0,24	0,24	0,24
glicina	1,78	3,59	1,78
histidina	2,68	2,68	2,68
isoleucina	5,44	5,44	5,44
leucina	9,43	9,43	9,43
lisina•HCl	8,90	8,90	8,90

(continuación)

Aminoácido	Medio Tradicional [mM]	Medio de Diseño Racional [mM]	Medio Tradicional + Prolina [mM]
metionina	3,08	3,08	3,08
fenilalanina	3,67	4,48	3,67
prolina	5,41	9,13	9,13
serina	11,82	11,82	11,82
treonina	5,71	10,85	5,71
triptófano	1,54	2,32	1,54
tirosina•2Na	3,34	5,13	3,34
valina	7,36	10,30	7,36

Los resultados de estos experimentos se muestran en las **Figuras 5-7**. La adición de prolina al medio tradicional, es decir, "Medio Tradicional + Prolina" (**Figura 5**), dio como resultado una producción de anticuerpos equivalente a la del "Medio de Diseño Racional" a lo largo del día 14. Como se muestra en la **Figura 6**, los tres medios mantuvieron una alta densidad celular, presentando la mayor densidad el día 12. Como se muestra en la **Figura 7**, los tres medios mantuvieron una alta viabilidad celular, manteniendo los cultivos del "Medio de Diseño Racional" mayor viabilidad los días 15-18 en comparación con la de los cultivos que contenían los medios de "Medio Tradicional" y "Medio Tradicional + Prolina". Dado que una variedad de medios distintos, en los que cada uno contenía una concentración de glicina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina o valina diseñada racionalmente, no dio como resultado cultivos celulares productores de un título de anticuerpos más alto que el del "Medio Tradicional" (datos no mostrados), la prolina actúa como el aminoácido limitante de velocidad requerido para conseguir un título alto. Esto se ilustra en las **Figuras 8A-E**, que muestran que el día 14 muchos de los aminoácidos en el "Medio Tradicional + Prolina" alcanzan niveles extremadamente bajos (obsérvese que la tirosina se agotó), por lo cual se impide la incorporación adicional de estos aminoácidos en el anticuerpo. Este resultado también se observa en el gráfico de título (**Figura 5**) dado que la pendiente para el "Medio Tradicional + Prolina" se reduce después del día 14, mientras que la producción de anticuerpos se mantiene a lo largo del día 18 para el "Medio de Diseño Racional", que contiene niveles más altos de otros aminoácidos.

Curiosamente, la concentración de prolina en el "Medio Tradicional" nunca disminuye por debajo de 1 mM (**Figura 8A**); sin embargo, el efecto de la prolina sobre la incorporación global de aminoácidos en el anticuerpo se redujo después del día 11. Este hallazgo sugiere que existe un umbral de prolina, es decir, la concentración de prolina debe mantenerse por encima de 1 mM en todo el cultivo.

Ejemplo 5

Ejemplo profético: Medio de cultivo celular optimizado para una nueva línea celular

Los procedimientos de los medios diseñados desvelados en el presente documento pueden usarse para cualquier cultivo celular, incluyendo cultivos celulares que usan nuevas células/líneas celulares. Los medios optimizados para su uso con una nueva línea celular contendrían al menos una concentración de aminoácidos inicial ajustada, A, de un aminoácido de acuerdo con la fórmula $A=[(M*X)+(N*P)+(Y*M*X)]*F$.

Cuando a la ecuación anterior se la aplica un multiplicador, M, para un nuevo cultivo celular, este puede seleccionarse, por ejemplo, de 1 a 20×10^6 células/ml. Un experto en la técnica podría calcular un valor M útil duplicando la densidad celular máxima durante la fase de crecimiento, que puede calcularse basándose en la tasa de crecimiento.

Cuando a la ecuación anterior se la aplica un multiplicador N, para un nuevo cultivo celular, este puede calcularse, por ejemplo, multiplicando la CVI por la pe celular. Un experto en la técnica podría calcular la CVI estimando el perfil de crecimiento, siguiendo los procedimientos descritos en la sección titulada "Diseño y Formulaciones de Medios Racionales". Un experto en la técnica podría calcular la productividad específica (pe) midiendo la producción de anticuerpo o proteína recombinante en una base por célula.

Cuando a la ecuación anterior se la aplica un factor de mantenimiento celular, Y, para un nuevo cultivo celular, este puede estimarse usando inicialmente $Y=1$ (es decir, 100 % del aminoácido(s) necesario(s) requerido para la masa celular deseada) y después refinando el valor de Y (mayor o menor).

Cuando a la ecuación anterior se la aplica un factor inicial F, para un nuevo cultivo celular, este puede calcularse

usando inicialmente $F=1,3$ (es decir, 30 % de aminoácido(s) adicional(es)) y después refinando el valor de F (mayor o menor).

Ejemplo 6

Efecto de los factores de mantenimiento e inicial sobre el rendimiento del cultivo celular

5 Para demostrar que el factor de mantenimiento, Y , y el factor inicial, F , son importantes/esenciales para el rendimiento del cultivo celular, se sembraron células CHO que expresaban anti-IL-22 a $0,7 \times 10^6$ células/ml y se cultivaron durante 21 días en biorreactores de 2 l con un punto de referencia de pH de 7,0 y un punto de referencia de oxígeno disuelto (OD) de 30 %. El pH se controló con $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 2 N y el OD se controló con aire (que contenía CO_2 al 7 %) inyectado. La temperatura del cultivo fue de 37 °C durante los 3 primeros días y se cambió a 10 31 °C después del día 3 y permaneció a 31 °C hasta el final del cultivo. Las células se cultivaron durante 21 días en cualquiera de (1) medio que contenía aminoácidos requeridos tanto para el título de proteína diana como para la densidad celular pico deseada (pero sin representar el factor de mantenimiento o el factor inicial), es decir, "Medio de Diseño Racional sin factores de mantenimiento ni iniciales" o (2) "Medio de Diseño Racional".

15 Como se ilustra en las **Figuras 9 y 10**, el medio que no representa los factores de mantenimiento ni los factores iniciales presentó una disminución significativa en la viabilidad, casi alcanzando el 0 % el día 21 del cultivo celular, y una reducción significativa en la densidad celular. Además, la **Figura 11** demuestra que el día 21 del cultivo celular, este mismo medio solo fue capaz de mantener un título de anticuerpo de 5 g/l.

20 Por otro lado, el Medio de Diseño Racional (incluyendo los factores de mantenimiento e inicial) presentó mayor viabilidad, densidad celular y títulos de anticuerpos (**Figuras 9-11**). El día 21 del cultivo celular, el Medio de Diseño Racional fue capaz de mantener un título de anticuerpo de 10 g/l.

Estos hallazgos sugieren que representando los factores de mantenimiento e inicial en la determinación de la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo celular deseado se mejora el rendimiento celular medido por viabilidad celular, densidad celular y título del polipéptido.

Ejemplo 7

25 Purificación de polipéptidos usando cromatografía de intercambio aniónico en un modo de partición débil

Ejemplo 7.1. Exploración de alto rendimiento para establecer condiciones de partición débil y de flujo continuo

30 Primero se realizó un estudio de exploración inicial, que determinó el coeficiente de partición y/o la concentración de producto unido a la resina en diversas condiciones de solución, definiendo de este modo las regiones operativas de los modos de partición débil (PD) y flujo continuo (FC) para AcM-AAB, el polipéptido de interés y medio TMAE-HiCap (M). Esta exploración varió la concentración de cloruro sódico y el pH para determinar sus efectos sobre el grado de unión de AcM-AAB e impurezas relacionadas con el proceso (Proteína A y PCH) en el medio TMAE.

35 Los niveles residuales de Proteína A en las muestras de ensayo se midieron usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con Proteína A. La cantidad de agregado de alto peso molecular se midió usando un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítico. Los niveles de proteínas de células hospedadoras (PCH) se midieron usando un ELISA PHC. Todos los estudios de exploración y en columna se realizaron a temperatura ambiente.

40 Se añadieron 50 μl de medio TMAE HiCap a cada pocillo de una placa de filtro de 96 pocillos. Cada pocillo se equilibró en soluciones constituidas por glicina 50 mM y una cantidad variable de tampón Tris (dependiendo de la cantidad necesaria para la neutralización al pH especificado en la **Tabla 9**) y cloruro sódico (especificado en la **Tabla 10**). El pH varió de 7,6 a 9,0 y el cloruro sódico varió de 0 mM a 80 mM.

45 Las soluciones tampón usadas en cada fila se diluyeron en un sistema de pipeteo automático (Tecan 100 RST). La solución madre para los tampones se preparó con glicina 500 mM acidificada con HCl a pH 3,0, y posteriormente neutralizada con base de Tris 2 M a los niveles de pH indicados en la **Tabla 9**. Esta titulación dio como resultado un nivel de Tris que dependía del pH del tampón. El pH del tampón se midió a una dilución de 1 a 10 de la concentración del tampón de reserva, que correspondía a la dilución preparada por el sistema de pipeteo automático. Como resultado de la acidificación de la glicina a pH 3,0, el tampón contribuye aproximadamente a 10 mM de fuerza iónica en la solución final. Se realizaron dos exposiciones de carga (fluido de carga) para la resina: 5 mg/ml para medir el coeficiente de partición K_p , y 122 mg/ml para medir la capacidad de la resina para retirar las impurezas y el producto unido, Q, en equilibrio con una solución de proteína a una concentración aproximadamente 50 igual a la concentración de carga de la columna.

