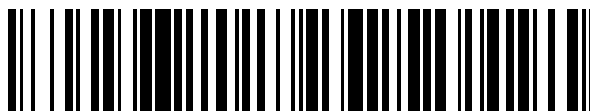


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 454**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C07K 14/435** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08731084 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2115126**

54 Título: **Uso de cobre y glutamato en cultivos celulares para producción de polipéptidos**

30 Prioridad:

**02.03.2007 US 892749 P**

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

**20.07.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DRAPEAU, DENIS;  
SNOW, JESSICA;  
HILLER, GREGORY y  
LUAN, YEN-TUNG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 541 454 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**

Uso de cobre y glutamato en cultivos celulares para producción de polipéptidos

**Referencia cruzada con Solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud está en tramitación junto con, comparte al menos un inventor común con, y reivindica la prioridad a, la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/892.749 presentada el 2 de marzo de 2007.

**Antecedentes**

10 Las proteínas y polipéptidos han llegado a convertirse gradualmente en importantes agentes terapéuticos. En la mayoría de los casos, estas proteínas y polipéptidos se producen en cultivos celulares, a partir de células que se han modificado y/o seleccionado para producir niveles inusualmente altos de la proteína o polipéptido particular de interés. El control y optimización de las condiciones del cultivo celular son importantes para el éxito de la producción comercial de proteínas y polipéptidos.

15 Muchas proteínas y polipéptidos producidas en cultivos celulares se fabrican en un proceso discontinuo o semicontinuo, en el que las células se cultivan durante un periodo de tiempo, y luego se termina el cultivo y se aíslan la proteína o polipéptido producidos. De manera alternativa, las proteínas o polipéptidos se pueden producir en un proceso de cultivo celular de perfusión en el que el cultivo no se termina y se añaden nuevos nutrientes y otros componentes periódica o continuamente al cultivo, y durante el cual la proteína o polipéptido que se expresa se recolecta periódica o continuamente. La cantidad final y la calidad de la proteína o polipéptido producidos pueden 20 afectarse drásticamente por las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, los procesos tradicionales discontinuos o semicontinuos a menudo dan como resultado proteínas o polipéptidos que están mal plegados y/o están en forma de agregados. El aumento de los niveles de proteínas o polipéptidos mal plegados y/o agregados tiende a producir rendimientos totales más bajos o proteínas o polipéptidos plegados correctamente y/o no agregados. Además, los procesos tradicionales discontinuos o semicontinuos a menudo dan como resultado proteínas o polipéptidos con patrones de glucosilación menos extensos o indeseables por otra razón.

25 Un sistema de producción de proteínas o polipéptidos que se plieguen correctamente, se agreguen menos fácilmente o tengan un patrón de glucosilación más deseable podría dar como resultado un agente terapéutico proteico o polipeptídico con mayor potencia y menos efectos secundarios. Por lo tanto, existe una necesidad de sistemas y composiciones mejoradas que den como resultado una producción de una proteína o polipéptido que se pliegue correctamente, se agregue menos y/o tenga un patrón de glucosilación más deseable. Existe una necesidad particular de desarrollo de sistemas mejorados para producir proteínas o polipéptidos en un cultivo celular que se 30 cultiven en medios definidos.

Los documentos US6048728, WO2006108455, US6162643, US6103529 y US4767704 se refieren al procedimiento de cultivo celular.

**Sumario**

35 La presente invención proporciona sistemas mejorados para la producción a gran escala de proteínas y/o polipéptidos en cultivos celulares. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un sistema para producir una proteína o polipéptido en un medio de cultivo celular que comprende cobre. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un sistema para producir una proteína o polipéptido en un medio de cultivo celular que comprende glutamato. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un sistema de producción de una proteína o polipéptido en un medio de cultivo celular que comprende tanto cobre como glutamato. En ciertas 40 realizaciones, los medios de cultivo celular de la presente invención se utilizan para cultivar células de mamífero que expresan la proteína o polipéptido de interés.

45 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona procedimientos de cultivo a gran escala (por ejemplo, 500 l o más) que utilizan un medio que contiene cobre y/o glutamato. En ciertas realizaciones, los procedimientos de cultivo como se enseña en la presente divulgación incluyen uno o más cambios de temperatura durante el curso del cultivo celular. De acuerdo con ciertos aspectos de la presente invención, el uso de tales procedimientos da como resultado niveles mayores de proteínas o polipéptidos plegados correctamente que los que se observarían en un polipéptido que se cultive en un medio por otra parte idéntico bajo condiciones de cultivo por otra parte idénticas. Además, de acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, el uso de tales procedimientos da como resultado la producción de un polipéptido con un patrón más extenso o por otra parte más deseable que el que se 50 observaría en un polipéptido que se cultive en un medio por otra parte idéntico bajo condiciones de cultivo por otra parte idénticas. En ciertas realizaciones, el uso de tales procedimientos da como resultado la producción de un polipéptido con un aumento de la sialilación total que la que se observaría en un polipéptido que se cultive en un medio por otra parte idéntico bajo condiciones de cultivo por otra parte idénticas.

55 Un experto en la técnica comprenderá que las formulaciones de los medios de la presente divulgación engloban medios tanto definidos como complejos. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo es un medio definido en que la composición del medio se conoce y se controla.

5 En algunas realizaciones, las células se cultivan bajo una o más de las condiciones que se describen en las Solicitudes de Patentes de Estados Unidos N<sup>os</sup> de serie 11/213.308, 11/213.317 y 11/213.633, cada una de las cuales se presentó el 25 de agosto de 2005. En algunas realizaciones, las células se cultivan bajo una o más de las condiciones descritas en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N<sup>o</sup> de serie 60/830.658, presentada el 13 de julio de 2006. En algunas realizaciones, las células se cultivan bajo una o más de las condiciones descritas en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N<sup>o</sup> de serie 60/856.615, presentada el 3 de noviembre de 2006.

10 Los cultivos celulares de la presente invención se pueden suplementar opcionalmente con nutrientes y/u otros componentes del medio que incluyen por ejemplo hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y/o fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, y/o glucosa u otras fuentes de energía. En ciertas realizaciones, puede ser beneficioso suplementar los medios con uno o más inductores químicos tales como hexametileno-bis (acetamida) ("HMBA") y butirato sódico ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al principio del cultivo o se pueden añadir en un punto más tarde con el fin de rellenar los nutrientes gastados o por otra razón. En ciertas realizaciones, es deseable seleccionar la composición inicial del medio para minimizar la suplementación de acuerdo con la presente invención.

15 En ciertas realizaciones, el tiempo total que se deja transcurrir un cultivo celular determinado está aumentado significativamente más allá de los tiempos de cultivo tradicionales, aumentando de esta manera el rendimiento y la calidad de cualquier polipéptido que se produzca en el cultivo celular y proporcionando una mayor flexibilidad al facultativo para determinar el tiempo apropiado u óptimo en el que las células cultivadas expresan un polipéptido de interés.

**Breve descripción de los dibujos**

25 La Figura 1 muestra la densidad celular integrada viable (IVCD) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

La Figura 2 muestra la productividad específica acumulativa (Qp) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

La Figura 3 muestra los niveles de glutamato de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

30 La Figura 4 muestra los niveles de lactato de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

La Figura 5 muestra el nivel relativo del Día 10 de la TNFR-Ig mal plegada y/o agregada que se produce y el título a Día 10 de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

La Figura 6 muestra la densidad celular integrada viable (IVCD) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 4.

35 La Figura 7 muestra la productividad específica acumulativa (Qp) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 4.

La Figura 8 muestra los niveles de glutamato de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritos en la Tabla 4.

40 La Figura 9 muestra los niveles de lactato de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritos en la Tabla 4.

La Figura 10 muestra el nivel relativo del Día 10 de la TNFR-Ig mal plegada y/o agregada que se produce y el título a Día 10 de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 4.

La Figura 11 muestra la densidad celular integrada viable (IVCD) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5.

45 La Figura 12 muestra la productividad específica acumulativa (Qp) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5.

La Figura 13 muestra los niveles de glutamato de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5.

50 La Figura 14 muestra los niveles de lactato de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5.

La Figura 15 muestra el nivel relativo del Día 10 de la TNFR-Ig mal plegada y/o agregada que se produce y el

título a Día 10 de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5.

La Figura 16 muestra la TNFR-Ig mal plegada y/o agregada como un porcentaje de una muestra TNFR-Ig de referencia los días 8 y 10 para los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 4.

5 La Figura 17 muestra la TNFR-Ig mal plegada y/o agregada como un porcentaje de una muestra TNFR-Ig de referencia los días 8, 10 y 12 para los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5.

La Figura 18 muestra la sialilación de la TNFR-Ig como un porcentaje de una muestra TNFR-Ig de referencia los días 8 y 10 para los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritos en la Tabla 4.

10 La Figura 19 muestra la sialilación de la TNFR-Ig como un porcentaje de una muestra TNFR-Ig de referencia los días 8 y 10 para los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritos en la Tabla 5.

### **Definiciones**

15 “Aminoácido”: El término “aminoácido” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos de origen natural que se utilizan normalmente en la formación de polipéptidos, análogos o derivados de esos aminoácidos o cualquier aminoácido de origen no natural. En ciertas realizaciones, los aminoácidos de la presente divulgación se proporcionan en un medio de cultivo celular. Los aminoácidos proporcionados en el medio se pueden proporcionar como sales o en forma de hidrato.

20 “Anticuerpo”: El término “anticuerpo” como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno, tales como un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub>. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo natural típico conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, una glucoproteína que comprende cuatro cadenas de polipéptido; dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla comprende una variante de un anticuerpo natural típico en el que dos o más miembros de la cadena pesada y/o ligera se han unido covalentemente, por ejemplo, por medio de un enlace peptídico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de cadena sencilla es una proteína que tiene dos estructuras de cadena polipeptídica que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, en la que las cadenas están estabilizadas, por ejemplo por engarces peptídicos intercatenarios, en que la proteína tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo compuesto solamente por cadenas pesadas tales como, por ejemplo, los que se encuentran naturalmente en miembros de la familia Camelidae, que incluyen las llamas y camellos (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Números 6.765.087 de Casterman y col., 6.015.695 de Casterman y col., y 6.005.079 de Casterman y col.). Las expresiones “anticuerpos monoclonales” y “composición de anticuerpo monoclonal”, como se utilizan en el presente documento, se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie de un sitio de unión al antígeno y por lo tanto habitualmente interactúa solo con un único epítipo de un antígeno particular. Las composiciones de anticuerpo monoclonal muestran por lo tanto típicamente una única afinidad de unión por un epítipo particular con el que inmunorreaccionan. En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado, en el que la gran mayoría de los restos de aminoácido derivan de anticuerpos humanos, minimizando de esta manera cualquier reacción inmunitaria potencial cuando se suministran a un sujeto humano. Las expresiones “anticuerpos policlonales” y “composición de anticuerpos policlonales” se refieren a poblaciones de moléculas de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión al antígeno que interactúan con un antígeno particular.

45 “Cultivo discontinuo”: La expresión “cultivo discontinuo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que todos los componentes que se utilizarán en último término en el cultivo de células, incluyendo el medio (véase la definición de “medio” posteriormente) así como las células por sí mismas, se proporcionan al principio del proceso de cultivo. Un cultivo discontinuo se para típicamente en algún punto y las células y/o componentes del medio se recolectan y opcionalmente se purifican.

50 “Biorreactor”: El término “biorreactor” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier recipiente útil para el crecimiento de un cultivo celular. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño siempre y cuando sea útil para el cultivo de células. En ciertas realizaciones, tales células son células de mamífero. Típicamente el biorreactor será de al menos 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre los anteriores. Las condiciones internas del biorreactor, que incluyen, pero no se limitan al pH y la temperatura, se controlan opcionalmente durante el periodo de cultivo. El biorreactor puede estar compuesto por cualquier material que sea adecuado para mantener cultivos de células de mamífero suspendidas en los medios bajo las condiciones de cultivo de la presente invención, que incluyen cristal, plástico o metal. La expresión “biorreactor de producción” como se utiliza en el presente documento se refiere al biorreactor final que se utiliza en la producción del polipéptido o glucoproteína de interés. El volumen del biorreactor de producción es típicamente de al menos 500 litros y puede ser de 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre los anteriores. Un experto en la técnica será consciente de y será capaz de elegir los biorreactores adecuados para

su uso en la práctica de la presente invención.

“Densidad celular”: La expresión “densidad celular” como se utiliza en el presente documento se refiere a el número de células presente en un volumen determinado de medio.

5 “Viabilidad celular”: La expresión “viabilidad celular” como se utiliza en el presente documento se refiere a la capacidad de las células en el cultivo para sobrevivir bajo un grupo determinado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. La expresión como se utiliza en el presente documento se refiere también a la porción de células que están vivas en un momento particular en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

10 “Medio complejo”: La expresión “medio complejo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un medio que contiene al menos un componente cuya identidad o cantidad o no se conoce o está descontrolada.

15 “Cultivo”, “Cultivo celular”: Estos términos como se utilizan en el presente documento se refieren a una población celular que están suspendidas en un medio (véase la definición de “medio” posteriormente) bajo condiciones adecuadas para la supervivencia y/o crecimiento de la población celular. Como estará claro por el contexto para los expertos en la técnica, estos términos como se utilizan en el presente documento se refieren también a la combinación que comprende la población celular y el medio en el que está suspendida la población. En ciertas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo celular mamífero.

“Medio definido”: La expresión “medio definido” como se utiliza en el presente documento se refiere a un medio en el que la composición del medio es tanto conocida como controlada.

20 “Cultivo semicontinuo”: La expresión “cultivo semicontinuo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que se proporcionan componentes adicionales que comprenden típicamente componentes nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Adicional o alternativamente, tales componentes adicionales pueden incluir componentes suplementarios (véase la definición de “componentes suplementarios” posteriormente). En ciertas realizaciones, tales componentes adicionales se proporcionan en un medio de alimentación (véase la definición de “medio de alimentación” posteriormente). Un cultivo semicontinuo típicamente se para en algún momento y las células y/o componentes del medio se recolectan y opcionalmente se purifican.

30 “Medio de alimentación”: La expresión “medio de alimentación” como se utiliza en el presente documento se refiere a una solución que contiene nutrientes que nutren el crecimiento de células de mamífero que se añade después del comienzo del cultivo celular. Un medio de alimentación puede contener componentes idénticas a las que se proporcionan en el medio de cultivo celular inicial. Adicional o alternativamente, un medio de alimentación puede contener uno o más componentes más allá de los que se proporcionan en el medio de cultivo celular inicial. Adicional o alternativamente, un medio de alimentación puede carecer de uno o más componentes que se proporcionaron en el medio de cultivo celular inicial. En ciertas realizaciones, uno o más componentes de un medio de alimentación se proporcionan a concentraciones o niveles idénticos o similares a las concentraciones o niveles a los que los componentes se proporcionaron en el medio de cultivo celular inicial. En ciertas realizaciones, uno o más componentes de un medio de alimentación se proporcionan a concentraciones o niveles diferentes de las concentraciones o niveles a los que los componentes se proporcionaron en el medio de cultivo celular inicial. Los medios de alimentación ejemplares se muestran en la Tabla 2, aunque la presente divulgación no se limita al uso de estos medios. Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar medios de alimentación alternativos y/o que se pueden hacer ciertas alteraciones en las composiciones de los medios de alimentación ejemplares enumerados en la Tabla 2. En ciertas realizaciones, un medio de alimentación contiene componentes suplementarios (véase la definición de “componentes suplementarios” posteriormente).