Tabla 9: Tipo de tampón y pH diana en cada pocillo

	Todas las columnas
A	Glicina 50 mM, Tris 8,8 mM, pH 7,6
B	Glicina 50 mM, Tris 13,6 mM, pH 7,8
C	Glicina 50 mM, Tris 16,0 mM, pH 8,0
D	Glicina 50 mM, Tris 19,6 mM, pH 8,2
E	Glicina 50 mM, Tris 28,4 mM, pH 8,4
F	Glicina 50 mM, Tris 37,2 mM, pH 8,6
G	Glicina 50 mM, Tris 64,0 mM, pH 8,8
H	Glicina 50 mM, Tris 100 mM, pH 9,0

Tabla 10: Niveles de NaCl (en mM) y exposición de proteínas (mg/ml) en cada pocillo

Todas las filas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl (mM)	0	10	20	40	60	80	0	10	20	40	60	80
AcM-AAB (mg/ml)	5	5	5	5	5	5	132	132	132	132	132	132

5 En la primera fase de la exploración a alto rendimiento, cada pocillo se equilibró en las condiciones de NaCl y pH descritas en las **Tablas 9 y 10** en una proporción de volumen de fase de 6:1 (solución 300 μ l: resina 50 μ l). La placa se agitó durante 20 minutos, lo que permitió alcanzar el equilibrio. La solución se retiró después centrifugando la placa de filtro. Este ciclo de equilibrio se repitió tres veces.

10 En la segunda fase, la resina de cada pocillo se expuso con una solución concentrada de AcM-AAB a 5 mg/ml de resina con una proporción de volumen de 6:1 (solución 300 μ l: resina 50 μ l) a la concentración de NaCl y pH apropiados. Como solución madre se usó una solución de AcM-AAB 36 mg/ml en HEPES 1 mM, NaCl 10 mM, a pH 7,0, aumentada con 300 ppm de Proteína A. La placa cargada se agitó durante 20 minutos, lo que permitió que la resina y la solución se equilibrasen. Se retiró el sobrenadante de la placa de filtro por centrifugación y se recogió en una placa de recogida. La concentración de la proteína en el sobrenadante en cada pocillo se determinó por
15 absorbancia A280 nm.

20 En la tercera fase, la resina se lavó añadiendo soluciones de las condiciones de NaCl y pH especificadas indicadas en la **Tabla 10**. El sobrenadante se retiró después de agitar durante 20 minutos. En la cuarta etapa, se añadió NaCl 2 M para retirar el resto de la proteína que estaba unida a la resina. Los coeficientes de partición se calcularon para cada pocillo usando la masa eluída de las fases 3 y 4 y la concentración del producto de la fase 2, y se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11: Coeficientes de partición (Kp) para la exploración HTS de 96 pocillos para AcM-AAB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,22	0,32	0,35	0,17	0,24	0,23	0,21	0,24	0,21	0,19	0,17	0,16
B	0,37	0,36	0,38	0,25	0,24	0,08	0,28	0,26	0,22	0,24	0,18	0,16
C	0,63	0,48	0,47	0,27	0,15	0,20	0,31	0,28	0,26	0,20	0,23	0,16
D	1,24	1,12	0,68	0,36	0,30	0,17	0,42	0,39	0,34	0,23	0,23	0,18
E	3,24	1,89	1,05	0,59	0,35	0,15	0,68	0,58	0,41	0,29	0,21	0,18
F	8,37	3,37	1,56	0,61	0,31	0,32	0,87	0,74	0,51	0,32	0,25	0,21
G	18,36	9,49	3,16	0,82	0,49	0,34	0,91	0,88	0,69	0,39	0,24	0,20
H	125,73	23,79	6,58	1,23	0,58	0,43	1,18	1,02	0,78	0,42	0,27	0,24

5 Como se muestra en la **Tabla 11**, el valor Kp puede usarse para describir regiones en las que el AcM-AAB se une al medio TMAE con diferentes fuerzas. La fuerza de la unión del AcM-AAB al medio TMAE puede manipularse variando las condiciones de pH y la concentración de cloruro en zonas de flujo continuo ($K \leq 0,1$), partición débil ($0,1 < K < 20$) y de unión ($K \geq 20$).

10 El sobrenadante de la fase de carga de todos los pocillos de cada zona se muestreó y se sometió a análisis con Proteína A. Los resultados del ensayo de estas muestras se resumen en la **Tabla 12**. Hay una región de pH y conductividad en la cual la etapa de cromatografía TMAE proporciona una retirada muy significativa de Proteína A con pérdida limitada de proteínas en la resina. Se descubrió que esta región estaba muy correlacionada con el valor del coeficiente de partición Kp y no con ningún pH o concentración de cloruro específicos.

Tabla 12: Valores logarítmicos de retirada (VLR) de Proteína A para datos de unión de AcM-AAB de exploración HTS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,11	1,89	2,12	1,85	1,22	1,00	1,63	1,02	1,00	0,92	0,85	1,02
B	2,79	2,37	2,42	1,96	1,23	1,13	1,77	1,81	1,22	0,85	0,94	1,52
C	>3,05	>3,03	2,74	2,16	1,37	1,11	2,25	2,15	1,96	1,16	1,06	0,95
D	>3,41	>2,98	>3,06	2,50	1,94	1,18	3,39	3,11	2,57	1,41	1,02	0,89
E	>2,87	>2,93	>3,01	>2,95	2,13	1,75	>3,09	3,27	3,09	1,66	1,89	0,99
F	>2,64	>2,89	>2,99	>3,11	2,29	1,82	>3,07	>3,11	>3,15	2,19	1,24	0,84
G	>2,33	>2,58	>2,89	>3,07	2,41	2,14	>3,09	>3,11	>3,14	2,80	1,46	0,85
H	>1,63	>2,36	>2,76	>3,01	2,86	2,37	>2,98	>3,05	>3,15	3,16	3,45	0,85

15 **Ejemplo 7.2 Procesos en columna en condiciones de flujo continuo**

El siguiente experimento se realizó en el modo de flujo continuo (FC), en el que el AcM-AAB interacciona solo muy débilmente con la columna. Se realizaron dos procesos con exposiciones de carga de 110 mg/ml y 200 mg/ml de resina.

20 Para todos los procesos de cromatografía de intercambio aniónico (HiCapM) TMAE descritos, se usaron las siguientes condiciones (en las descripciones experimentales individuales se indican las excepciones).

Caudal operativo – 150-300 cm/h

Equilibrio 1 – Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Equilibrio 2 – como se especifica, aproximadamente equivalente al pH de carga y contenido de cloruro

Lavado post-carga – como se especifica, aproximadamente equivalente al pH de carga y contenido de cloruro

25 Tampón de separación - Tris 50 mM, NaCl 2,0 M, pH 7,5 (5 volúmenes de columna)

Cromatografía con Proteína A Mabselect

El cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal se purificó a escala experimental usando una columna MabSelect (2.389 ml) conectada a un sistema de cromatografía Millipore K-prime 400. Una columna de Proteína A MabSelect se equilibró con 5 volúmenes de columna de Tris 50 mM / NaCl 150 mM, pH 7,5 a un caudal de 300 cm/h. Después la columna se cargó a una carga de aproximadamente 40 mg de producto / ml resina. Después de esto se realizó un lavado con 5 volúmenes de columna (VC) en NaCl 1 M, Tris 50 mM, pH 7,5 y un lavado con 5VC que contenía solución de lavado Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 7,5. Después, la columna se eluyó usando glicina 50 mM, NaCl 75 mM, pH 3,0. La mezcla de producto se neutralizó a un pH de 7,6 usando Tris 2 M, pH 8,5. El pico neutralizado tenía una concentración de cloruro de aproximadamente 90 mM.

10 Cromatografía HiCap TMAE (M)

La mezcla de Proteína A neutralizada se purificó adicionalmente durante la etapa TMAE con el equilibrio, carga, y soluciones de lavado a pH de 7,5 con Tris 50 mM y cloruro sódico 75 mM. Se usaron 5 volúmenes de columna de lavado. Las dimensiones de la columna y las exposiciones de carga para estos dos estudios fueron: Proceso 1: 7,0 cm de diámetro x 20,6 cm de altura de lecho (volumen – 793 ml) con una concentración de carga de 11,9 mg/ml; y Proceso 2: 7,0 cm de diámetro x 13 cm de altura de lecho (volumen – 500 ml) con una concentración de carga de 17,6 mg/ml.

Estas condiciones de carga estaban en la región de flujo continuo (FC) (Tabla 13). Se usaron estudios de unión discontinuos para medir el coeficiente de partición (Kp), y el producto unido se determinó con proteínas en la separación de columnas usando absorbancia UV. Este procedimiento de determinación del producto unido típicamente subestima la cantidad de producto unido durante la carga debido a la elución isocrática del producto durante el lavado. Se midieron los niveles de Proteína A, de PCH y de agregados de alto peso molecular (APM) en la carga y en la mezcla de producto y se calculó el grado de retirada. Los resultados se presentan en la Tabla 13. Hay una pobre retirada de Proteína A y de APM y una moderada reducción en los niveles de PCH.