45 “Fragmento”: El término “fragmento” como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido que se define como cualquier porción distinta de un polipéptido determinado que es única o característica de ese polipéptido. El término como se utiliza en el presente documento también se refiere a cualquier porción diferenciada de un polipéptido determinado que mantiene al menos una fracción de la actividad del polipéptido de longitud completa. En ciertas realizaciones, la fracción de actividad que se mantiene es al menos del 10% de la actividad del polipéptido de longitud completa. En ciertas realizaciones, la fracción de actividad que se mantiene es al menos del 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la actividad del polipéptido de longitud completa. En ciertas realizaciones, la fracción de actividad que se mantiene es al menos del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la actividad del polipéptido de longitud completa. En ciertas realizaciones, la fracción de actividad que se mantiene es del 100% o más de la actividad del polipéptido de longitud completa. Alternativa o adicionalmente, el término como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier porción de un polipéptido determinado que incluye al menos un elemento de secuencia establecida que se encuentra en el polipéptido de longitud completa. En algunas realizaciones, el elemento de secuencia abarca al menos 4-5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

“Gen”: El término “gen” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, ADN o ARN, que codifica al menos un producto final diferenciado, típicamente, pero sin limitarse a un polipéptido.

Opcionalmente, el término se refiere no solo a la secuencia codificante que codifica el polipéptido u otro producto final diferenciado, sino que también puede englobar regiones que preceden y/o siguen a la secuencia codificante que modulan el nivel básico de expresión (véase la definición de “elemento genético de control” posteriormente), así como las secuencias de intervención (“intrones”) entre los segmentos codificantes individuales (“exones”).

5 “Elemento genético de control”: La expresión “elemento genético de control” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier elemento de secuencia que modula la expresión de un gen al que está unido operativamente. Los elementos genéticos de control pueden funcionar aumentando o disminuyendo los niveles de expresión y se pueden localizar antes, en o después de la secuencia codificante. Los elementos genéticos de control pueden actuar en cualquier estadio de la expresión genética, regulando, por ejemplo, el inicio, la elongación o la terminación de la transcripción, el corte y empalme de ARNm, edición de ARNm, estabilidad del ARNm, localización del ARNm en la células, inicio, elongación o terminación de la traducción, o cualquier otro estadio de la expresión genética. Los elementos genéticos de control pueden funcionar individualmente o en combinación unos con otros.

10 “Glucoproteína”: El término “glucoproteína” como se utiliza en el presente documento se refiere a una proteína o polipéptido que contiene una o más cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Las cadenas de oligosacáridos pueden estar compuestas por un único resto de azúcar, una única cadena no ramificada de restos de azúcar o una cadena de restos de azúcares que se ramifica una o más veces. Las cadenas de oligosacáridos pueden estar unidas a N o unidas a O.

15 “Patrón de glucosilación”. La expresión “patrón de glucosilación” se refiere a la glucosilación que se observa en una glucoproteína o glucoproteínas determinadas. Se dice que una glucoproteína con un mayor número de restos de azúcar unidos covalentemente en su cadena(s) de oligosacárido tiene un patrón de glucosilación aumentado o más extenso. Por el contrario, se dice que una glucoproteína con menos restos de azúcar unidos covalentemente en su cadena(s) de oligosacárido tiene un patrón de glucosilación disminuido o menos extenso. La expresión “patrón de glucosilación” como se utiliza en el presente documento también se refiere a una distribución característica de varios patrones de glucosilación en glucoproteínas individuales que se expresan de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. En este sentido, un aumento del patrón de glucosilación se refiere a un aumento de la distribución característica de los patrones de glucosilación de las glucoproteínas que se expresan.

20 “Célula huésped”: La expresión “célula huésped” como se utiliza en el presente documento se refiere a una células que se cultiva en un cultivo de acuerdo con la presente invención para producir una proteína o polipéptido de interés. La expresión se refiere también a una célula que se modifica de acuerdo con la presente invención para producir una glucoproteína. En ciertas realizaciones, la glucoproteína producida en la célula huésped muestra un patrón de glucosilación más extenso y/o más deseable cuando se producen de acuerdo con los procedimientos y en las composiciones que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero.

25 “Hibridoma”: El término “hibridoma” como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula o progenitor de una células que resulta de la fusión de una célula inmortalizada y una células productora de anticuerpos. El hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales para crear el hibridoma pueden ser de cualquier fuente mamífera, que incluye, pero no se limita a una rata, cerdo, conejo, oveja, cabra, y ser humano. El término también engloba líneas celulares de trioma, que resulta cuando progenitores de fusiones heterohíbridas de mieloma, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, se fusionan posteriormente con una célula plasmática. Además, el término significa que incluye cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos tales como, por ejemplo cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein y col., Nature, 537:3053, 1983).

30 “Densidad celular integrada viable”, “IVCD”: Las expresiones “densidad celular integrada viable” o “IVCD” como se utiliza en el presente documento se refiere a la densidad media de células viables durante el curso del cultivo multiplicada por la cantidad de tiempo de ejecución del cultivo. Cuando la cantidad de polipéptido y/o proteína producidos es proporcional al número de células viables presentes durante el curso del cultivo, la densidad celular integrada viable es una herramienta útil para estimar la cantidad de polipéptido y/o proteína que se produce durante el curso del cultivo.

35 “Medio”, “medio de cultivo celular”, “medio de cultivo”: Estas expresiones como se utilizan en el presente documento se refieren a una solución que contiene nutrientes que alimentan las células en crecimiento. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo es útil para cultivar células de mamífero. Típicamente, un medio de cultivo proporciona aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos, y elementos traza que necesitan las células para un mínimo crecimiento y/o su supervivencia. Un medio de cultivo puede contener también componentes suplementarios (véase la definición de “componentes suplementarios” posteriormente) que aumentan el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen, pero no se limitan a hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, y/o glucosa u otras fuentes de energía. En ciertas realizaciones, un medio se formula ventajosamente a un pH y concentración de sales óptima para la supervivencia y proliferación celular. Los medios de cultivo ejemplares se muestran en la Tabla 1, aunque la presente invención no se limita al uso de

estos medios. Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar medios de cultivo alternativos y/o se pueden hacer ciertas alteraciones en las composiciones de los medios de cultivo ejemplares enumerados en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, el medio es un medio de alimentación que se añade después del inicio del cultivo celular (véase la definición de “medio de alimentación”, posteriormente). En ciertas realizaciones, el medio de cultivo celular es una mezcla de una solución de nutrientes inicial y cualquier medio de alimentación que se añade después del inicio del cultivo celular.

“Producto de desecho metabólico”: La expresión “producto de desecho metabólico” como se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto producido por un cultivo celular como resultado de los procesos metabólicos normales o no normales que de alguna manera son perjudiciales para el cultivo celular, particularmente en relación con la expresión o actividad de un polipéptido o proteína recombinante que se desean. Por ejemplo, los productos de desecho metabólico pueden ser perjudiciales para el crecimiento o viabilidad del cultivo celular, pueden disminuir la cantidad del polipéptido o proteína recombinante que se produce, pueden alterar el plegamiento, la estabilidad, agregación, glucosilación u otra modificación post-traducciona del polipéptido o proteína que se expresa, o pueden ser perjudiciales para las células y/o la expresión o actividad del polipéptido o proteína recombinante de otras varias maneras. Los productos de desecho metabólico ejemplares incluyen el lactato, que se produce como resultado del metabolismo de la glucosa, y amonio, que se produce como resultado del metabolismo de la glutamina. Un cultivo celular puede producir uno o más de un producto de desecho metabólico.

“Polipéptido”: El término “polipéptido” como se utiliza en el presente documento se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos juntos por medio de un enlace peptídico. El término se utiliza para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto en la técnica entenderá que el término no se limita a cadenas largas y se puede referir a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos juntos por medio de un enlace peptídico. Como conocen los expertos en la técnica, los polipéptidos se pueden procesar y/o modificar. Por ejemplo, un polipéptido puede estar glucosilado (véase la definición de glucoproteína, anteriormente).

“Proteína”: El término “proteína” como se utiliza en el presente documento se refiere a uno o más polipéptidos que funciona como una unidad diferenciada. Si un único polipéptido es la unidad diferenciada de funcionamiento y no necesita una asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos con el fin de formar la unidad diferenciada de funcionamiento, los términos “polipéptido” y “proteína” se pueden utilizar de manera intercambiable. Si la unidad diferenciada funcional se compone de múltiples polipéptidos que se asocian entre ellos físicamente, el término “proteína” como se utiliza en el presente documento se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y funcionan juntos como la unidad diferenciada.

“Polipéptido expresado recombinantemente” y “Polipéptido recombinante”: Estas expresiones como se utilizan en el presente documento se refiere a un polipéptido que se expresa por una célula huésped que ha sido modificada por la mano del hombre para que exprese ese polipéptido. En ciertas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, esta modificación puede comprender una o más modificaciones genéticas. Por ejemplo, las células huésped pueden modificarse genéticamente por introducción de uno o más genes heterólogos que codifican el polipéptido que se va a expresar. El polipéptido heterólogo que se expresa recombinantemente puede ser idéntico o similar a los polipéptidos que se expresan normalmente en la célula huésped. El polipéptido heterólogo que se expresa recombinantemente también puede ser ajeno a la célula huésped, por ejemplo, heterólogo a los polipéptidos que se expresan normalmente en la célula huésped. En ciertas realizaciones, el polipéptido heterólogo que se expresa recombinantemente es quimérico. Por ejemplo, ciertas partes de un polipéptido pueden contener secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos diferentes que se expresan ambos normalmente en la célula huésped, mientras que otras partes contienen secuencias de aminoácidos que son ajenas a la célula huésped. Adicional o alternativamente, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos diferentes que se expresan ambos normalmente en la célula huésped. Además, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos que son ambos ajenos a la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped está modificada genéticamente por activación o regulación positiva de uno o más genes endógenos.

“Componentes suplementarios”: La expresión “componentes suplementarios” como se utiliza en el presente documento se refiere a componentes que aumentan el crecimiento y/o la supervivencia por encima de una tasa mínima, que incluyen, pero sin limitarse a hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos que están presentes habitualmente en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otras fuentes de energía. En ciertas realizaciones, los componentes suplementarios se añaden al cultivo celular inicial. En ciertas realizaciones, los componentes suplementarios se añaden tras el inicio del cultivo celular.

“Título”: El término “título” como se utiliza en el presente documento se refiere a la cantidad total de proteína o polipéptido que se expresa recombinantemente producido por un cultivo de células de mamífero en una cantidad determinada de volumen de medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de proteína o polipéptido por mililitro de medio.

**Descripción detallada de ciertas realizaciones**

La presente invención proporciona sistemas mejorados y formulaciones de medios para la producción de proteínas y/o polipéptidos por cultivo celular. En ciertas realizaciones, la invención proporciona sistemas que minimizan el mal plegamiento y/o agregados de los productos proteicos. Cuando se producen proteínas o polipéptidos mal plegados o agregados, la cantidad total de la proteína o polipéptido deseable que se produce en un cultivo celular está por lo tanto disminuida. De acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, la reducción o eliminación de proteínas o polipéptidos mal plegados y/o agregados se consigue por medio del uso de procedimientos que comprenden la provisión de un cultivo celular que comprende cobre. En algunas realizaciones de la divulgación, la reducción o eliminación de proteínas o polipéptidos mal plegados y/o agregados se consigue por medio del uso de procedimientos que comprenden la provisión de un cultivo celular que comprende glutamato. En ciertas realizaciones, la reducción o eliminación de proteínas o polipéptidos mal plegados y/o agregados se consigue por el uso de procedimientos que comprenden la provisión de un cultivo celular que comprende tanto cobre como glutamato.

Ciertos procedimientos de la presente invención también incluyen en aumento de la cantidad total de glucosilación, o de otra manera la producción de un patrón de glucosilación más deseable, en una proteína o polipéptido que se produce en un cultivo celular. En ciertas realizaciones de la divulgación, el aumento de la cantidad total de glucosilación, o de otra manera la producción de un patrón de glucosilación más deseable, en una proteína o polipéptido que se produce se consigue por medio del uso de procedimientos que comprenden la provisión de un cultivo celular que comprende cobre. En algunas realizaciones de la divulgación, el aumento de la cantidad total de glucosilación, o de otra manera la producción de un patrón de glucosilación más deseable, en una proteína o polipéptido que se produce se consigue por medio del uso de procedimientos que comprenden la provisión de un cultivo celular que comprende glutamato. En algunas realizaciones de la divulgación, el aumento de la cantidad total de glucosilación, o de otra manera la producción de un patrón de glucosilación más deseable, en una proteína o polipéptido que se produce se consigue por medio del uso de procedimientos que comprenden la provisión de un cultivo celular que comprende tanto cobre como glutamato. En ciertas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo discontinuo o semicontinuo.

Ciertas composiciones de la presente divulgación incluyen un medio de cultivo celular que comprende cobre. Ciertas composiciones de la presente divulgación incluyen un medio de cultivo celular que comprende glutamato. Ciertas composiciones de la presente divulgación incluyen un medio de cultivo celular que comprende tanto cobre como glutamato. De acuerdo con algunas realizaciones la fracción de polipéptido mal plegado y/o agregado producido en las composiciones de los medios de la presente divulgación, con respecto al polipéptido total que se produce, está disminuido en comparación con la fracción de polipéptido mal plegado y/o agregado que se observaría si las células se cultivaran en un medio por otra parte idéntico que carece de cobre y/o glutamato. Además, en algunas realizaciones, la sialilación total de polipéptidos producidos por las células que se cultivan en las composiciones de medios de la presente divulgación está aumentada con respecto a la sialilación total de un péptido que se produce por células cultivadas en un medio por otra parte idéntico que carece de cobre y/o glutamato.

Ciertas realizaciones y aspectos se tratan en detalle posteriormente. Los expertos en la técnica entenderán, sin embargo, que varias modificaciones de estas realizaciones están en el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las reivindicaciones y equivalentes de las mismas son las que definen el ámbito de la presente invención, que no está ni debería estar limitada a o por esta descripción de ciertas realizaciones.

**Células**

Se puede utilizar cualquier célula huésped susceptible de cultivo celular, y de expresar proteínas o polipéptidos, de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, la célula huésped es de mamífero. Ejemplos no limitantes de células de mamífero que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Holanda); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas por cultivo en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36:59, 1977); células renales de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células ováricas de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y línea de hepatoma humano (Hep G2).