Tabla 13: Retirada de PCH, de Proteína A y de APM en condiciones de FC

Proceso	Exposición de carga (mg/ml)	Coefficiente de partición (Kp)	Producto unido (resina mg/ml)	PHC (VLR)	Proteína A (VLR)	APM (Veces)	Recuperación (%)
1	110	0,17	1,4	2,3	0,1	-	96
2	200	0,17	3,3	2,0	<0,1	1,5	96

* Los niveles de impureza fueron de 38,5 ppm para ProA y de 51.943 ppm para PCH (Proceso 1), de 8,8 ppm para ProA y de 25.398 ppm para PCH (Proceso 2)

25

Ejemplo 7.3. Procesos de columna en condiciones de partición débil (exposición elevada al producto)

Cromatografía de intercambio aniónico (HiCap M) TMAE

Para generar el material de carga de estos procesos se realizaron diversos procesos con Proteína A Mabselect básicamente como se describe en el Ejemplo 7.2. La mezcla de anticuerpo parcialmente purificado de la etapa de Proteína A se purificó adicionalmente sobre la columna TMAE. La carga en la columna TMAE fue en Tris 50 mM, pH 8,2. El diámetro de la columna era de 0,5 cm y la altura del lecho era de 10 cm de altura (volumen – 2,0 ml). La columna se expuso a una carga de 500 mg/ml de resina, con una concentración de carga de 27,7 mg/ml.

La columna se equilibró con 5VC de una solución que contenía Tris 50 mM, NaCl 2 M, pH 7,5 seguido de otra etapa de equilibrado que comprendía una solución de Tris 50 mM, a un pH de 8,2. La columna se cargó después a 500 mg de producto/ml de resina con el pico de Proteína A de la etapa anterior neutralizado y el producto se recuperó en el efluente de la columna durante el ciclo de carga y algunos volúmenes de columna de la fracción de lavado.

Estas condiciones de carga están en la región de partición débil. Se usaron estudios de unión discontinuos para medir el coeficiente de partición (Kp), y la unión del producto a altas concentraciones de proteína. A un pH de 8,2 y con un contenido de cloruro aproximado de 12 mM, el coeficiente de partición, Kp, se estimó que era de 1,9 (extrapolando de los conjuntos de datos de la exploración HTS).

Los niveles de PCH y de Proteína A se midieron en tres fracciones durante la fase de carga que representan exposiciones de carga de aproximadamente 250, 375 y 500 mg/ml de resina. Los resultados del Ejemplo 7.3 se presentan en la Tabla 14. Estos resultados demuestran que en el modo de partición débil, pueden conseguirse exposiciones muy elevadas al producto, sin revelación de impurezas. Se consiguió una excelente reducción tanto de PCH como de Proteína A, al igual que una reducción del 50 % en el contenido de APM. En comparación con los resultados operativos en el modo de flujo continuo de la Tabla 13, la retirada de impurezas fue mucho mejor en el

45

modo de partición débil.

Tabla 14: Retirada de PCH, de Proteína A y de APM para una exposición de carga TMAE de 500 mg/ml

	Fracción inicial (250 mg/ml)	Fracción intermedia (375 mg/ml)	Fracción final (500 mg/ml)	Mezcla de producto final (ppm)
PCH residual ppm (ng/mg de producto)	<7,6	<7,6	<7,6	<7,6
Valor Log de Retirada (VLR) de PCH	>3,5	>3,5	>3,5	>3,5
Protein A residual ppm (ng/mg de producto)	0,3	Sin determinar	0,1	0,6
Valor Log de Retirada (VLR) de ProA	2,9	Sin determinar	2,3	2,5
APM	Sin determinar	Sin determinar	Sin determinar	Doble retirada
*Las impurezas en la carga fueron de 25.398 ppm de PCH, de 99,5 ppm de Proteína A y de 2,3 % de APM				

Ejemplo 7.4. Procesos de columna en condiciones de partición débil (estudios de fuerza).

- 5 Para confirmar posterior el rendimiento de la columna TMAE en la región de partición débil, se diseñaron diversos procesos variando el pH y la concentración de NaCl en la carga para ensayar la fuerza del proceso. Todos los procesos se realizaron a una exposición de carga de 250 mg/ml de resina. Para generar el material de carga para estos procesos se realizaron diversos procesos de Proteína A Mabselect básicamente como se describe en el Ejemplo 7.2. El único factor que varió en estos procesos fue la concentración de cloruro sódico en la elución de Proteína A, que se modificó para coincidir con la concentración de NaCl en la carga TMAE para un experimento particular. Las columnas se equilibraron con tampones Equil 2 y se lavaron con tampones de Lavado que tenían aproximadamente el mismo pH y contenido de cloruro sódico de la carga.

- 15 Estas condiciones de carga están en la región de partición débil. Se usaron estudios de unión discontinuos para medir el coeficiente de partición (Kp). Los procesos se clasificaron por los coeficientes de partición indicados en la **Tabla 15**. El producto unido se determinó midiendo la proteína en la tira de la columna usando absorbancia UV y variaba de 7,8 a 25,3 mg/ml. Los resultados de Proteína A, PCH y APM de estos experimentos también se presentan en la **Tabla 15**. Se descubrió que la retirada de todas las impurezas era fuerte en los intervalos operativos que incluían 13,5-38,8 mM de cloruro total y pH 7,8-8,4.

Tabla 15. Estudios de fuerza en procesos sobre la retirada de PCH, Proteína A, y APM en modo PD

Concentración de NaCl (mM)	Kp	Producto unido (mg/ml)	pH	PCH en carga (ppm)	Proteína A en carga (ppm)	PCH (VLR)	Proteína A (VLR)	APM (veces)	Recuperación (%)
38,8	0,26	9,4	7,8	26,391	493,5	3,7	1,8	2,0	92
13,5	0,41	7,9	7,8	12,821	69,2	3,3	>1,9	1,8	87
27,4	0,50	8	8,0	23,465	252	3,6	2,2	3,2	91
18,5	0,73	7,8	8,0	21,626	308	3,7	>3,2	2,9	90
23,5	0,80	9,5	8,1	18,004	343	3,2	>3,2	3,5	94
27,7	0,86	9,5	8,2	24,821	280	3,6	>3,2	2,6	99
18,5	1,48	10	8,2	17,669	252	3,7	>3,1	3,9	95
22,0	5,35	25,3	8,4	29,293	533	3,6	>2,9	2,3	90
*Los niveles de impureza fueron de 38,5 ppm para ProA y de 51.943 ppm para PCH (Proceso 1), de 8,8 ppm para ProA y de 25.398 ppm para PCH (Proceso 2) + Incluye la contribución de iones Cl ⁻ de NaCl, tampones y titulantes.									

Ejemplo 7.5. Resumen

- A partir de estos estudios, puede observarse que la retirada de Proteína A (VLR) varía contundentemente con el K_p , mientras que el VLR de PCH es excelente en todos los valores del K_p a, o por encima de, 0,26, pero se reducen mucho a un $K_p = 0,17$ (en condiciones de flujo continuo). La retirada de proteínas de células hospedadoras (PCH) es sobre un log menor para las condiciones de flujo continuo en comparación con las condiciones de partición débil, incluso para una exposición de carga reducida. El producto unido varía de 7,8 a 25 mg/ml para estas condiciones de partición débil sobre esta combinación de resina y anticuerpo monoclonal. El coeficiente de partición parece ser óptimo entre $0,41 < K_p < 5,4$. No parece ser óptimo a un $K_p = 0,17$ y un producto unido de 1,4-3,3 mg/ml, las condiciones del Ejemplo 7.2.
- 5
- 10 Estos estudios sugieren un modo alternativo de purificación de un polipéptido producido usando cultivo celular en medios de diseño racional, que reducirán significativamente la presencia de impurezas, agregados de alto peso molecular, ADN, proteínas de células hospedadoras, etc.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular que comprende entre 7 mM a 30 mM de leucina, entre 7 mM a 30 mM de lisina, entre 7 mM a 30 mM de treonina, entre 7 mM a 30 mM de prolina y entre 7 mM a 30 mM de valina.
- 5 2. Un medio de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente comprende 3 mM o más de tirosina.
3. Un medio de cultivo celular de acuerdo con 1 o 2, en el que la concentración combinada de leucina, lisina, treonina, prolina y valina está comprendida entre 60 % a 80 % de la concentración de aminoácidos esenciales totales en el medio de cultivo celular.
- 10 4. Un medio de cultivo celular de acuerdo con 1 o 2, en el que la concentración combinada de los aminoácidos esenciales está comprendida entre 30 % a 50 % de la concentración de los aminoácidos totales.
5. Un medio de cultivo celular de acuerdo con cualquiera de 1 a 4, que comprende una concentración total de aminoácidos de entre 120 mM y 350 mM.
6. Un medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una concentración total de aminoácidos superior a 140 mM.
- 15 7. Un procedimiento para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:
 - (1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:
 - a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y
 - b. un medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
 - (2) mantener el cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés.
- 20 8. El procedimiento de la reivindicación 7, que adicionalmente comprende un procedimiento de recuperación de un polipéptido purificado de un fluido de carga, que comprende las etapas de:

hacer pasar el fluido de carga a través de un medio en una columna en condiciones operativas que hacen que el medio se una a al menos 2,8 mg de polipéptido por ml de medio, en el que el medio es seleccionado del grupo que consiste en un medio de intercambio iónico cargado, una resina de cromatografía de interacción hidrófoba, y

- 25 una resina de cromatografía de afinidad metálica inmovilizada; y recuperar el polipéptido purificado del efluente de la columna.
- 9. El procedimiento de la reivindicación 7, que adicionalmente comprende un procedimiento de recuperación de un polipéptido purificado de un fluido de carga, que comprende las etapas de:

hacer pasar el fluido de carga a través de un medio en una columna en condiciones operativas definidas por un

- 30 coeficiente de partición de al menos 0,1; y recuperar el polipéptido purificado del efluente de la columna.
- 10. Un procedimiento para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende:
 - (1) proporcionar un cultivo celular, que comprende:
 - a. células, que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés; y
 - 35 b. un medio de cultivo celular de partida, en el que el volumen del medio de cultivo celular de partida es de 60-90 % del volumen de un volumen del medio de cultivo celular deseado;
 - (2) proporcionar, al cultivo celular, un medio de cultivo celular de suministro de acuerdo con la etapa (1), en el que el volumen del medio de cultivo celular de suministro es de 1-40 % del volumen del medio de cultivo celular deseado, y en el que el medio de cultivo celular deseado resultante es un medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
 - 40 (3) mantener el cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés.
- 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el cultivo celular es un cultivo celular a gran escala.
- 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que las células son células animales.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 10 a 12, en el que el polipéptido está purificado.
- 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el medio es un medio definido.