De manera adicional, se pueden utilizar cualquier número de líneas celulares de hibridoma disponibles comercial y no comercialmente que expresen polipéptidos o proteínas de acuerdo con la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que las líneas celulares de hibridoma pueden tener diferentes necesidades de nutrición y/o pueden necesitar diferentes condiciones de cultivo para su crecimiento y expresión de polipéptidos o proteínas óptimos, y serán capaces de modificar las condiciones como sea necesario.



Como se ha señalado anteriormente, en muchos casos las células se seleccionarán o modificarán para producir altos niveles de una proteína o polipéptido de interés. A menudo, las células se modifican para producir altos niveles de proteína, por ejemplo, por la introducción de un gen que codifica la proteína o polipéptido de interés y/o por la introducción de elementos de control que regulan la expresión del gen (sea endógeno o introducido) que codifica la proteína o polipéptido de interés.

Un experto en la técnica apreciará que las proteínas o polipéptidos que se producen en diferentes tipos celulares pueden contener diferentes patrones de glucosilación. Por ejemplo, Przybylo y col. demostraron que los patrones de glucosilación de las cadherinas eran diferentes cuando se expresaban en células epiteliales de uréter no malignas, células HCV29 transfectadas con v-raf y células cancerosas transicionales de vejiga urinaria (véase Przybylo y col., *Cancer Cell International*, 2(1):6, 2002). Lively y col., demostraron que el patrón de glucosilación y la actividad biológica de un anticuerpo IgG humanizado eran diferentes cuando se expresaban en líneas celulares CHO, mieloma Y0 y mieloma NS0 (véase Lively y col., *Glycobiology*, 5(8):813-22, 1995). Los procedimientos para detectar y medir la extensión y el patrón de glucosilación de una proteína o polipéptido en particular se conocen en la técnica. Por lo tanto, un experto en la técnica será capaz de seleccionar la línea celular más deseable para la producción de cualquier proteína o polipéptido determinado sin una experimentación injustificada. Independientemente de la línea celular que se seleccione en último término, los procedimientos y composiciones de la presente invención se puede utilizar para producir una proteína o polipéptido con un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable.

Ciertos polipéptidos pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o algunas otras características de las células que en último término limitan la producción del polipéptido o proteína de interés de alguna manera. Incluso entre una población de células de un tipo particular modificadas para que expresen un polipéptido específico, puede existir variabilidad en la población celular tal que ciertas células individuales crecerán mejor, producirán más polipéptido de interés, producirán un polipéptido que es menos proclive a plegarse mal y/o agregarse, y/o producirán un polipéptido con un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable. En ciertas realizaciones, la línea celular se selecciona empíricamente por el facultativo para el crecimiento robusto bajo las condiciones particulares elegidas para cultivar las células. En ciertas realizaciones, las células individuales modificadas para expresar un polipéptido en particular se escogen para la producción a gran escala basándose en el crecimiento celular, densidad celular final, porcentaje de viabilidad celular, título del polipéptido expresado, plegamiento correcto, patrón de glucosilación deseable o cualquier combinación de estar o cualquiera de otras condiciones consideradas importantes por el facultativo.

#### Cultivo de las células

La presente invención se puede utilizar con cualquier procedimiento o sistema de cultivo celular que esté dispuesto a la expresión de polipéptidos. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en cultivos discontinuos o semicontinuos, en los que el cultivo se termina tras una expresión suficiente del polipéptido, tras lo cual el polipéptido que se expresa se recolecta y opcionalmente se purifica. De manera alternativa, las células se pueden cultivar en cultivos de perfusión, en los que el cultivo no se termina y se añaden nuevos nutrientes y otros componentes periódica o continuamente al cultivo, durante el que se recolecta el polipéptido expresado periódica o continuamente.

Las células se pueden cultivar en cualquier volumen conveniente que escoja el facultativo. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en vasos de reacción a pequeña escala que varía de volumen desde unos pocos mililitros a varios litros. De manera alternativa, las células se pueden cultivar en Biorreactores comerciales a gran escala que varían en volumen desde aproximadamente menos de 1 litro a 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre los mismos.

La temperatura del cultivo celular se seleccionará basándose en primer lugar en el intervalo de temperaturas a las que el cultivo celular permanece viable, a la que se produce el polipéptido a alto nivel, a la que se reduce el mal plegamiento y/o agregación del polipéptido, a la que el polipéptido muestra un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable, o cualquier combinación de estos u otros factores que el facultativo considere importantes. Por ejemplo, las células CHO crecen bien y producen altos niveles de proteína o polipéptido y/o produce glucoproteínas con patrones de glucosilación deseables a aproximadamente 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien y pueden producir altos niveles de proteína o polipéptido y/o producen glucoproteínas con patrones de glucosilación deseables en un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos que se enseñan en la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. Ciertas células de mamífero crecen bien y pueden producir altos niveles de proteína o polipéptido y/o producen glucoproteínas con patrones de glucosilación deseables en un intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. En ciertas realizaciones, el cultivo celular se cultiva a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 °C en un momento o más durante el proceso de cultivo celular. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas adecuadas en que se cultivan las células, dependiendo de las necesidades de las células y los requisitos de producción del facultativo.

Además, el cultivo se puede someter a uno o más cambios de temperatura durante el curso del cultivo. Cuando se cambia la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede tomar varias horas o días para completar el cambio de temperatura. De manera alternativa, el cambio de

temperatura puede ser relativamente brusco. La temperatura se puede fácilmente aumentar o disminuir durante el proceso de cultivo. Adicional o alternativamente, la temperatura se puede aumentar o disminuir en cantidades diferentes en varios momentos durante el proceso de cultivo. La(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura posteriores pueden ser más baja o más alta que la(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura previos. Un experto en la técnica entenderá que se engloban en la presente invención múltiples cambios de temperatura. Por ejemplo, la temperatura su puede cambiar una vez (sea a una temperatura más alta o más baja o en un intervalo de temperaturas), las células se mantienen a esta temperatura o intervalo de temperaturas durante un cierto periodo de tiempo, tras lo cual la temperatura puede cambiarse otra vez a una nueva temperatura o intervalo de temperaturas, que puede ser más alta o más baja que la temperatura o intervalo de temperaturas previo. La temperatura del cultivo después de cada cambio diferente puede ser constante o se puede mantener en un cierto grado de temperaturas.

Como con la temperatura inicial o intervalo de temperaturas, la temperatura o intervalo de temperaturas del cultivo celular tras el cambio(s) de temperatura se selecciona en general basándose en primer lugar en la temperatura(s) a la que el cultivo permanece viable, el intervalo en el que se produce un alto nivel de glucoproteína y/o el intervalo en el que se expresan glucoproteínas que contienen un patrón de glucosilación deseable a niveles comercialmente adecuados en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos que se enseñan en la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. En ciertas realizaciones, las células de mamífero permanecen viables y expresan glucoproteínas con patrones de glucosilación deseables a niveles comercialmente adecuados en un intervalo de aproximadamente 25 °C a 35 °C. En ciertas realizaciones, el cultivo celular se cultiva a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 °C en un momento o más tras el cambio(s) de temperatura. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura(s) adecuada o intervalo(s) de temperatura en el que cultivar las células tras el cambio(s) de temperatura, dependiendo de las necesidades particulares de las células y los requisitos de producción particulares del facultativo. Las células se pueden cultivar durante cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del facultativo y las necesidades de las células en sí mismas.

En ciertas realizaciones, los cultivos celulares discontinuos y semicontinuos se terminan una vez que el polipéptido expresado alcanza un título suficientemente alto. Como ejemplos no limitantes, los cultivos celulares se pueden terminar cuando el título de polipéptido es de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2000 mg/l o mayor. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar uno o más títulos adecuados a los que se pueden recolectar un cultivo discontinuo y/o semicontinuo. Adicional y/o alternativamente, en ciertas realizaciones, los cultivos discontinuos o semicontinuos se terminan una vez que la glucoproteína expresada muestra un patrón de glucosilación deseable, como se determina por las necesidades del facultativo. Adicional o alternativamente los cultivos celulares discontinuos o semicontinuos se terminan una vez que las células alcancen una densidad suficientemente alta, como se determina por las necesidades del facultativo. Por ejemplo, un cultivo se termina una vez que las células alcanzan un 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de densidad máxima de células viables. Adicional o alternativamente, las reacciones discontinuas o semicontinuas se pueden terminar antes de la acumulación excesiva de productos de desecho metabólicos tales como, por ejemplo, lactato o amonio.

En ciertas realizaciones, los cultivos celulares discontinuos o semicontinuos se terminan para evitar la acumulación indeseable de polipéptido mal plegado y/o agregado. Por ejemplo, los cultivos celulares se pueden terminar cuando la fracción negativa de polipéptido mal plegado y/o agregado es un 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 porcentaje de polipéptido plegado adecuadamente y/o no agregado. En ciertas realizaciones, los cultivos celulares se terminan cuando la fracción relativa de polipéptido mal plegado y/o agregado es menor del uno por ciento de polipéptido plegado adecuadamente o no agregado. En ciertas realizaciones, tal terminación tiene lugar bastante antes de que se alcance un título suficientemente alto, antes de que las células alcancen una densidad suficientemente alta y/o antes de que los productos de desecho metabólicos se acumulen a niveles excesivos. En ciertas realizaciones, los cultivos celulares cultivados de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención son capaces de crecer durante un periodo de tiempo más largo que el que sería posible utilizando los procedimientos de cultivo tradicionales mientras se reducen el mal plegamiento y/o la agregación del polipéptido producido. Por ejemplo, los cultivos celulares cultivados de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención se puede cultivar durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más días. Un experto en la técnica apreciará que al ser capaz de cultivar cultivos celulares durante un periodo de tiempo más largo con una cantidad reducida de polipéptido mal plegado y/o agregado dará como resultado en un incremento de la cantidad del polipéptido plegado correctamente, sin agregar que se produce. Por lo tanto, ciertos procedimientos y composiciones de la presente invención proporcionan al facultativo una flexibilidad añadida en la determinación del tiempo óptimo para cultivar células que expresan el polipéptido de interés.

En ciertos casos, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular durante la fase de producción posterior con nutrientes u otros componentes del medio que las células han agotado o metabolizado. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y/o fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otras fuentes de energía. Estos componentes suplementarios se pueden añadir al cultivo celular a la vez, o se pueden proporcionar al cultivo celular en una serie de adiciones.

En ciertas realizaciones, las células se cultivan según cualquiera de los procedimientos de cultivo descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Series N<sup>os</sup> 11/213.308, 11/213.317 y 11/213.633 cada uno de las cuales se presentó el 25 de agosto de 2005. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo en el que la concentración acumulada de aminoácidos es mayor de aproximadamente 70 mM. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo en el que la relación molar entre glutamina acumulada y asparagina acumulada es menor de aproximadamente 2. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo en el que la relación molar de glutamina acumulada y los aminoácidos acumulados totales es menor de aproximadamente 0,2. En ciertas realizaciones, las células que se cultivan en un medio de cultivo en el que la relación molar entre iones inorgánicos y aminoácidos totales acumulados es entre 0,4 a 1. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo en el que la concentración combinada de glutamina acumulada y asparagina acumulada es entre aproximadamente 16 y 36 mM. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene dos, tres, cuatro o las cinco condiciones de medios precedentes. En ciertas realizaciones, la concentración de glutamina en un medio de cultivo celular está limitada a menos de aproximadamente 13 mM. En ciertas realizaciones, la concentración de glutamina en un medio de cultivo celular está limitada a menos de aproximadamente 4 mM.

En algunas realizaciones, las células se cultivan bajo una o más de las condiciones descritas en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Serie N<sup>o</sup> 60/830.658, presentada el 13 de julio de 2006. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración entre aproximadamente 10 y 600 nM. En algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contiene manganeso a una concentración entre aproximadamente 20 y 100 nM. En algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de cultivo que contienen manganeso a una concentración de aproximadamente 40 nM.

En algunas realizaciones, las células se cultivan bajo una o más de las condiciones descritas en la Aplicación de Patente Provisional de Estado Unidos Serie N<sup>o</sup> 60/856.615, presentada el 3 de noviembre de 2006. En algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio que contienen el análogo de glucosa 2-desoxiglucosa. En ciertas realizaciones, un cultivo celular se cultiva en un medio que contiene 2-desoxiglucosa, en el que la glutamina está presente a una concentración que es menor de aproximadamente 13 mM. En ciertas realizaciones, un cultivo celular se cultiva en un medio que contiene 2-desoxiglucosa, en el que la glutamina está presente a una concentración que es menor de aproximadamente 4 mM. En ciertas realizaciones, un cultivo celular se cultiva en un medio que contiene di (2-etil hexil) fosfato, tributil fosfato, dodecil fosfato, 2-dimetilamino etil éster de (difeníl metil)-ácido fosfórico, [2-(difeníl fosfinilo) etil] trimetil yoduro amónico, yodoacetato, y/o fluoroacetato, y opcionalmente en el que la glutamina está presente a una concentración que es menor de aproximadamente 13 mM o 4 mM.

Un experto en la técnica será capaz de ajustar condiciones de cultivo celular específicas con el fin de optimizar ciertas características del cultivo celular que incluyen pero no se limitan a tasa de crecimiento, viabilidad celular, densidad celular final del cultivo celular, concentración final de subproductos metabólicos perjudiciales tales como lactato o amonio, título final del polipéptido expresado, reducción del mal plegamiento y/o agregación del polipéptido expresado, un patrón de glucosilación más extenso o de otra forma más deseable del polipéptido expresado o cualquier combinación de estas u otras condiciones que se consideren importantes por el facultativo.

#### Composiciones de los medios

Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de medios de cultivo de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una variedad de medios definidos químicamente, en el que los componentes de los medios se conocen y/o se controlan. En algunas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una variedad de medios complejos, en los que no se conocen y/o se controlan todos los componentes del medio.

Los medios de cultivo definidos químicamente para el cultivo celular se han desarrollado extensamente y se han publicado durante varias de las últimas décadas, que incluyen medios de cultivo definidos químicamente para cultivo de células de mamífero. Todos los componentes de los medios definidos están bien caracterizados, y tales medios definidos no contienen aditivos complejos tales como suero o hidrolizados. Las primeras formulaciones de medios se desarrollaron para permitir el cultivo celular y el mantenimiento de la viabilidad sin preocuparse de la producción o calidad de la proteína. Más recientemente, las formulaciones de los medios se han desarrollado con el expreso propósito de mantener cultivos celulares altamente productivos. Sin embargo, queda mucho trabajo para desarrollar formulaciones de medios que den como resultado una proteína o polipéptido de calidad más alta, por ejemplo, una proteína o polipéptido que se pliegue correctamente, se agregue menos y/o tenga un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable.

Los medios definidos consisten típicamente en aproximadamente cincuenta entidades químicas en concentraciones conocidas en agua. La mayoría de los medios definidos contienen también una o más proteínas bien caracterizadas tales como insulina, IGF-1, transferrina o BSA, pero otros necesitan componentes no proteicos y entonces se denominan medios definidos libres de proteína. Los componentes químicos de los medios definidos en general se encuadran en cinco categorías principales: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, elementos traza, y una categoría miscelánea que escapa a una categorización clara.