Figura 1

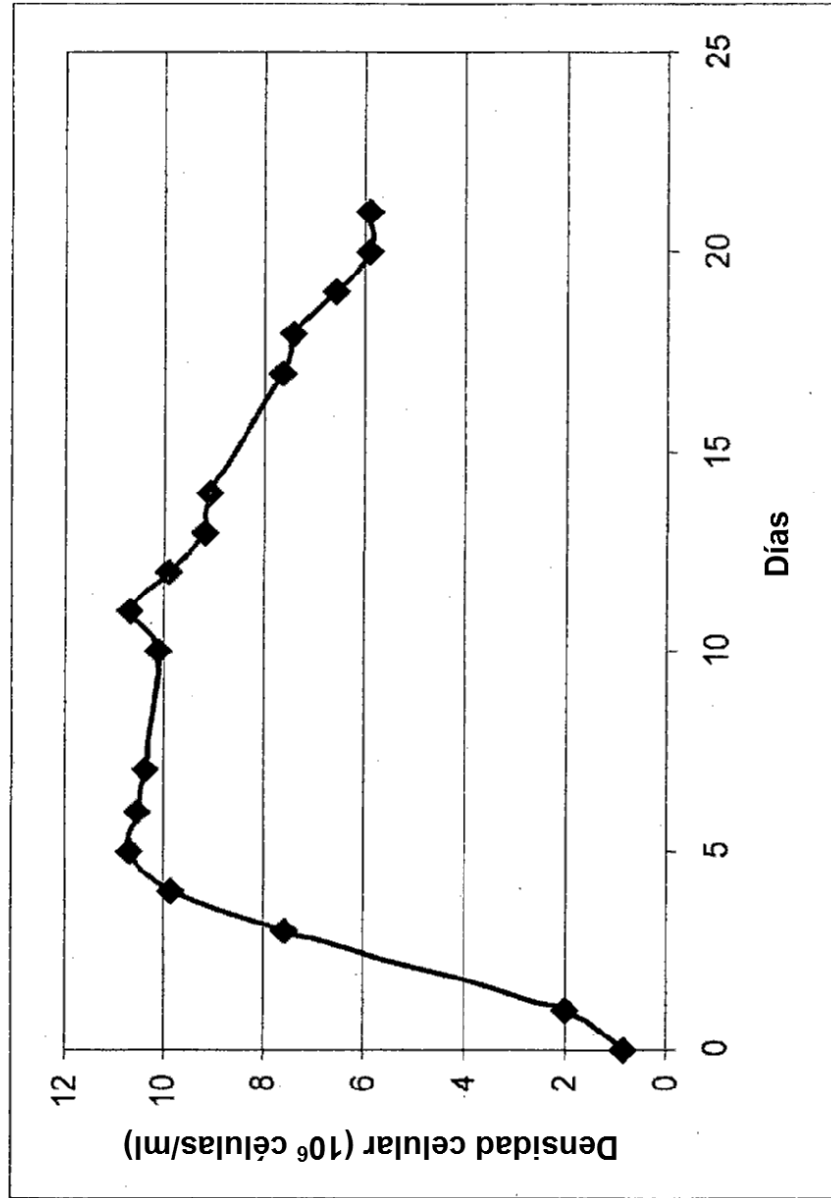


Figura 2

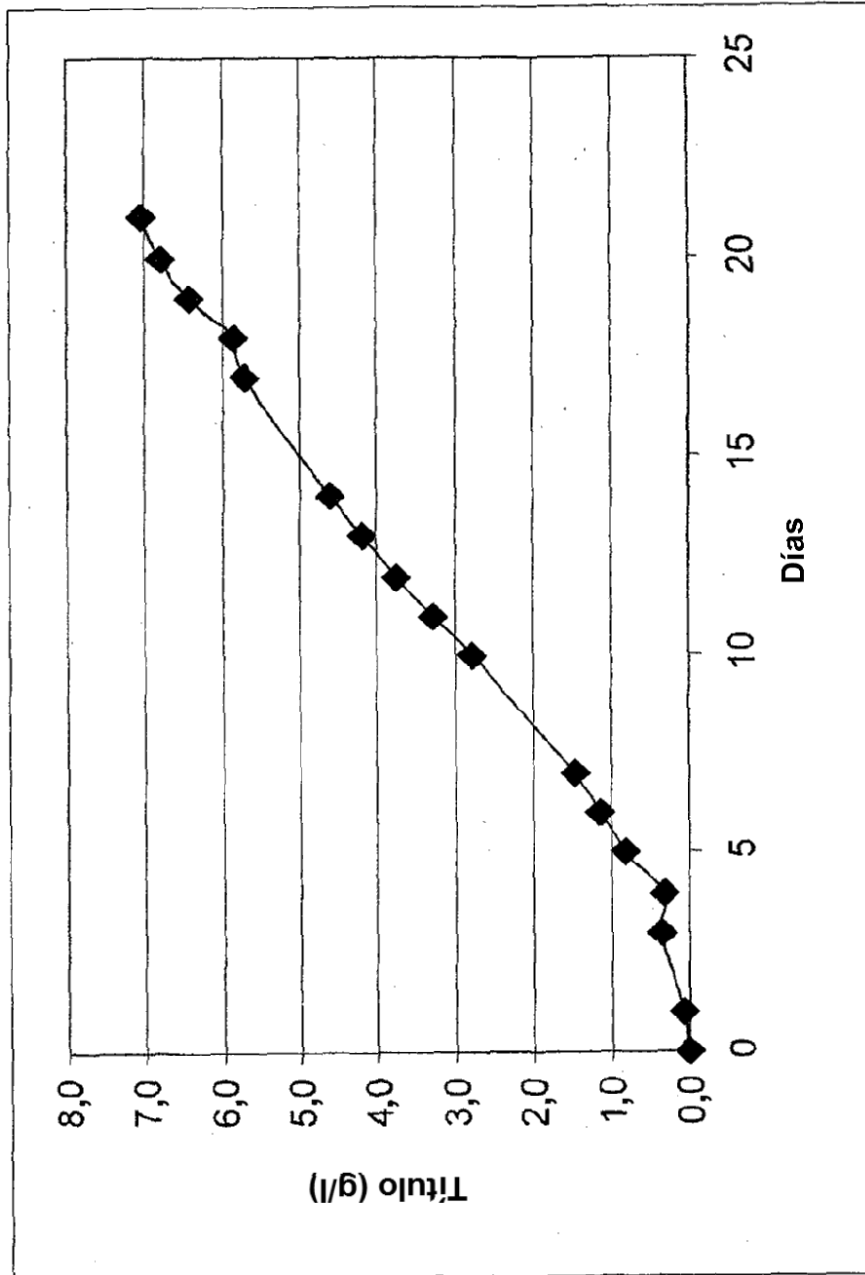


Figura 3

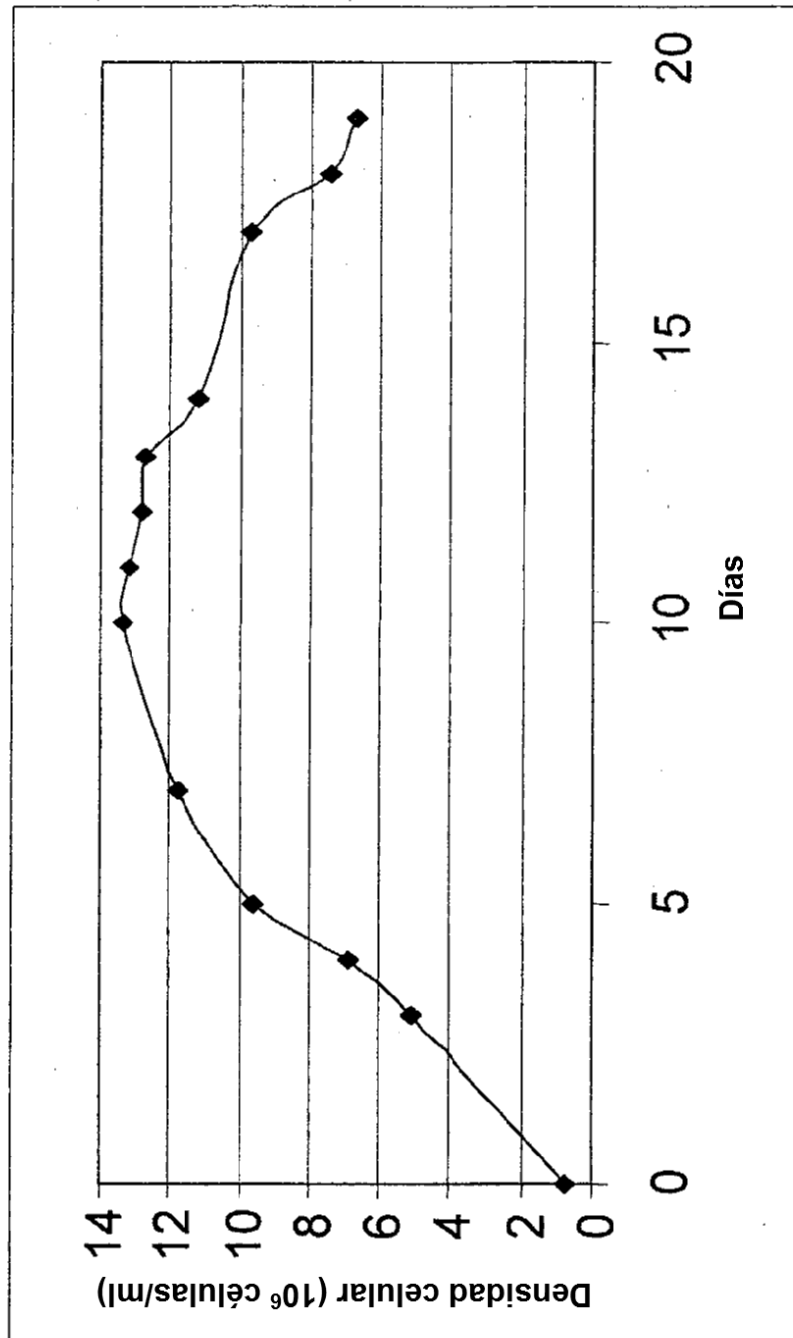