Todos los medios, definidos o complejos, incluyen una fuente de energía para el crecimiento de las células. A menudo, la fuente de energía es la glucosa, un azúcar monosacárido simple que tiene la fórmula química  $C_6H_{12}O_6$ . Las formulaciones tradicionales de medios, incluyendo los medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle modificado de Dulbecco ([DMEM], Sigma), han contenido niveles relativamente altos de glucosa. Se pensaba tradicionalmente que la glucosa se necesitaba en abundancia ya que es la primera fuente metabólica de energía para las células. Sin embargo, el rápido consumo de glucosa da lugar a la acumulación de lactato. El lactato es un producto de desecho metabólico perjudicial y es un conocido inhibidor del crecimiento celular y la productividad en un cultivo celular (véase Gorfien y col., Optimized Nutrient Additives for Fed-Batch Cultures, Biopharm. International, Abril 2003; Lao y Toth, Effect of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture, Biotechnology. Prog. 13(5): 688-691, 1997).

La presente invención engloba el hallazgo de que las proteínas o polipéptidos producidos por cultivo de cultivos celulares en medios definidos utilizando ciertos procedimientos y composiciones desveladas en el presente documento muestran un mal plegamiento reducido, una agregación disminuida y/o un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable que lo que sería de otra manera si las células se cultivaran en medios tradicionales, tales como los que se han descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, las formulaciones de los medios que comprenden cobre son útiles para la reducción del mal plegamientos y/o agregación de los polipéptidos producidos, o en la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable. Por ejemplo, las formulaciones de medios de la presente divulgación pueden comprender cobre a una concentración de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100  $\mu$ M.

En algunas realizaciones, las formulaciones de los medios que comprenden glutamato son útiles en la reducción del mal plegamiento y/o agregación de los polipéptidos producidos, o en la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable. Por ejemplo, las formulaciones de los medios de la presente invención pueden comprender glutamato a una concentración de 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35 mM.

Un experto en la técnica entenderá que las concentraciones de cobre y/o glutamato anteriores en un medio de cultivo celular se pueden conseguir utilizando un cultivo discontinuo, un cultivo semicontinuo, o un cultivo de perfusión.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de los medios que comprenden tanto cobre como glutamato son útiles en la reducción del mal plegamiento y/o agregación de los polipéptidos producidos, o en la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable.

Las formulaciones de los medios desveladas en el presente documento se pueden suplementar opcionalmente si es necesario o deseable con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, hidrolizados proteicos o glucosa u otras fuentes de energía. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos tales como hexametileno-bis (acetamida) ("HMBA") y/o butirato sódico ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al principio del cultivo o se pueden añadir en un punto más tarde con el fin de reponer los nutrientes agotados o por otra razón. Un experto habituado en la técnica será consciente de cualquiera de los suplementos deseables o necesarios que se pueden incluir en las formulaciones de los medios de la presente invención y será capaz de seleccionar suplementos particulares para añadirlos basándose en sus necesidades experimentales y/u otras.

#### Polipéptidos

Cualquier polipéptido que se pueda expresar en una célula huésped puede producirse de acuerdo con la presente divulgación. El polipéptido se puede expresar a partir de un gene que sea endógeno para las células huésped, o a partir de un gen heterólogo que se introduce en las células huésped. El polipéptido puede ser de origen natural, o alternativamente puede tener una secuencia que esté modificada o seleccionada por la mano del hombre. Un polipéptido que se produce de acuerdo con la presente divulgación se puede ensamblar a partir de fragmentos de polipéptido que se producen individualmente en la naturaleza. Adicional o alternativamente, el polipéptido modificado puede incluir uno o más fragmentos que no son de origen natural.

Los polipéptidos que se pueden expresar deseablemente de acuerdo con la presente divulgación a menudo se seleccionarán basándose en un actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente divulgación puede emplearse para expresar cualquier enzima, factor de coagulación, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión, etc. relevantes farmacéutica o comercialmente. La siguiente lista de polipéptidos que se pueden producir de acuerdo con la presente divulgación es simplemente ejemplar en la naturaleza, y no se pretende que sea una relación limitante. Un experto habituado en la técnica entenderá que se

puede expresar cualquier polipéptido de acuerdo con la presente divulgación y será capaz de seleccionar el polipéptido particular que se produzca basándose en sus necesidades particulares.

#### *Anticuerpos*

5 Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en particular. Debido al gran número de anticuerpos en uso o bajo investigación actualmente como productos farmacéuticos y otros agentes comerciales, la producción de anticuerpos de acuerdo con la presente divulgación tiene un interés particular. Por ejemplo, la presente invención se puede utilizar para producir anticuerpos en un cultivo celular en el que el mal plegamiento y/o agregación de los anticuerpos producidos están reducidos.

10 Adicional o alternativamente, la presente invención se puede utilizar para producir anticuerpos en un cultivo celular en que los anticuerpos producidos tienen un patrón más extenso o de otra manera más deseable. Los anticuerpos con patrones de glucosilación diferentes puede que sea menos probable que inicie una respuesta inmunitaria en el individuo al que se le administra, lo que resulta en un régimen terapéutico más eficaz. Adicional o alternativamente, los anticuerpos con patrones de glucosilación diferentes en sus regiones constantes pueden mostrar una función efectora farmacocinética o farmacodinámica mejorada. Adicional o alternativamente, los anticuerpos con patrones de glucosilación diferentes pueden ser más estables en las condiciones del cultivo celular en las que se produce, por ejemplo siendo más resistentes a las proteasas u otros componentes del cultivo celular, tal que se produce un título final de anticuerpo más alto.

20 Cualquier anticuerpo que se puede expresar en una célula huésped se puede utilizar de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se va a expresar es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Como se conoce en la técnica, un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que se derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata, y otras especies, con regiones constantes humanas. Se ha descrito una variedad de estrategias para fabricar anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda y col., Nature 314:452, 1985, Cabilly y col., Patente de EE. UU. N° 4.816.567; Boss y col., Patente de EE. UU. N° 4.816.397; Tanaguchi y col., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico en el que la gran mayoría de los restos de aminoácido se derivan de anticuerpos humanos, minimizando así cualquier reacción inmunitaria potencial cuando se suministre a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los restos de aminoácidos en la región hipervariable se reemplazan por restos de especies no humanas que confieren la especificidad o afinidad que se desea por un antígeno. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica o mayor de al menos un 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento a un anticuerpo humano. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado se optimiza por introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal y/o retromutaciones. Tales moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden hacer por cualquiera de varias técnicas que se conocen en la técnica (por ejemplo, Teng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor y col., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson y col., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982), y se pueden hacer de acuerdo con las enseñanzas de la Publicación PCT WO 92/06193 o EP 0239400.

40 En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se produce de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación contiene una región constante o Fc de inmunoglobulina que muestra un patrón de glucosilación mejorado. Por ejemplo, un anticuerpo producido de acuerdo con las enseñanzas del presente documento se puede unir más fuertemente o con más especificidad a moléculas efectoras tales como el complemento y/o los receptores de Fc, que pueden controlar varias funciones inmunitarias del anticuerpo tales como la actividad de la células efectora, lisis, actividad mediada por el complemento, aclaramiento del anticuerpo, y semivida del anticuerpo. Los receptores Fc típicos que se unen a una región Fc del anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo IgG) incluyen, pero no se limitan a receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII y FcRn, incluyendo las variantes alélicas y formas cortadas y empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores de Fc se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92, 1991; Capel y col., Immunomethods 4:25-34,1994; y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41, 1995.

55 Como ejemplo no limitante, un anticuerpo que se puede producir de acuerdo con las presentes enseñanzas es un anticuerpo anti-ABeta. Los anticuerpos anti-ABeta son una vía potencial particularmente prometedora de terapia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer ("AD"). La AD es una enfermedad progresiva que da como resultado demencia senil (véase en general: Selkoe, TINS 16:403, 1993; Hardy y col., WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438, 1994; Duff y col., Nature 373:476, 1995; Games y col., Nature 373:523, 1995). Hablando en general, la enfermedad se encuadra en dos categorías: aparición tardía, que se produce a una edad avanzada (65 + años) y aparición temprana, que se desarrolla bastante antes del periodo senil, es decir, entre los 35 y los 60 años. En ambos tipos de la enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más severas y dispersas en los casos que comienzan en una edad más temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, nudos neurofibrilares y placas seniles. Los nudos neurofibrilares son depósitos

intracelulares de microtúbulos asociados a la proteína tau que consisten en dos filamentos enrollados uno sobre otro en parejas. Las placas seniles (es decir, placas de amiloide) son áreas de neuropilos de hasta 150  $\mu\text{m}$  de ancho con depósitos de amiloide extracelulares en el centro que son visibles por análisis microscópico de secciones de tejido cerebral. La acumulación de placas de amiloide en el cerebro se asocia también con el síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

El principal constituyente de las placas es un péptido llamado ABeta o péptido amiloide Beta. El péptido ABeta es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una glucoproteína transmembrana más larga que se llama proteína precursora de amiloide (APP). Como resultado del proceso proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasas, el ABeta se encuentra primariamente tanto en una forma corta, de 40 aminoácidos de longitud, como en una forma larga, que varía de 42-43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio transmembrana hidrofóbico de APP se encuentra en el extremo carboxilo de ABeta, y puede participar en la capacidad de ABeta para agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas de amiloide en el cerebro da lugar eventualmente a muerte celular neuronal. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioro neuronal caracteriza la enfermedad de Alzheimer.

Varias mutaciones en la proteína APP se han correlacionado con la presencia de AD (véase, por ejemplo, Goate y col., *Nature* 349:704, 1991 (valina 717 por isoleucina); Chartier Harlan y col. *Nature* 353:844, 1991 (valina 717 por glicina); Murrell y col., *Science* 254:97,1991 (valina 717 por fenilalanina); Mullan y col., *Nature Genet.* 1:345,1992 (una mutación doble que cambia lisina 595-metionina 596 por asparagina 595-leucina 596)). Se piensa que tales mutaciones producen AD por el aumento o la alteración del proceso de APP a ABeta, particularmente el proceso de APP en cantidades aumentadas de la forma larga de ABeta (es decir, ABeta 1-42 y ABeta 1-43). Las mutaciones de otros genes, tales como los genes presenilina, PS1 y PS2, se cree que afectan indirectamente el proceso de APP para generar mayores cantidades de la forma larga de ABeta (véase Hardy, *TINS* 20: 154,1997).

Se han utilizado satisfactoriamente modelos de ratón para determinar la significación de las placas de amiloide en la AD (Games y col., *supra*; Johnson-Wood y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550, 1997). En particular, cuando a los ratones transgénicos PDAPP, (que expresan una forma mutante de la APP humana y desarrollan la enfermedad de Alzheimer a una edad joven), se les inyecta la forma larga de ABeta, muestran tanto un descenso de la progresión del Alzheimer y un aumento del título de anticuerpos para el péptido ABeta (Schenk y col., *Nature* 400, 173, 1999). Las observaciones tratadas anteriormente indican que el ABeta, particularmente en su forma larga, es un elemento causal de la enfermedad de Alzheimer.

El péptido ABeta puede estar en solución y se puede detectar en el SNC (por ejemplo, en el LCR) y el plasma. Bajo ciertas condiciones, el ABeta soluble se transforma en en las formas fibrilar tóxica en láminas beta que se encuentra en las placas neuríticas y los vasos sanguíneos cerebrales de los pacientes con AD. Los tratamientos que implican la inmunización con anticuerpos monoclonales contra el ABeta se han investigado. Tanto la inmunización activa como pasiva se ha ensayado en modelos de ratón de AD. La inmunización activa daba como resultado una reducción de la carga de placas en el cerebro, pero solo por administración nasal. También se ha investigado la inmunización pasiva de ratones transgénicos (Bard, y col., *Nat. Med.* 6:916-19, 2000). Se ha descubierto que los anticuerpos que reconocen los dominios del extremo amino y central de ABeta estimulaban la fagocitosis de los depósitos de ABeta, mientras que los anticuerpos contra los dominios cercanos al dominio del extremo carboxilo no lo hacían.

El mecanismo de aclaramiento de ABeta tras la inmunización activa o pasiva está bajo investigación continua. Se han propuesto dos mecanismos para el aclaramiento eficaz, es decir, de degradación central y de degradación periférica. El mecanismo de degradación central reposa en anticuerpos que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, unirse a las placas, e inducir el aclaramiento de las placas pre-existentes. Se ha demostrado que el aclaramiento está promovido por una fagocitosis mediada por el receptor Fc (Bard y col., *supra*). El mecanismo de degradación periférica de ABeta reposa en una alteración del equilibrio dinámico del ABeta entre el cerebro, LCR, y plasma tras la administración del anticuerpo, dando lugar al transporte del ABeta de un compartimento a otro. El ABeta derivado centralmente se transporta al LCR y el plasma donde se degrada. Estudios recientes han concluido que el ABeta soluble y sin unir está implicado en la deficiencia de memoria asociada con la AD, incluso son la reducción de los depósitos de amiloide en el cerebro. Se necesitan más estudios para determinar la acción y/o interrelación de estas rutas en el aclaramiento de ABeta (Dodel, y col., *The Lancet* Vol. 2:215, 2003).

Los anticuerpos anti-ABeta son una vía potencialmente prometedora de tratamiento de AD ya que se pueden unir y aclarar el ABeta u otros componentes que comprenden las placas de amiloide. Los anticuerpos anti-ABeta que se producen de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación pueden servir para tatar mejor la AD u otras enfermedades relacionadas, por ejemplo, uniéndose y aclarando componentes de las placas de amiloide más eficazmente, aclarando las placas de amiloide con pocos o menos efectos secundarios, o previniendo la formación o crecimiento de las placas de amiloide. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas son anticuerpos monoclonales.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ABeta que se producen con las presentes enseñanzas se unen específicamente a la forma agregada de ABeta sin unirse a la forma soluble. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen específicamente a la

forma soluble del ABeta bajo condiciones en las que no se unen a la forma agregada. En ciertas realizaciones los anticuerpos anti- ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a las formas tanto solubles como agregadas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti- ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen al ABeta de las placas. En ciertas realizaciones, los anticuerpos producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas atraviesan la barrera hematoencefálica. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti- ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas reducen la carga de amiloide en un sujeto. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti- ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas reducen la distrofia nerítica en un sujeto. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti- ABeta pueden mantener la arquitectura sináptica (por ejemplo, sinaptofisina).