Figura 4

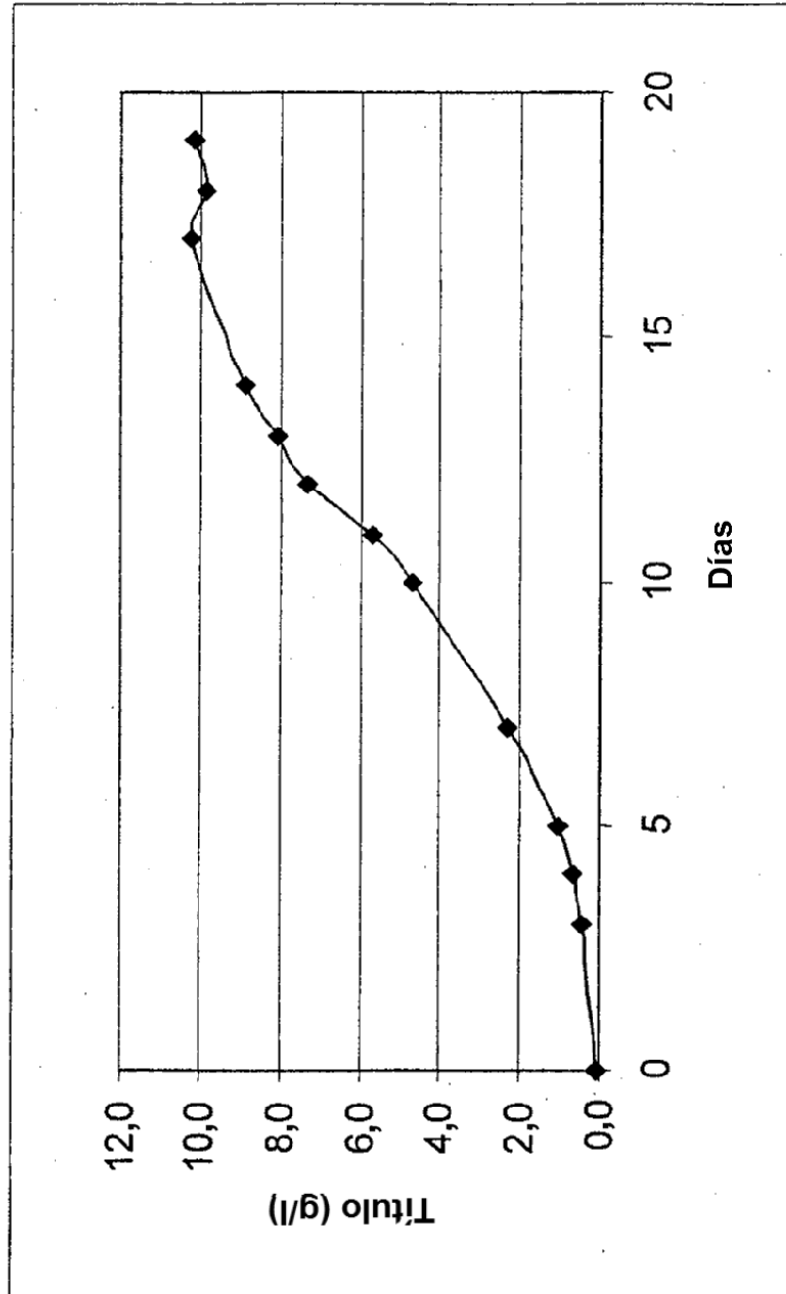


Figura 5

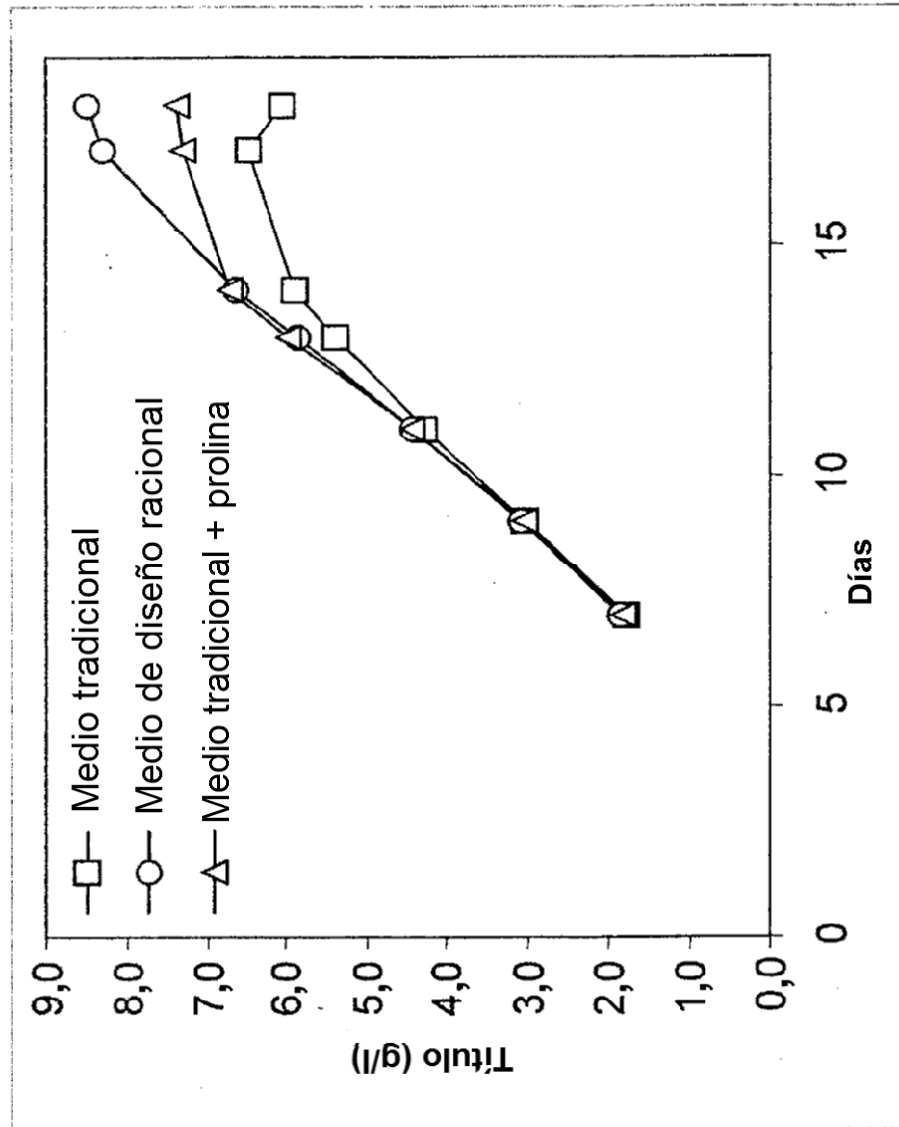


Figura 6

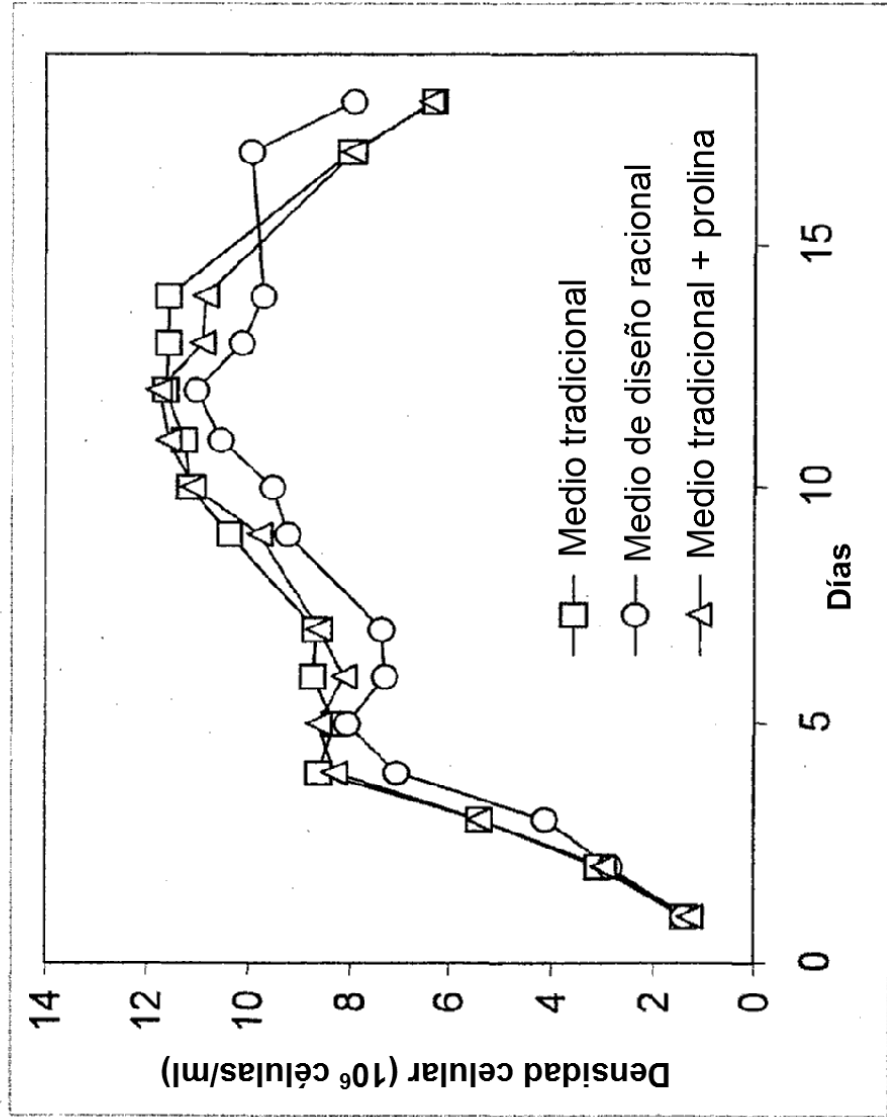


Figura 7

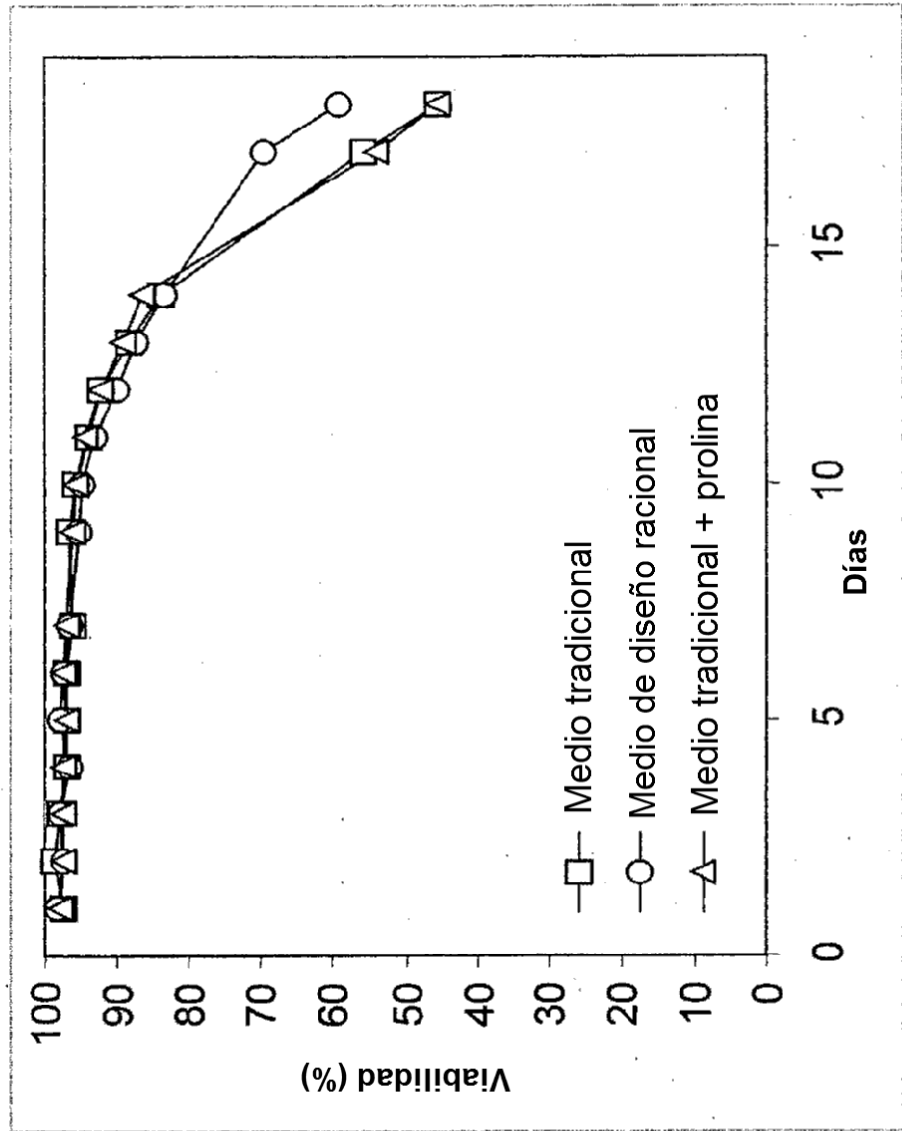


Figura 8A

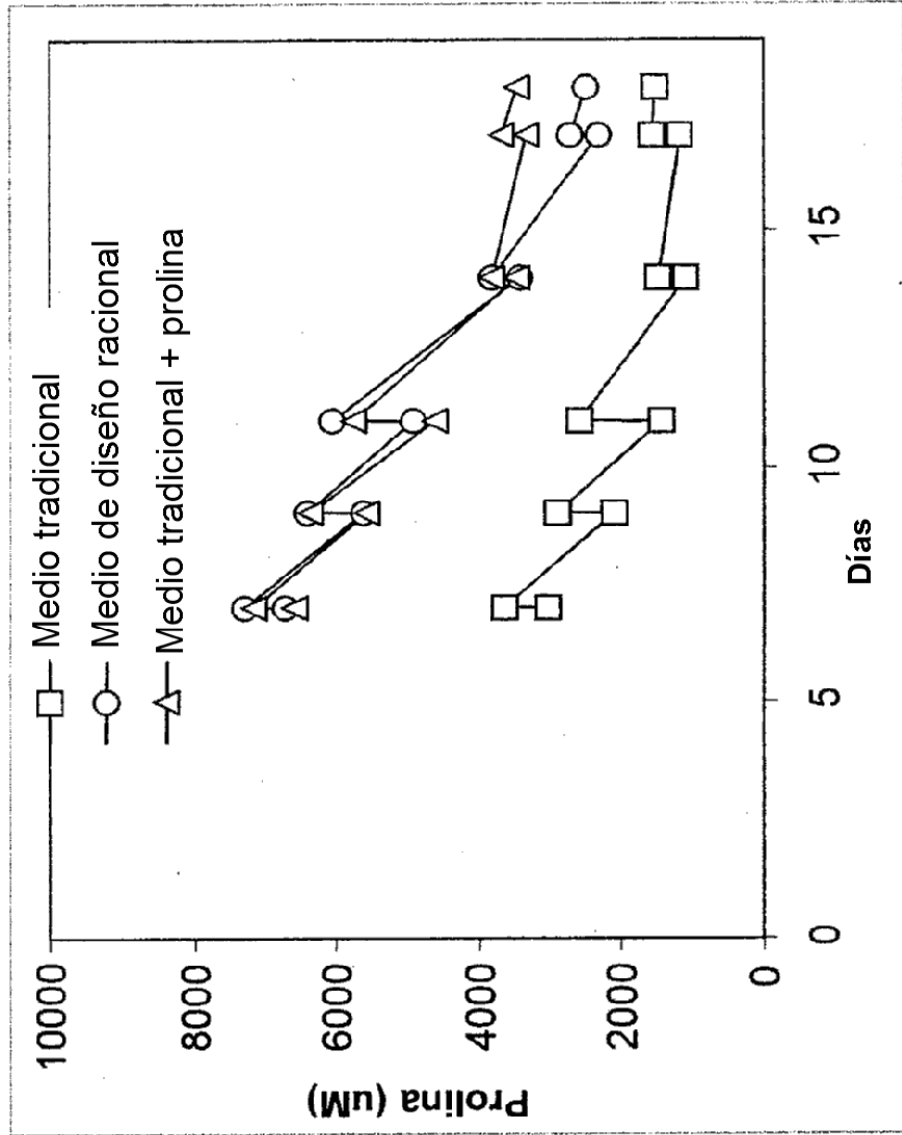


Figura 8B