De acuerdo con algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a un epítipo en los restos 13-28 de ABeta (con el primer resto del extremo N del ABeta natural denominado 1). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a un epítipo en los restos 19-22 de ABeta. En algunas realizaciones se utilizan anticuerpos monoclonales múltiples que tienen especificidades de unión para diferentes epítipos de ABeta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo específico para los epítipos en los restos 19-22 de ABeta se co-administra con un anticuerpo específico para un epítipo fuera de los restos 19-22 de ABeta. Tales anticuerpos se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente. También se pueden utilizar anticuerpos contra los componentes del amiloide distintos de ABeta (por ejemplo, que se administren o se co-administren).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-ABeta que se producen de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a un epítipo de ABeta más fuertemente o con mayor especificidad que anticuerpos anti- ABeta producidos de otra manera. La especificidad para el epítipo de un anticuerpo se puede determinar por técnicas conocidas, por ejemplo, formando una biblioteca de fagos de presentación en la que los diferentes miembros presentan diferentes subsecuencias de ABeta. La biblioteca de fagos de presentación se puede seleccionar entonces en los miembros que se unen específicamente a un anticuerpo bajo ensayo. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, tal familia contiene una secuencia central común, y longitudes variables de secuencias flanqueantes en los diferentes miembros. Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos se pueden ensayar en cuanto a su especificidad por el epítipo en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad por el epítipo ya se había determinado. Por ejemplo, los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 15C11 por la unión al ABeta se considera que se unen al mismo o similar epítipo que el 15C11, es decir, en los restos 19-22 de ABeta. En ciertas realizaciones, la selección de anticuerpos por su especificidad por el epítipo predice de manera útil la eficacia terapéutica. Por ejemplo, un anticuerpo determinado que se une a un epítipo en los restos 13-28 (por ejemplo a A $\beta$  19-22) de ABeta es probable que sea eficaz en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con las metodologías de la presente invención.

Los anticuerpos que se unen específicamente a un segmento preferido de ABeta sin unirse a otras regiones de ABeta tienen varias ventajas con relación a los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones, o al suero policlonal contra el ABeta intacto. Entre otras cosas, a dosificaciones de igual masa, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosificación molar más alta de anticuerpos eficaces en el aclaramiento de las placas de amiloide. También, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de aclarado contra los depósitos de amiloide sin inducir una respuesta de aclaramiento contra el polipéptido APP intacto, reduciendo de esta manera los efectos secundarios potenciales.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos, o humanizados que se han descrito anteriormente contienen restos de aminoácidos que no son de origen natural en ningún anticuerpo en ninguna especie en la naturaleza. Estos restos ajenos se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir una especificidad, afinidad o función efectora nueva o modificada en el anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado.

#### *Factores de coagulación*

Se ha mostrado que los factores de coagulación son eficaces como productos farmacéuticos y/o agentes comerciales. La hemofilia B es un trastorno en el que la sangre del paciente es incapaz de coagularse. Por lo tanto, cualquier pequeña herida da como resultado una hemorragia que potencialmente pone en riesgo la vida. Dada la importancia de los factores de coagulación recombinantes en el tratamiento de enfermedades tales como la hemofilia, la producción de factores de coagulación de acuerdo con la presente divulgación tiene un interés particular. Por ejemplo, se puede utilizar la presente divulgación para producir factores de coagulación en un cultivo celular en el que se reduce el mal plegamiento y/o agregación de los factores de coagulación que se producen. Adicional o alternativamente, la presente divulgación se puede utilizar para producir factores de coagulación en un cultivo celular en el que los factores de coagulación que se producen tienen un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable.

Por ejemplo, el Factor de Coagulación IX (Factor IX o "FIX") es una glucoproteína de cadena sencilla cuya deficiencia da como resultado la Hemofilia B. el FIX se sintetiza como un zimógeno de cadena sencilla que puede activarse en una serina proteasa de doble cadena (Factor IXa) por liberación de un péptido de activación. El dominio catalítico del Factor Xla se localiza en la cadena pesada (véase Chang y col., J. Clin. Invest., 100:4, 1997). El FIX

tiene múltiples sitios de glucosilación que incluyen carbohidratos tanto unidos a N como unidos a O. Se pensó una vez que una estructura particular unida a O en la serina 61 ((Sia- $\alpha$ 2,3-Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc- $\beta$ 1,3-Fuc- $\alpha$ 1-O-Ser) era única del FIX pero desde entonces se ha encontrado en otras pocas moléculas que incluyen la proteína Notch en mamíferos y *Drosophila* (Maloney y col, Journal of Biol. Chem., 275(13), 2000). El FIX que producen las células de Ovario de Hámster Chino ("CHO") en cultivo celular muestra alguna variabilidad en la cadena de oligosacárido Serina 61. Estas glucoformas diferentes, y otras glucoformas potenciales, pueden tener diferentes capacidades para inducir la coagulación cuando se administran a seres humanos o animales y/o pueden tener diferentes estabilidades en la sangre, dando como resultado una coagulación menos eficaz.

La Hemofilia A, que clínicamente no se puede distinguir de la Hemofilia B, se produce por un defecto en el factor de coagulación VIII, otra glucoproteína que se sintetiza como una cadena sencilla y luego se procesa en una forma activa de cadena doble. La presente divulgación se puede emplear también para controlar o alterar el patrón de glucosilación del factor de coagulación VIII con el fin de modular su actividad de coagulación. Se pueden producir otros factores de coagulación de acuerdo con la presente divulgación que incluye el factor tisular y el factor de von Willebrand.

### Enzimas

Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser productos farmacéuticos y/o agentes comerciales eficaces y que se pueden producir deseablemente de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación incluye las enzimas. Dada la importancia de las enzimas recombinantes en el tratamiento de enfermedades y otros usos comerciales o farmacéuticos, la producción de enzimas de acuerdo con la presente divulgación tienen un interés particular. Por ejemplo, se puede utilizar la presente divulgación para producir enzimas en un cultivo celular en las que se reduce el mal plegamiento y/o agregación de las enzimas que se producen.

Las enzimas pueden ser glucoproteínas cuyos patrones de glucosilación afectan la actividad enzimática. Por lo tanto, la presente divulgación también se puede utilizar para producir enzimas en un cultivo celular en que las enzimas producidas tienen un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable.

Como un ejemplo no limitante, una deficiencia de glucocerebrosidasa (GCR) da como resultado una afección conocida como enfermedad de Gaucher, que se produce por una acumulación de glucocerebrosidasa en los lisosomas de ciertas células. Los sujetos con enfermedad de Gaucher muestran una variedad de síntomas que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trastornos del esqueleto, trombocitopenia y anemia. Friedman y Hayes mostraron que la GCR recombinante (rGCR) que contenían una única sustitución en la secuencia de aminoácidos primaria mostraba un patrón de glucosilación alterado, específicamente un aumento de los restos de fucosa y N-acetil glucosamina en comparación con la GCR de origen natural (véase la Patente de Estados Unidos Número 5.549.892).

Friedman y Hayes también demostraron que esta rGCR mostraba propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con la rGCR de origen natural. Por ejemplo, aproximadamente dos veces más en la rGCR dirigida de las células de Kupffer hepáticas que la GCR de origen natural. Aunque las secuencias de aminoácidos primarias de las dos proteínas se diferencian en un único resto, Friedman y Hayes hicieron la hipótesis de que el patrón de glucosilación alterado de rGCR puede influir también en la dirección a las células de Kupffer. Un experto en la técnica será consciente de otros ejemplos de enzimas conocidos que muestran propiedades enzimáticas, farmacocinéticas y/o farmacodinámicas alteradas que dan como resultado una alteración en sus patrones de glucosilación.

### Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

Otra clase de polipéptidos que se ha demostrado que son eficaces como productos farmacéuticos o agentes comerciales y que se pueden producir deseablemente de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación incluye factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Dada la importancia biológica de factores de crecimiento y otras moléculas de señalización y su importancia como agentes terapéuticos potenciales, la producción de estas moléculas de acuerdo con la presente divulgación tiene un interés particular. Por ejemplo, la presente divulgación se puede utilizar para producir factores de crecimiento u otras moléculas de señalización en un cultivo celular en el que se reduce el mal plegamiento y/o agregación de los factores de crecimiento u otras moléculas de señalización que se producen.

Los factores de crecimiento son típicamente glucoproteínas que se segregan por las células y se unen a y activan receptores en otras células, iniciando un cambio metabólico o del desarrollo en la célula receptora. Por lo tanto, la presente divulgación se puede utilizar también para producir factores de crecimiento u otras moléculas de señalización en un cultivo celular en el que los factores de crecimiento u otras moléculas de señalización tienen un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable.

Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento de mamíferos y otras moléculas de señalización incluyen citoquinas; factor de crecimiento epitelial (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como aFGF y bFGF; factores de crecimiento de transformación (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, que incluyen TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4, o TGF-beta 5; factor de



5 crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón tales como interferón-alfa, beta, y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o activador del plasminógeno tipo tisular o urinario humano (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; RANTES (reguladas por activación, normalmente expresadas y segregadas por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5, o 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento de los nervios tales como NGF-beta. Un experto en la técnica será consciente de otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que se pueden expresar de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente divulgación.

20 Se ha demostrado que las alteraciones específicas del patrón de glucosilación de los factores de crecimiento u otras moléculas de señalización tienen efectos drásticos sobre sus propiedades terapéuticas. Como ejemplo, un procedimiento común para el tratamiento de pacientes que sufren anemia crónica se les proporciona por medio de inyecciones frecuentes de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) con el fin de reforzar su producción de glóbulos rojos. Un análogo de la rHuEPO, la darbepoetina alfa (Aranesp®), se ha desarrollado porque tiene una duración más larga que la rHuEPO normal. La diferencia primaria entre la darbepoetina alfa y la rHuEPO es la presencia de dos cadenas extra de oligosacárido unidas a N que contienen ácido siálico. La producción de darbepoetina alfa se ha conseguido utilizando glucomodificación in vitro (véase Elliott y col., Nature Biotechnology 25 21(4):414-21, 2003). Elliott y col. utilizaron mutagénesis in vitro para incorporar sitios extra de glucosilación en la estructura del polipéptido rHuEPO, que da como resultado la expresión del análogo, la darbepoetina alfa. Las cadenas extras de oligosacárido se localizan distales al sitio de unión del receptor EPO y aparentemente no interfiere con la unión al receptor. Sin embargo, la semivida de la darbepoetina alfa es hasta tres veces mayor que la de la rHuEPO, resultando un agente terapéutico mucho más eficaz.

30 Este ejemplo demuestra que las alteraciones en el patrón de glucosilación de un factor de crecimiento u otra molécula de señalización pueden tener efectos drásticos en la estabilidad y/o actividad de una glucoproteína terapéutica. Por lo tanto, la expresión de un factor de crecimiento u otra molécula de señalización de interés de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente divulgación puede dar como resultado la expresión de un factor de crecimiento u molécula de señalización que tiene un patrón de glucosilación mejorado y propiedades terapéuticas mejoradas. En ciertas realizaciones, una glucoproteína que se expresa de acuerdo con los procedimientos o composiciones de la presente divulgación tendrá un patrón de sialilación mayor o más deseable. En algunas realizaciones, el patrón de sialilación de una glucoproteína que se expresa de acuerdo con los procedimientos o composiciones de la presente divulgación reflejará más precisamente el patrón de sialilación de una glucoproteína natural o endógena. En algunas realizaciones, el patrón de sialilación de una glucoproteína que se expresa de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente divulgación será diferente del patrón de sialilación de una glucoproteína natural o endógena, lo que da como resultado una propiedad o actividad más deseable que la de la glucoproteína.

### *Receptores*

45 Otra clase de polipéptidos que se ha demostrado que son eficaces como productos farmacéuticos y/o agentes comerciales y que se pueden producir deseablemente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluye los receptores. Dada la importancia biológica de los receptores y su importancia como agentes terapéuticos potenciales, la producción de estas moléculas de acuerdo con la presente divulgación tiene un interés particular. Por ejemplo, la presente divulgación se puede utilizar para producir receptores en un cultivo celular en los que se reduce el mal plegamiento y/o agregación de los receptores que se producen.

50 Los receptores son típicamente glucoproteínas transmembrana que funcionan reconociendo un ligando de señalización extracelular. Por lo tanto, la presente divulgación se puede utilizar también para producir receptores en un cultivo celular en el que los receptores producidos tienen un patrón de glucosilación más extenso o de otra manera más deseable. Los receptores tienen a menudo un dominio proteína quinasa además del dominio de reconocimiento del ligando. Este dominio proteína quinasa inicia una ruta de señalización por fosforilación de moléculas intracelulares diana al unirse al ligando, dando lugar a cambios en el desarrollo o metabólicos en la célula. En ciertas realizaciones, se produce un dominio extracelular de un receptor transmembrana de acuerdo con los procedimientos y sistemas desvelados en el presente documento. En ciertas realizaciones, se produce un dominio intracelular de un receptor transmembrana de acuerdo con los procedimientos y sistemas desvelados en el presente documento.

60 En ciertas realizaciones, se expresan inhibidores del factor de necrosis tumoral, en forma de receptores del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNFR-1; documento EP 417.563 publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2,

documento EP 417.014 publicado el 20 de marzo de 1991) de acuerdo con los sistemas y procedimientos de la presente invención (para una revisión, véase Naismith y Sprang, *J Inflamm.* 47(1-2):1-7, 1995-96). De acuerdo con algunas realizaciones un inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un receptor TNF soluble. En ciertas realizaciones un inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un TNFR-Ig soluble. En ciertas realizaciones los inhibidores del TNF de la presente invención son formas solubles de TNFRI y TNFRII. En ciertas realizaciones, los inhibidores del TNF de la presente invención son proteínas de unión al TNF solubles. En ciertas realizaciones, los inhibidores del TNF de la presente invención son proteínas de fusión TNFR-Ig, por ejemplo, TNFR-Fc o etanercept. Como se utiliza en el presente documento "*etanercept*", se refiere al TNFR-Fc, que es un dímero de dos moléculas de la parte extracelular del receptor TNF- $\alpha$  p75, consistiendo cada molécula en una parte Fc de 235 aminoácidos de la IgG1 humana.

En algunas realizaciones, los receptores que se van a producir de acuerdo con la presente divulgación son receptores de la tirosina quinasa (RTK). La familia de las RTK incluye receptores que son cruciales para una variedad de funciones en muchos tipo celulares (véase, por ejemplo, Yarden y Ullrich, *Ann. Rev. Biochem.* 57:433-478, 1988; Ullrich y Schlessinger, *Cell* 61:243-254, 1990). Ejemplos no limitantes de RTK incluyen receptores del factor de necrosis tumoral alfa y beta, miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptores de tirosina quinasa con inmunoglobulinas y dominios de homología con EGF-1 (TIE-1) y TIE-2 (Sato y col., *Nature* 376(6535):70-74, 1995) y receptor c-Met, de algunos de los cuales se ha sugerido que promueven la angiogénesis, directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, *J. Cell Biol.* 129:895-898, 1995). Otros ejemplos no limitantes de RTK incluyen la quinasa hepática fetal 1 (FLK-1) (a veces denominada receptor que contiene el dominio de inserción de quinasa (KDR) (Terman y col., *Oncogene* 6:1677-83, 1991) o receptor 2 del factor de crecimiento celular endotelial vascular, VEGFR-2), tirosina quinasa-1 tipo fms (Flt-1) (DeVries y col. *Science* 255; 989-991, 1992; Shibuya y col., *Oncogene* 5:519-524, 1990), a veces llamada receptor 1 del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGFR-1), neuropilina-1, endoglina, endosialina y Axl. Los expertos habituados en la técnica serán conscientes de otros receptores que se pueden expresar de acuerdo con la presente divulgación.

En ciertas realizaciones, el receptor que se va a producir de acuerdo con la presente divulgación es un receptor acoplado a una proteína G (GPCR). Los GPCR son una importante diana para la acción y desarrollo de fármacos. De hecho, los receptores han dado lugar a más de la mitad de los fármacos conocidos actualmente (Drews, *Nature Biotechnology*, 14:1516, 1996) y los GPCR representa la diana más importante para la intervención terapéutica con un 30% de fármacos prescritos clínicamente que antagonizan o agonizan un GPCR (Milligan, G. y Rees, S., *TIPS*, 20:118-124, 1999). Aunque estos receptores tienen una historia establecida, probada como agentes terapéuticos, la producción de GPCR de acuerdo con la presente divulgación también es de interés particular.

Los GPCR son proteínas que tienen siete dominios transmembrana. Al unirse un ligando a un GPCR, se transduce una señal en la células que da como resultado un cambio en las propiedades biológicas o fisiológicas de la célula. Los GPCR, junto con las proteínas G y efectores (enzimas intracelulares y canales que son modulados por las proteínas G), son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de mensajeros intracelulares secundarios con las entradas extracelulares. Estos genes y productos genéticos son agentes causales potenciales de enfermedades.

La superfamilia de la proteína GPCR contiene ya 250 tipos de parálogos, receptores que representan variantes generadas por duplicaciones genéticas (u otros procesos), como oposición a ortólogos, el mismo receptor de diferentes especies. La superfamilia se puede dividir en cinco familias: Familia I, receptores tipificados por rhodopsina y el receptor beta 2 adrenérgico y representado actualmente por más de 200 miembros únicos; Familia II, familia del recientemente caracterizado receptor hormona paratiroidea/ calcitonina/ secretina; Familia III, la familia del receptor del glutamato metabotrópico en mamíferos; Familia IV, la familia del receptor cAMP, importante en la quimiotaxis y desarrollo de *D. discoideum*; y Familia V, receptores feromona que coinciden con fúngicos tales como STE2.

Los GPCR incluyen receptores para aminos biogénicas, para mediadores lipídicos de la inflamación, hormonas peptídicas, y mediadores de señal sensorial. El GPCR se convierte en activado cuando el receptor se une a su ligando extracelular. Los cambios conformacionales en el GPCR, que resulta de la interacción ligando-receptor, afecta la afinidad de unión de una proteína a los dominios intracelulares del GPCR. Esto capacita al GTP para que se una a la proteína con mayor afinidad.

La activación de la proteína G por el GTP da lugar a la interacción de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G con adenilato ciclasa u otros generadores de moléculas mensajeras secundarias. Esta interacción regula la actividad de la adenilato ciclasa y por lo tanto la producción de una molécula mensajera secundaria, cAMP. El cAMP regula la fosforilación y activación de otras proteínas intracelulares. De manera alternativa, los niveles celulares de otras moléculas mensajeras secundarias, tales como cGMP o eicosinoides, pueden estar regulados positivamente o regulados negativamente por la actividad de los GPCR. La subunidad  $\alpha$  de la proteína G se desactiva por hidrólisis del GTP por la GTPasa, y se reasocian las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La proteína G heterotrimérica entonces se disocia por la adenilato ciclasa u otro generador de molécula mensajera secundaria. La actividad de GPCR también se puede regular por la fosforilación de los dominios intra- y extracelulares o bucles.

Los receptores del glutamato forman un grupo de GPCR que son importantes en la neurotransmisión. El glutamato es el neurotransmisor más importante del SNC y se cree que tiene papeles importantes en la plasticidad neuronal, conocimiento, memoria, aprendizaje y algunos trastornos neurológicos tales como la epilepsia, ictus, y neurodegeneración (Watson, S. y S. Arkininstall, The G- Protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press, San Diego CA, pp. 130-132, 1994). La familia del polipéptido vasoactivo intestinal (VIP) es un grupo de polipéptidos relacionados cuyas acciones también están mediadas por los GPCR. Los miembros clave de esta familia son los VIP por sí mismos, secretina, y factor liberador de hormona del crecimiento (GRF). El VIP tiene un amplio perfil de acciones fisiológicas que incluyen la relajación del músculo liso, estimulación o inhibición de la secreción en varios tejidos, modulación de varias actividades celulares inmunitarias, y varias actividades de excitación o inhibición del SNC. La secretina estimula la secreción de enzimas e iones en el páncreas y el intestino y también están presentes en el cerebro en pequeñas cantidades.

En general, los facultativos de la presente divulgación seleccionarán su proteína o polipéptido de interés, y sabrán su secuencia de aminoácidos precisa. Cualquier polipéptido determinado que se va a expresar de acuerdo con la presente divulgación tendrá sus propias características particulares y pueden influir en la densidad o viabilidad de las células cultivadas, y puede expresarse a niveles más bajos que otro polipéptido o proteína cultivados bajo condiciones de cultivo idénticas. Un experto habituado en la técnica será capaz de modificar apropiadamente los medios y procedimientos descritos en el presente documento con el fin de optimizar el crecimiento celular, el título, la glucosilación, plegamiento o cualquier otra propiedad de un determinado polipéptido o proteína que se exprese.

#### Introducción de genes para la expresión de polipéptidos en las células huésped

En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico que se introduce en la célula codifica el polipéptido deseado que se va a expresar de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico puede codificar un producto genético que induce la expresión del polipéptido deseado por la célula. Por ejemplo, el material genético introducido puede codificar un factor de transcripción que activa la transcripción de un polipéptido endógeno o heterólogo. Alternativa o adicionalmente, la molécula de ácido nucleico que se introduce puede aumentar la traducción o estabilidad de un polipéptido que expresa la célula.

Los procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para conseguir la expresión de un polipéptido de interés en células huésped de mamífero como se conoce en la técnica. Véase por ejemplo, Gething y col., Nature, 293:620-625, 1981; Mantei y col., Nature, 281:40-46, 1979; Levinson y col. EP 117.060; y documento EP 117.058. Para las células de mamífero, los procedimientos comunes de introducción de material genético en una célula incluye el procedimiento de precipitación en fosfato cálcico de Graham y van der Erb, Virology, 52:456-457, 1978 o la lipofectamina™ ((Gibco BRL) Method of Hawley-Nelson, Focus 15:73, 1993. Los aspectos generales de las transformaciones del sistema de células huésped de mamífero han sido descritos por Axel en la Pat. de EE. UU. N° 4.399.216 presentada el 15 de agosto de 1983. Para las distintas técnicas de introducción de material genético en células de mamífero, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537, 1990, y Mansour y col., Nature, 336:348-352, 1988.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que se va a introducir está en forma de molécula de ácido nucleico desnuda. En algunos aspectos de estas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que se introduce en una célula consiste solo en el ácido nucleico que codifica el polipéptido y los elementos de control genético necesarios. En algunos aspectos de estas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el polipéptido (incluyendo los elementos reguladores necesarios) está contenido en un vector plásmido. Ejemplos no limitantes representativos de vectores adecuados para la expresión de polipéptidos en células de mamífero incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, y col., Mol. Cell Biol. 5:1136-1142, 1985; pMCIneo Poly-A, véase Thomas, y col., Cell 51:503-512, 1987; un vector baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610; CDM8 (Seed, B., Nature 329:840, 1987) y pMT2PC (Kaufman, y col., EMBO J. 6:187-195, 1987). En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que se va a introducir en una célula está contenida en un vector vírico. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido se puede insertar en el genoma vírico (o un genoma vírico parcial). Los elementos reguladores que dirigen la expresión del polipéptido pueden incluirse con el ácido nucleico insertado en el genoma vírico (es decir, unido al gen insertado en el genoma vírico) o se puede proporcionar por el genoma vírico en sí mismo.

El ADN desnudo se puede introducir en las células formando un precipitado que contiene el ADN y fosfato cálcico. Adicional o alternativamente, el ADN desnudo también se puede introducir en las células formando una mezcla del ADN y DEAE-dextrano e incubando la mezcla con las células o incubando las células y el ADN juntos en un tampón adecuado y sometiendo las células a un pulso eléctrico de alto voltaje (es decir, por electroporación). En algunas realizaciones, el ADN desnudo se introduce en las células mezclando el ADN con una suspensión de liposomas que contiene lípidos catiónicos. El complejo ADN/liposoma se incuba entonces con las células. El ADN desnudo también se puede inyectar directamente en las células por, por ejemplo, microinyección.

Adicional o alternativamente, el ADN desnudo se puede introducir en las células formando un complejo del ADN con un catión, tal como la polilisina, que se acopla a un ligando por un receptor de superficie celular (véase por ejemplo, Wu, G. y Wu, C.H., J. Biol. Chem. 263:14621, 1988; Wilson y col., J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992; y la Patente de EE. UU. N° 5.166.320). La unión del complejo ADN-ligando al receptor facilita la captación del ADN por endocitosis mediada por receptor.

El uso de vectores víricos que contienen secuencias de ácido nucleico particulares, por ejemplo, un ADNc que codifica un polipéptido, es una estrategia común para introducir secuencias de ácido nucleico en una célula. La infección de células con un vector vírico tiene la ventaja de que una proporción grande de células reciben el ácido nucleico, lo que puede obviar la necesidad de células que han recibido el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas con el vector vírico, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector vírico, se expresan en general eficazmente en las células que han captado el ácido nucleico del vector vírico.

Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia de genes con fines de terapia de transferencia genética (para una revisión, véase Miller, A.D., *Blood* 76:271, 1990). Se puede construir un retrovirus recombinante que tenga un ácido nucleico que codifique un polipéptido de interés insertado en el genoma retroviral. Adicionalmente, se pueden retirar partes del genoma retroviral para dar lugar a la replicación defectuosa del retrovirus. La replicación defectuosa del retrovirus se empaqueta en viriones que se pueden utilizar para infectar una célula diana por medio del uso de un virus auxiliar por técnicas de referencia.

El genoma de un adenovirus se puede modificar tal que codifica y expresa un polipéptido de interés pero que está inactivado en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida vírica lítico normal. Véase, por ejemplo, Berkner y col., *BioTechniques* 6:616, 1988; Rosenfeld y col., *Science* 252:431-434, 1991; y Rosenfeld y col., *Cell* 68:143-155, 1992. Los vectores adenovirus adecuados derivados de la cepa vírica de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) se conocen en la técnica. Los adenovirus recombinantes son ventajosos porque no necesitan la división celular para ser eficaces vehículos de suministro y se pueden utilizar para infectar una gran variedad de tipos celulares, incluyendo el epitelio de vías aéreas (Rosenfeld y col., 1992, citado supra), células endoteliales (Lemarchand y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6482-6486, 1992), hepatocitos (Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993) y células musculares (Quantin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584, 1992). Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y el ADN ajeno contenido en el mismo) no se integra en el genoma de una célula huésped sino que permanece episómico, evitando de esa manera los problemas potenciales que pueden producirse como resultado de mutagénesis de inserción en situaciones en las que el ADN que se introduce llega a integrarse en el genoma del huésped (por ejemplo, el ADN retroviral). Además la capacidad de sostener del genoma adenoviral para ADN ajeno es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de suministro genético (Berkner y col., citado supra; Haj-Ahmand y Graham, *J. Virol.* 57:267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales con replicación defectuosa que se utilizan habitualmente tienen eliminados todos o partes de los genes víricos E1 y E2 pero mantienen como un 80% del material genético adenoviral.

Los virus adenoasociados (AAV) es un virus defectuoso de origen natural que necesita otro virus, tales como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para una replicación eficaz y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión, véase Muzyczka y col., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129, 1992). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen, y muestran una alta frecuencia de integración estable (véase por ejemplo, Flotte y col., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356, 1992; Samulski y col., *J. Virol.* 63:3822-3828, 1989; y McLaughlin y col., *J. Virol.* 62:1963-1973, 1989). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar y se pueden integrar. El espacio para ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector AAV tal como el que se describe en Tratschin y col., (*Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260, 1985) se puede utilizar para introducir ADN en células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos celulares utilizando vectores AAV (véase por ejemplo, Hermonat y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470, 1984; Tratschin y col., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081, 1985; Wondisford y col., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39, 1988; Tratschin y col., *J. Virol.* 51:611-619, 1984; y Flotte y col., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790, 1993).

Cuando el procedimiento que se utiliza para introducir las moléculas de ácido nucleico en una población de células da como resultado la modificación de una gran proporción de las células y una expresión eficaz del polipéptido por las células, la población modificada de células puede utilizarse sin más aislamiento o subclonación de células individuales en la población. Es decir, puede haber suficiente producción del polipéptido por la población de células que no se necesite aislamiento celular posterior y la población se puede utilizar inmediatamente para sembrar un cultivo celular para la producción del polipéptido. En algunas realizaciones, puede ser deseable aislar y expandir una población homogénea de células a partir de una sola célula que produce eficazmente el polipéptido.

Una alternativa a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una células que codifica un polipéptido de interés, un ácido nucleico introducido puede codificar otro polipéptido, proteína o elemento regulador que induce o aumenta el nivel de expresión de la proteína o polipéptido producido endógenamente por una célula. Por ejemplo, una célula puede ser capaz de expresar un polipéptido particular pero puede fallar al hacerlo sin el tratamiento adicional de la célula. De manera similar, la célula puede expresar cantidades insuficientes del polipéptido para el fin que se desea. Por lo tanto, se puede utilizar un agente que estimula la expresión del polipéptido de interés para inducir o aumentar la expresión de ese polipéptido por la célula. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico introducida puede codificar un factor de transcripción que activa o regula positivamente la transcripción el polipéptido de interés. La expresión de tal factor de transcripción a su vez da lugar a la expresión, o expresión más robusta, del polipéptido de interés. De manera similar, la molécula de ácido nucleico introducida puede contener uno o más elementos reguladores que eliminan los títulos de uno o más represores de la transcripción de una región reguladora del polipéptido de interés.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión del polipéptido se introduce establemente en la célula huésped. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión del polipéptido se introduce transitoriamente en la célula huésped. Un experto en la técnica será capaz de elegir si introduce establemente o transitoriamente el ácido nucleico en la célula basándose en sus necesidades experimentales.

5 Un gen que codifica un polipéptido de interés puede unirse opcionalmente a uno o más elementos reguladores de control genético. En algunas realizaciones un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva del polipéptido. En algunas realizaciones, un elemento genético de control (por ejemplo un promotor inducible) permite la modulación de la producción del polipéptido en la célula. Ejemplos no limitantes de elementos potenciales de control genético para su uso en células eucariotas incluyen elementos regulados por hormonas (véase, por ejemplo, Mader, S. y White, J.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607, 1993), elementos regulados por ligandos sintéticos (véase, por ejemplo, Spencer, D.M. y col., Science 262:1019-1024, 1993) y elementos regulados por radiación ionizante (véase, por ejemplo, Manome, Y. y col., Biochemistry 32:10607-10613, 1993; Datta, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10149-10153, 1992). Se pueden utilizar sistemas adicionales específicos de células u otros sistemas reguladores que se conocen en la técnica de acuerdo con los procedimientos y composiciones descritas en el presente documento.