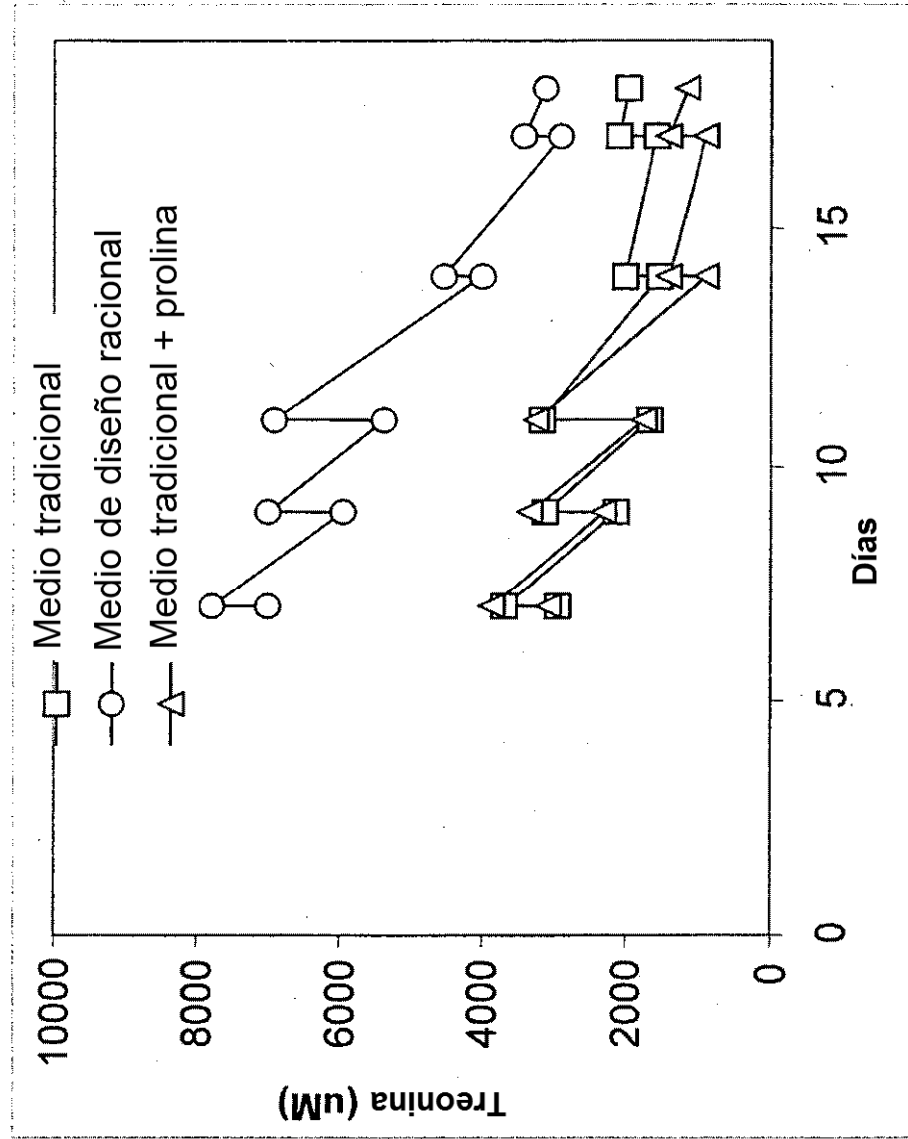


Figura 8C

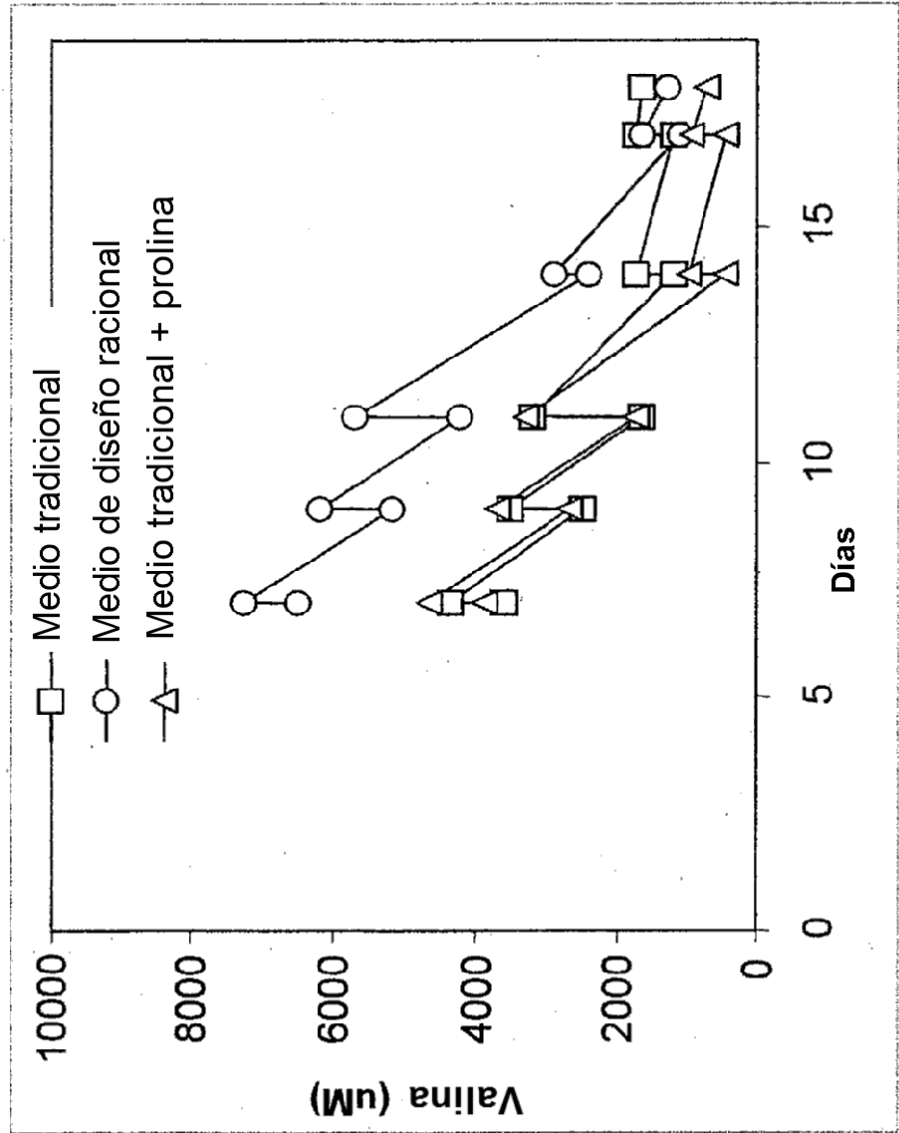


Figura 8D

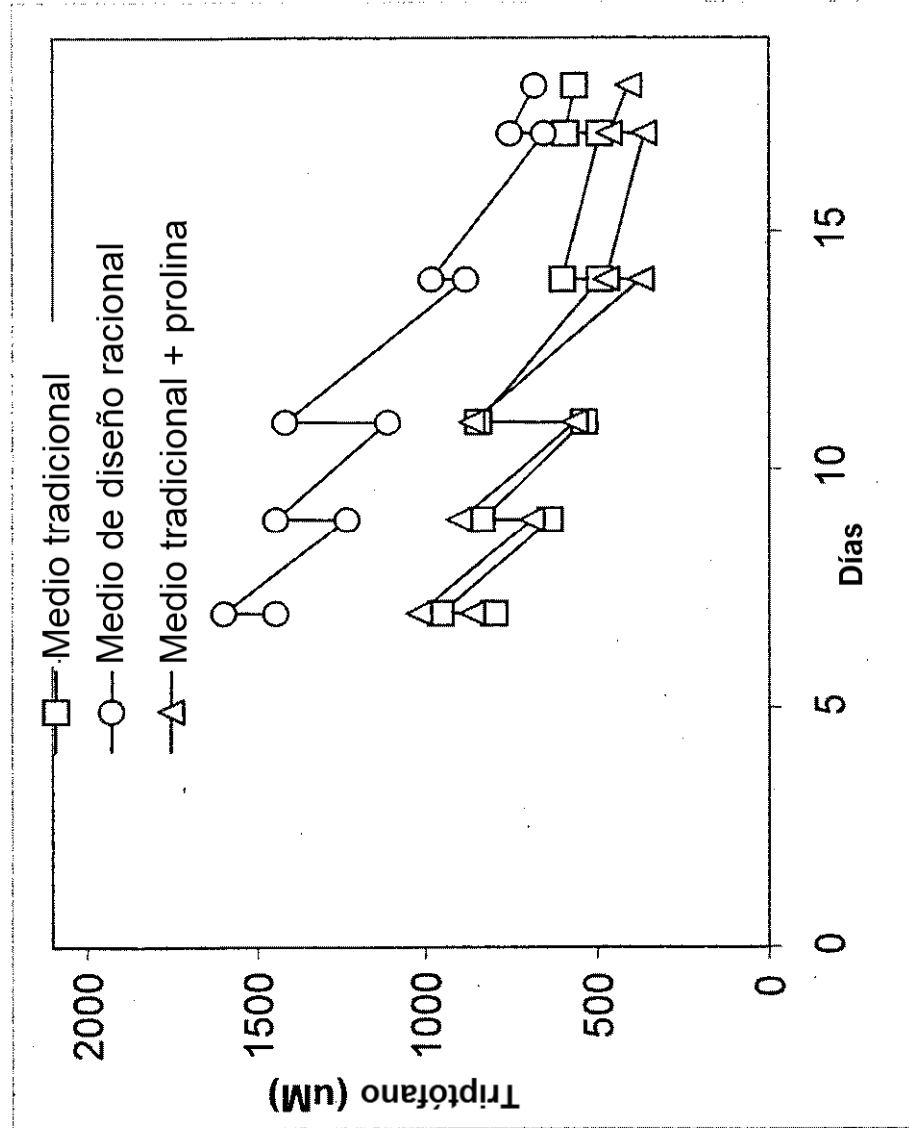


Figura 8E