Un experto en la técnica será capaz de escoger y, opcionalmente, modificar apropiadamente el procedimiento de introducción de genes que produce que la célula exprese el polipéptido de interés de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

#### Aislamiento del polipéptido expresado

20 En ciertas realizaciones, es deseable aislar y/o purificar las proteínas o polipéptidos expresados de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, un polipéptido o proteína que se expresa se segrega en el medio y por lo tanto las células y otros sólidos se pueden retirar, por ejemplo, por centrifugación o por filtración, como una primera etapa en el proceso de purificación.

25 En algunas realizaciones, un polipéptido o proteína que se expresa están unidos a la superficie de la célula huésped. En tales realizaciones, los medios se retiran y las células huésped que expresan el polipéptido o la proteína se lisan como una primera etapa del proceso de purificación. La lisis de células de mamífero se puede conseguir por varios medios que se conocen por los expertos habituados en la técnica, incluyendo la rotura por perlas de cristal y la exposición a condiciones de pH altas.

30 Un polipéptido o proteína se puede aislar o purificar por procedimientos de referencia que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño, y cromatografía hidroxipatita), filtración en gel, centrifugación, o solubilidad diferencial, precipitación en etanol o por cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2ª Edición, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. and Hames, B.D. (eds.), Protein Expression : A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification : Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol 182), Academic Press, 1997). Por cromatografía de inmunoafinidad en particular, la proteína se puede aislar uniéndola a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se han preparado contra esa proteína y se han fijado en un soporte inmóvil. Los marcadores de afinidad tales como una secuencia de revestimiento de influenza, poli-histidina, o glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína por técnicas recombinantes de referencia para permitir la purificación fácil por el paso sobre la columna de afinidad adecuada. Se pueden añadir inhibidores de proteasas tales como fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), leupeptinina pepstatina, o aprotinina en cualquiera de los estadios con el fin de reducir o eliminar la degradación del polipéptido o la proteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de proteasas son particularmente ventajosos cuando se tienen que lisar las células con el fin de aislar y purificar el péptido o proteína que se expresa.

45 Las proteínas o polipéptidos que se expresa de acuerdo con ciertos procedimientos de la presente invención puede tener patrones de glucosilación más extensos y/o modificados que los que tendría si se cultiva bajo condiciones de cultivo celular no inventivas. Por lo tanto, un beneficio práctico de la presente invención que puede explotarse en la etapa de purificación es que los restos de azúcar adicionales y/o modificados presentes en una glucoproteína cultivada de acuerdo con ciertos de los presentes procedimientos inventivos y/o composiciones puede conferir propiedades bioquímicas distintas que puede utilizar el facultativo para purificar esa glucoproteína más fácilmente, o con una pureza mayor, de lo que sería posible para una glucoproteína cultivada de acuerdo con procedimientos y/o composiciones no inventivos.

55 Un experto habituado en la técnica apreciará que la técnica exacta de purificación puede variar dependiendo de las características del polipéptido o proteína que se va a purificar, de las características de las células a partir de las que se expresa el polipéptido o proteína, y/o la composición del medio en el que se cultivan las células.

#### Composiciones inmunogénicas

Las proteínas y polipéptidos producidos de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación también se pueden utilizar en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, como vacunas. En ciertas realizaciones, una

reducción en el mal plegamiento y/o agregación de la proteína o polipéptido producidos da como resultado una composición inmunogénica más eficaz.

5 En ciertas realizaciones, un patrón de glucosilación mejorado que se consigue produciendo glucoproteínas de acuerdo con ciertos procedimientos y/o composiciones de la presente invención da como resultado una composición inmunogénica más eficaz. Por ejemplo, una composición inmunogénica que contiene la glucoproteína producida puede desencadenar una respuesta inmunitaria más eficaz en la que el sistema inmunitario del sujeto produce un número mayor de anticuerpos contra la glucoproteína y/o produce anticuerpos que muestran una mayor especificidad por la glucoproteína inmunogénica. Adicional o alternativamente, una composición inmunogénica puede incluir uno o más vehículos fisiológicamente aceptables.

10 En general, la selección de la "cantidad eficaz" o dosificación apropiada para los componentes de una composición(es) inmunogénica(s) se basa típicamente en una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a la identidad del polipéptido(s) seleccionado(s) en la composición inmunogénica que se emplee, el patrón de glucosilación del polipéptido(s), y el estado físico del sujeto, más especialmente incluyendo la salud general, edad y peso del sujeto inmunizado. Como se conoce en la técnica, los procedimientos y vías de administración particulares y la presencia de componentes adicionales en las composiciones inmunogénica también puede afectar las dosificaciones y cantidades de las composiciones de plásmido ADN. Tal selección y ajuste al alza o a la baja de la dosis eficaz está dentro de la experiencia de la técnica. La cantidad de composición inmunogénica que se necesita para inducir una respuesta inmunitaria, incluye pero no se limita a una respuesta protectora, o producir un efecto exógeno en el paciente sin efectos secundarios adversos significativos varía dependiendo de estos factores. Las dosis adecuadas las determinan fácilmente los expertos en la técnica.

25 Ciertas composiciones inmunogénicas de la presente divulgación pueden contener un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que aumenta la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o un antígeno. Varias citoquinas o linfoquinas se ha demostrado que tienen actividad de modulación inmunitaria, y por lo tanto se pueden utilizar como adyuvantes, incluyendo, pero sin limitarse a las interleucinas 1- $\alpha$ , 1- $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.078.996), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, GSF, y los factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ . Otros adyuvantes útiles incluyen, sin limitación, una molécula tipo mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de integrinas tales como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas tales como PECAM, ICAM, por ejemplo, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas co-estimulantes tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1, y factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas receptoras que incluyen, Fas, receptor TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6. Otra molécula adyuvante incluye Caspasa (ICE). Véase también la Publicación de Patente internacional N°s WO98/17799 y WO99/43839.

40 También son útiles como adyuvantes las toxinas de cólera (CT) y mutantes de las mismas, que incluyen las que se describen en la Solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434 (en que el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se reemplaza por otro aminoácido distinto de ácido aspártico, por ejemplo una histidina). Se describen CT similares o mutantes en la Solicitud de Patente internacional publicada N° 02/098368 (en que la isoleucina en la posición de aminoácido 16 se reemplaza por otro aminoácido, sea solo o en combinación con el reemplazo de la serina de la posición de aminoácido 68 por otro aminoácido; y/o en que la valina en la posición de aminoácido 72 se reemplaza por otro aminoácido). Otras toxinas CT se describen en la Solicitud de Patente internacional publicada número WO 02/098369 (en que la arginina en la posición de aminoácido 25 se reemplaza por otro aminoácido; y/o un aminoácido se inserta en la posición de aminoácido 49; y/o dos aminoácidos se insertan en las posiciones de aminoácido 35 y 36).

50 En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación se administran a un ser humano o vertebrado no humano por una variedad de vías que incluyen, pero no se limitan a, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, transdérmica, (véase por ejemplo, la Publicación de patente internacional N° WO 98/20734), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial. La vía adecuada se puede seleccionar dependiendo de la naturaleza de la composición inmunogénica que se utilice, una evaluación de la edad, el peso, sexo, y salud general del paciente y los antígenos presentes en la composición inmunogénica, y/o otros factores que conocen los expertos habitados en la técnica.

55 En ciertas realizaciones, las composiciones inmunogénicas se administran en múltiples veces. El orden de administración de la composición inmunogénica y los periodos de tiempo entre las administraciones individuales puede seleccionarlos un experto en la técnica basándose en factores relevantes conocidos por los expertos habitados en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a las características físicas y las respuestas precisas del huésped a la aplicación del procedimiento.

Formulaciones farmacéuticas

En ciertas realizaciones, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán una actividad farmacéutica y serán útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas como se ha descrito anteriormente a un sujeto o se puede formular primero para el suministro por cualquier vía disponible, incluyendo, pero sin limitarse a las vías parenteral, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, oral, bucal, sublingual, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal, y vaginal. Las composiciones farmacéuticas típicamente incluyen un polipéptido o proteína expresados por una línea celular de mamífero, un agente de suministro (es decir, un polímero catiónico, un transportador molecular peptídico, tensioactivo, etc., como se ha descrito anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar a las composiciones de la presente divulgación. Por ejemplo, una proteína o polipéptido que se produce de acuerdo con la presente divulgación se puede conjugar con fármacos para farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica, y radionúclidos (véase, por ejemplo, Kunz y col., Calicheamicin derivative-carrier conjugates, US20040082764 A1). Ingredientes adicionales útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes suspensores, cargas, sustancias de deslizamiento, ayudas de compresión, aglutinantes, agentes desintegrantes de comprimidos, materiales encapsulantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes espesantes, agentes colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores, o combinaciones de los mismos.

Alternativa o adicionalmente, una proteína o polipéptido producidos de acuerdo con la presente invención puede administrarse en combinación con (sea simultánea o secuencialmente) uno o más agentes farmacéuticamente activos. Una lista ejemplar de estos agentes farmacéuticamente activos se puede encontrar en la Physicians' Desk Reference, 55 Edición, published by Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ, 2001. Para muchos de estos agentes enumerados, las dosificaciones farmacéuticamente eficaces y regímenes se conocen en la técnica; muchos se presentan en la misma Physicians' Desk Reference.

Las composiciones farmacéuticas sólidas pueden contener uno o más vehículos sólidos, y opcionalmente uno o más de otros aditivos tales como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes suspensores, cargas, sustancias de deslizamiento, ayudas a la compresión, aglutinantes o agentes desintegrantes de comprimidos o un material encapsulante. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato cálcico, estearato magnésico, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, ceras de fusión baja o resinas de intercambio iónico, o combinaciones de los mismos. En las composiciones farmacéuticas en polvo, el vehículo puede ser un sólido dividido finamente que está en una mezcla con el principio activo dividido finamente. En los comprimidos, el principio activo está mezclado en general con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas, y opcionalmente, otros aditivos, y se compactan con la forma y tamaño deseados.

Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener el polipéptido o proteína que se expresan de acuerdo con la presente invención y uno o más vehículos líquidos para formar soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires, o composiciones bajo presión. Los vehículos líquidos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos, aceites o grasas farmacéuticamente aceptables, o combinaciones de los mismos. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticamente adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes saborizantes, agentes suspensores, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores, o combinaciones de los mismos. Si la formulación líquida se pretende que sea para uso pediátrico, en general es deseable evitar la inclusión de, o limitar la cantidad de, alcoholes.

Ejemplos de vehículos líquidos adecuados para la administración oral o parenteral incluyen agua (opcionalmente que contiene aditivos tales como derivados de la celulosa tales como la carboximetilcelulosa sódica), alcoholes o sus derivados (incluyendo alcoholes monohídricos o alcoholes polihídricos tales como los glicoles) o aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para la administración parenteral el vehículo puede ser también un éster oleoso tal como el oleato de etilo y el miristato de isopropilo. El vehículo líquido para las composiciones bajo presión pueden ser hidrocarburos halogenados y otros propulsores farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que sean soluciones o suspensiones estériles se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo por, inyección intramuscular, intraperitoneal, epidural, intratecal, intravenosa o subcutánea. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral o transmucosa pueden ser en forma líquida o sólida.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica se formula para ser compatible con la vía de administración que se pretende. Las soluciones o suspensiones que se utilizan para su aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea puede incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tales como el agua para inyección,

5 solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como el ácido clorhídrico y el hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricadas en cristal o plástico.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada (PBS). En todos los casos, la composición debería ser estéril y debería ser fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable con una jeringa. Ventajosamente, ciertas formulaciones farmacéuticas son estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas necesaria en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorbutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En ciertos casos, será útil incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el polipéptido o proteína purificados en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido por una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el polipéptido o proteína purificados que se expresan en una línea celular de mamífero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos ventajosos de preparación son desecación al vacío y desecación por congelación que produce un polvo del principio activo más un ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

35 Las composiciones orales en general incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Con el fin de administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificados se pueden incorporar con excipientes y se utilizan en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales se pueden preparar también utilizando un vehículo fluido, por ejemplo, por el uso de un colutorio. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar; un aglutinante tal como la celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como el ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como el estearato magnésico o esteroides; una sustancia deslizante tal como el dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como la sacarosa o la sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja. Tales preparaciones pueden ser formulaciones masticables o líquidas mezcladas o materiales o líquidos alimentarios si fuera deseable, por ejemplo para facilitar la administración a niños o a individuos que tienen comprometida la capacidad de tragar los comprimidos, o a animales. Las formulaciones para suministro oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad en el tracto gastrointestinal y/o aumentar la absorción.

50 Para la administración por inhalación, las composiciones que comprenden un polipéptido o proteína purificados que se expresan en una línea celular de mamífero y un agente de suministro también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación y se suministran convenientemente en una forma de presentación en un inhalador de polvo seco o un pulverizador en aerosol en un envase bajo presión, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A™) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA™), dióxido carbónico y otro gas adecuado. En el caso de un aerosol bajo presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para un suministro medido, por ejemplo, una cantidad eficaz. La presente divulgación contempla particularmente el suministro de composiciones utilizando un pulverizador nasal, inhalador, u otro suministro directo en las vías aéreas altas y/o bajas. La administración intranasal de vacunas ADN dirigidas contra los virus de la influenza se ha demostrado que induce respuestas de linfocitos T CD8, lo que indica que al menos algunas células del tracto respiratorio pueden captar el ADN cuando se suministra por esta vía, y los agentes de suministro aumentarán la captación celular. De acuerdo con ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado que se expresa a partir de una línea celular de mamífero y un agente de suministro se formulan como grandes partículas porosas para la administración por aerosol.



Las formas de dosificación oral de liberación modificada o liberación pulsátil pueden contener excipientes que actúan como modificadores de la tasa de liberación, estando estos revestidos en y/o incluidos en el cuerpo del dispositivo. Los modificadores de la tasa de liberación incluyen pero no se limitan exclusivamente a, hidroxipropilmetil celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, etil celulosa, acetato de celulosa, óxido de polietileno, goma xantano, carbómero, copolímero de metacrilato amonio, aceite de ricino hidrogenado, cera de carnauba, cera de parafina, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetil celulosa, copolímero de ácido metacrílico y mezclas de los mismos. Las formas de dosificación con liberación modificada y liberación pulsátil pueden contener uno o una combinación de excipientes modificadores de la tasa de liberación. Los excipientes modificadores de la tasa de liberación pueden estar presentes ambos en la forma de dosificación, es decir en la matriz y/o en la forma de dosificación, es decir en la superficie o revestimiento.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para que se permeabilice la barrera. Tales penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir por medio del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el polipéptido o proteína purificado y los agentes de suministro se pueden formular como un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, propilenglicol, compuesto polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. De manera alternativa, se pueden formular como una crema o loción adecuada, suspendidos o disueltos en, por ejemplo uno de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

De manera alternativa, los compuestos se pueden administrar en forma de un supositorio o supositorio vaginal, o se pueden aplicar tópicamente en forma de gel, hidrogel, loción u otros glicéridos, solución, crema, ungüento o polvos secantes.