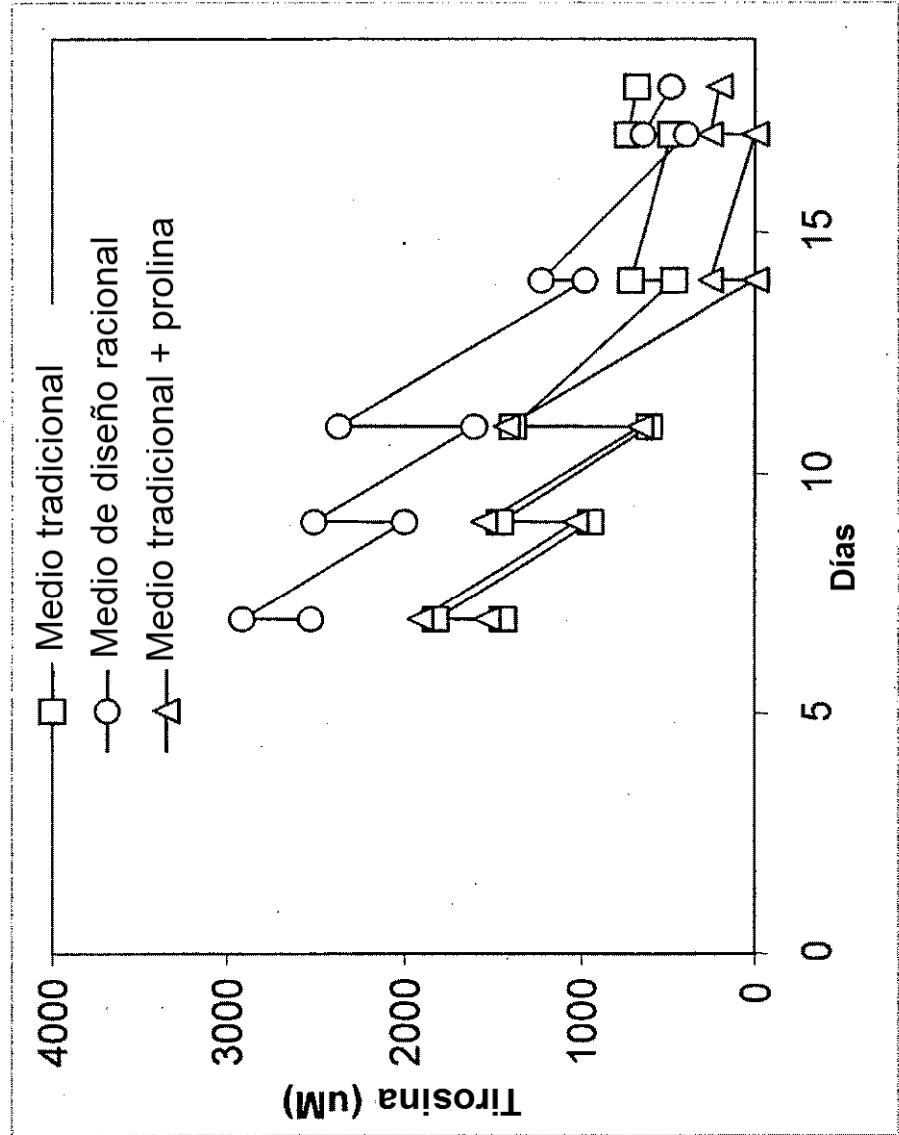


Figura 9

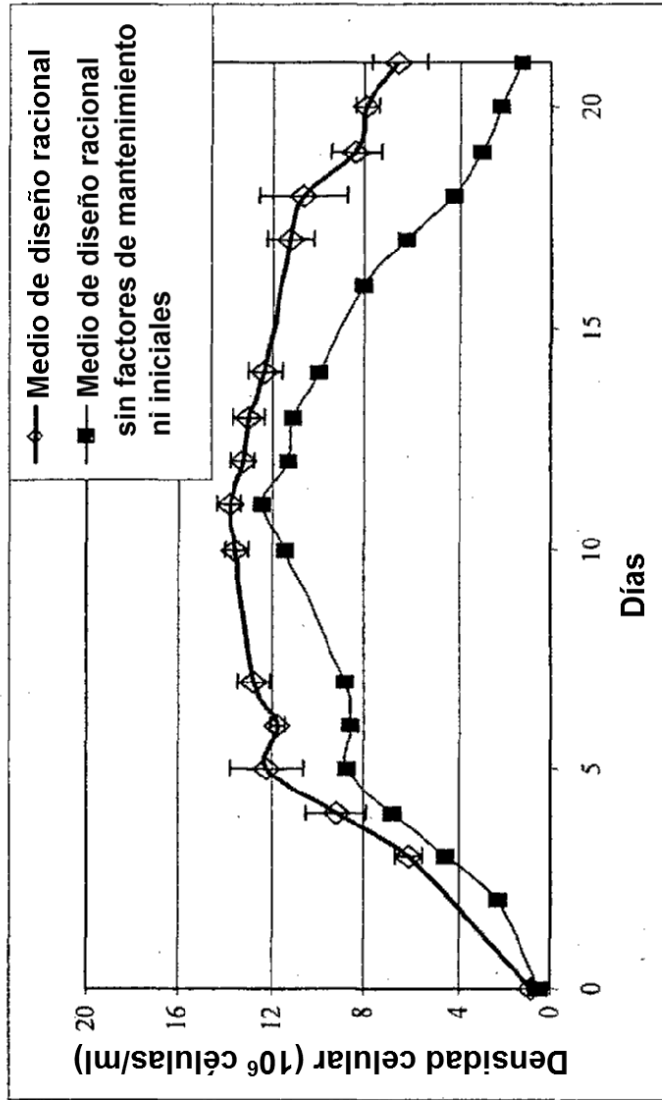


Figura 10

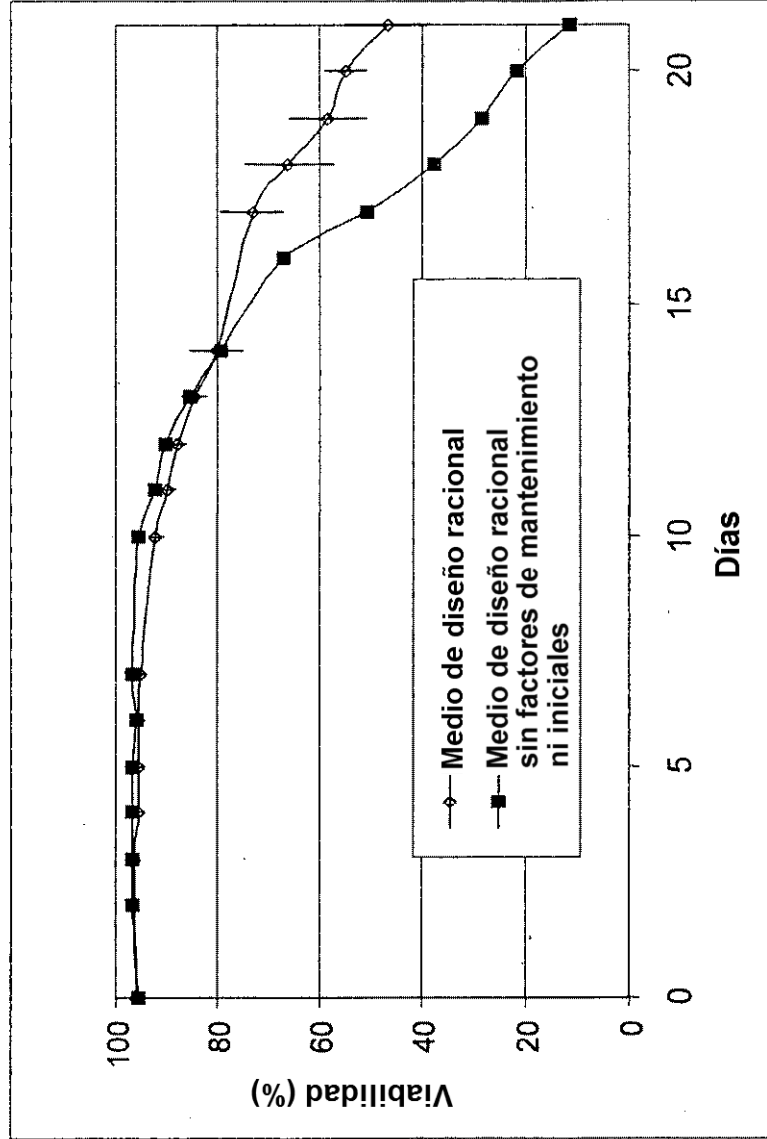


Figura 11