En algunas realizaciones, las composiciones se preparan con vehículos que protegerán al polipéptido o la proteína contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes y sistemas de suministro microencapsulados. En general, las composiciones se pueden formular para suministro de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán aparentes para los expertos en la técnica. Los materiales adecuados se pueden obtener también comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden utilizar suspensiones de liposomas (incluyendo los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos mononucleares contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. N° 4.522.811.

Las proteínas y polipéptidos que se producen de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar en combinación con una ciclodextrina. Las ciclodextrinas se conocen por formar complejos de inclusión y no inclusión con ciertas moléculas. La formación de un complejo de ciclodextrina puede modificar la propiedad de solubilidad, tasa de disolución, biodisponibilidad y/o estabilidad de una proteína o polipéptido. Los complejos de ciclodextrina son útiles en general para la mayoría de las formas de dosificación y vías de administración. Como alternativa a la formación directa de complejos con la proteína o el polipéptido, la ciclodextrina se puede utilizar como un aditivo auxiliar, por ejemplo, como un vehículo, diluyente o solubilizante. Las ciclodextrinas alfa, beta y gamma son las que se utilizan más comúnmente y se describen ejemplos adecuados en las solicitudes de patente internacional publicadas WO91/11172, WO94/02518 y WO98/55148.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se proporcionan en forma de dosificación unitaria, tales como comprimidos o cápsulas. Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificaciones unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. En tales formas, la composición se puede sub-dividir en dosis unitarias que contengan cantidades apropiadas del polipéptido o la proteína. Las formas de dosificación unitaria pueden ser composiciones empaquetadas, por ejemplo polvos empaquetados, viales, ampollas, jeringas pre-cargadas o bolsitas que contienen líquidos. La forma de dosificación unitaria puede ser por ejemplo, una cápsula o comprimido por sí mismo, o puede estar en un número apropiado de cualquiera de tales composiciones en forma empaquetada. Como reconocerá un experto en la técnica, la dosificación unitaria terapéuticamente eficaz dependerá de varios factores que incluyen, por ejemplo, el procedimiento de administración, la potencia del polipéptido o la proteína, y/o el peso del receptor y las identidades de otros componentes de la composición farmacéutica.

Un polipéptido o proteína que se expresa de acuerdo con la presente invención se puede administrar a varios intervalos y sobre diferentes periodos de tiempo según se necesite, por ejemplo, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, entre 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas, aproximadamente 4, 5, o 6 semanas, etc. El experto apreciará que hay ciertos factores que pueden influenciar en la dosificación y el tiempo necesario para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero sin limitarse a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. El

tratamiento de un sujeto con un polipéptido o proteína que se describe en el presente documento puede comprender un tratamiento único o una serie de tratamientos. Además, se entiende que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y puede opcionalmente ajustarse al receptor particular, por ejemplo, por medio de la administración de dosis en aumento hasta que se alcanza una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específica para un sujeto animal en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del polipéptido o proteína específicos que se empleen, la edad, el peso corporal, la salud general, el género, y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos, y el grado de expresión o actividad que se va a modular.

La presente divulgación engloba el uso de las composiciones para el tratamiento de animales no humanos. En consecuencia, las dosis y procedimientos de administración se pueden seleccionar de acuerdo con principios conocidos en farmacología y medicina veterinaria. Se puede encontrar una guía, por ejemplo, en Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8ª edición, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un contenedor, paquete, o dispensador junto con las instrucciones para la administración.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Formulaciones de los medios

La presente divulgación engloba el hallazgo de que los polipéptidos producidos por un cultivo de células cultivadas en medios de cultivo que contienen cobre y/o glutamato a una o más concentraciones inventivas muestran niveles reducidos de mal plegamiento y/o agregación que los que habría si de otra forma las células se cultivaran en medios tradicionales. La presente divulgación también engloba el hallazgo de que los polipéptidos producidos por un cultivo de células cultivadas en medios de cultivo que contienen cobre y/o glutamato a una o más concentraciones inventivas muestran un aumento de la glucosilación total que las que se observarían de otra manera si las células se cultivaran en medios tradicionales. El cobre y/o glutamato se pueden añadir a cualquier medio de cultivo que sea capaz de soportar el crecimiento celular. Medios de cultivo ejemplares a los que se puede añadir cobre y/o glutamato con cualquiera de las concentraciones inventivas se enumeran en la Tabla 1, aunque la presente divulgación no se limita a la utilización de estos medios de cultivo. Como entenderá un experto habituado en la técnica, se puede utilizar otros medios de cultivo para cultivar células y/o se pueden hacer ciertas alteraciones a las composiciones de los medios de cultivo ejemplares que se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo ejemplares

	Medio A		Medio B		Medio C		Medio D		Medio E	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
<b>Aminoácidos</b>										
alanina	96,03	1,08	24,87	0,28	17,80	0,20			24,87	0,28
arginina	1186,99	6,82	423,43	2,43	696,00	4,00	84,00	0,40	423,43	2,43
Asparagina ·H <sub>2</sub> O	713,59	4,76	173,90	1,16	3000	20,00			173,90	1,16
ácido aspártico	318,53	2,39	52,72	0,40	219,45	1,65			52,72	0,40
cysteine·HCl·H <sub>2</sub> O	70,01	0,40	70,01	0,40	70,40	0,40	35,10	0,20	70,01	0,40
cysteine·2HCl	297,09	0,95	62,09	0,20	468,75	1,50			62,09	0,20
ácido glutámico									41,08	0,28
glutamato monosódico	158,59	1,08	41,08	0,28	33,80	0,20				
glutamina	1892,40	12,96	1162,40	7,96	584,00	4,00	584,60	4,00	1162	7,96
glicina	95,88	1,28	35,92	0,48	115,50	1,54	30,00	0,40	35,92	0,48
Histidina ·HCl·H <sub>2</sub> O	369,10	1,76	75,27	0,36	474,60	2,26	42,00	0,20	75,27	0,36
isoleucina	623,63	4,76	151,90	1,16	570,73	4,36	104,80	0,80	151,90	1,16
leucina	852,31	6,51	172,69	1,32	1030	7,87	104,80	0,80	172,69	1,32
Lisina ·HCl	945,96	5,20	218,38	1,20	1401	7,70	146,20	0,80	218,38	1,20
metionina	291,82	1,96	53,55	0,36	387,40	2,60	30,00	0,20	53,55	0,36
fenilalanina	428,62	2,60	98,81	0,60	507,00	3,07	66,00	0,40	98,81	0,60
prolina	372,25	3,24	96,40	0,84	539,50	4,69			96,40	0,84
serina	904,71	6,62	273,07	2,60	1052	10,02			273,07	2,60
treonina	513,39	4,31	132,81	1,12	564,80	4,75	95,20	0,80	132,81	1,12
triptófano	159,32	0,78	28,99	0,14	274,16	1,34	16,00	0,08	28,99	0,14
Tirosina ·2Na·2H <sub>2</sub> O	560,81	2,15	145,10	0,58	745,75	2,86	89,46	0,40	145,10	0,58
valina	505,36	4,32	131,17	1,12	749,00	6,40	93,60	0,80	131,17	1,12

(continuación)

<b>Vitaminas</b>	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
biotina	2,00	8,21	0,36	1,49	2,68	11,00	4,00	16,11	4,00	11,00	0,36	1,49
pantotenato cálcico	22,02	46,27	4,03	8,47	21,92	46,06	4,00	16,11	4,00	11,00	4,03	8,47
Cloruro de colina	87,67	630,74	16,11	115,92	158,46	1140,	4,00	16,11	4,00	11,00	16,11	115,92
ácido fólico	25,95	58,84	4,76	10,80	25,93	58,80	4,00	16,11	4,00	11,00	4,76	10,80
inositol	123,39	685,47	22,64	125,79	163,98	911,00	7,00	22,64	7,00	22,64	22,64	125,79
nicotinamida	19,60	160,70	3,61	29,62	26,23	215,00	4,00	16,11	4,00	11,00	3,61	29,62
Pyridoxal -HCl	1,99	9,83	1,99	9,83	2,03	10,00	4,00	16,11	4,00	11,00	1,99	9,83
Plidoxina -HCl	18,06	87,67	1,67	8,10	36,13	175,38	4,00	16,11	4,00	11,00	1,67	8,10
riboflavina	2,20	5,85	0,40	1,06	2,41	6,42	0,40	1,61	0,40	1,61	0,40	1,06
Tiamina -HCl	21,51	63,84	3,92	11,64	39,43	117,00	4,00	16,11	4,00	11,00	3,92	11,64
vitamina B12	5,93	5,12	1,34	0,99	21,17	15,62	4,00	16,11	4,00	11,00	1,34	0,99
<b>Sales Inorgánicas</b>	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
CaCl <sub>2</sub>	115,78	1,04	115,78	1,04	116,55	1,05	200,0	1,80	200,0	1,80	115,78	1,04
KCl	310,94	4,17	310,94	4,17	312,90	4,19	400,0	5,40	400,0	5,40	310,94	4,17
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70,81	0,50	70,81	0,50	55,60	0,40	400,0	5,40	400,0	5,40	70,81	0,50
NaCl	1104,96	18,92	3704,96	63,44	1100	18,80	6400,0	110,30	6400,0	110,30	3704	63,44
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	636,33	4,61	114,53	0,83	645,84	4,68	140,0	0,91	140,0	0,91	114,53	0,83
MgSO <sub>4</sub>	48,70	0,41	48,70	0,41							48,70	0,41
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	95,00	0,39	8,60	0,03	138,00	1,15	200,0	0,80	200,0	0,80	8,60	0,03
MgCl <sub>2</sub>	28,53	0,30	28,53	0,30	28,50	0,30	3700,0	44,00	3700,0	44,00	28,53	0,30
NaHCO <sub>3</sub>	2000,00	23,81	1220,00	14,52	2000	23,81	3700,0	44,00	3700,0	44,00	2440	29,04
<b>Elementos Traza</b>	µ/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM	µg/L	nM
Selenio Sódico	28,00	161,94	7,00	40,49	69,16	400,00	7,00	40,49	7,00	40,49	7,00	40,49

(continuación)

Elementos Trazas	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM					
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -9H <sub>2</sub> O	49,86	123,42	49,86	123,42	50,00	123,76	0,10	250	49,86	123,42	50,00	123,76	0,10	250	49,86	123,42	50,00	123,76	0,10	250	49,86	123,42	
CuSO <sub>4</sub>	2,69	16,80	0,97	6,06	10,24	64,00			0,97	6,06	10,24	64,00			0,97	6,06					0,97	6,06	
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	11,24	45,00	7,49	30,00	99,88	400,00			7,49	30,00	99,88	400,00			7,49	30,00					7,49	30,00	
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	2503,85	9006,54	1542	5549	4170	15000			1542	5549	4170	15000			1542	5549					1542	5549	
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	2734,77	9528,92	1383	4821	2540	9200			1383	4821	2540	9200			1383	4821					1383	4821	
MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	0,26	1,51	0,17	1,01	33,80	200,00			0,17	1,01	33,80	200,00			0,17	1,01					0,17	1,01	
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> -9H <sub>2</sub> O	2 10,00	739,27	140	492,84	284,07	1000			140	492,84	284,07	1000			140	492,84					140,00	492,84	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>8</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> -4H <sub>2</sub> O	1,86	1,50	1,24	1,00	247,20	200,00			1,24	1,00	247,20	200,00			1,24	1,00					1,24	1,00	
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,98	8,33	0,65	5,56	2,34	20,00			0,65	5,56	2,34	20,00			0,65	5,56					0,65	5,56	
NiSO <sub>4</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,20	0,74	0,13	0,49	5,26	20,00			0,13	0,49	5,26	20,00			0,13	0,49					0,13	0,49	
SnCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,18	0,80	0,12	0,53	0,90	4,00			0,12	0,53	0,90	4,00			0,12	0,53					0,12	0,53	
AlCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O					0,97	4,00					0,97	4,00											
KBr					0,48	4,00					0,48	4,00											
CrCl <sub>3</sub>					15,83	100,00					15,83	100,00											
NaF					0,17	4,00					0,17	4,00											
GeO <sub>2</sub>					0,42	4,00					0,42	4,00											
KI					33,20	200,00					33,20	200,00											
RbCl					0,48	4,00					0,48	4,00											
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>					12,37	200,00					12,37	200,00											
LiCl					0,17	4,00					0,17	4,00											
Otros Componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	
Hidroocortisona	0,23	0,64	0,0864	0,24	540,00	1,49			0,0864	0,24	540,00	1,49			0,0864	0,24					0,09	0,24	
Putrescina -2HCl	6,48	40,22	2,48	15,39	15000	93,11			2,48	15,39	15000	93,11			2,48	15,39					2,48	15,39	
ácido linoleico	0,22	0,80	0,057	0,20	290,00	1,04			0,057	0,20	290,00	1,04			0,057	0,20					0,06	0,20	

(continuación)

Otros Componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
ácido tióctico	0,56	2,73	0,14	0,69	716,00	3,48			0,14	0,69		
D-glucosa (Dextrosa)	16039	89107	11042	61350	15000	83,33	4500	25000	11042	61345		
PVA	2560		2520		2560		2400		2520	0,00		
Nucellina	54,00		14,00		50,00		10,00		14,00	0,00		
Piruvato Sódico	54,85	498,63	54,85	500	55,00	0,50	110,0	1000	54,85	498,63		

En ciertas realizaciones, las células se suplementan una o más veces después de que haya comenzado el cultivo inicial con uno o más medios de alimentación. Los medios de alimentación ejemplares se enumeran en la Tabla 2, aunque la presente divulgación no se limita a la utilización de estos medios de alimentación. Como entenderá un experto habituado en la técnica, se pueden utilizar otros medios de alimentación para cultivar células y/o se pueden hacer ciertas alteraciones en las composiciones de los medios de alimentación ejemplares enumerados en la Tabla 2. Por ejemplo, se pueden aumentar o disminuir las concentraciones de uno o más componentes de tales medios de alimentación para conseguir la concentración deseada de tales componentes. En ciertas realizaciones, la concentración de cada componente del medio de alimentación se aumenta o disminuye por el mismo factor. Por ejemplo, la concentración de cada componente del medio de alimentación se puede aumentar o disminuir por 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 11x, 12x, 13x, 14x, 15x, 16x, 17x, 18x, 19x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x, 50x o más.

Tabla 2. Medios de alimentación ejemplares.

	Medio F		Medio G		Medio H		Medio I		Medio J	
	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
<b>Aminoácidos</b>										
alanina	17,81	0,20	213,72	2,40	214	2,40	142,47	1,60	142,48	1,60
arginina	191,07	1,10	2292	13,20	2293	13,18	1528	8,79	1528	8,79
Asparagina -H <sub>2</sub> O	270,05	1,80	3240	21,60	7500	50,00	1080	7,20	1080	7,20
ácido aspártico	66,66	0,50	799,92	6,00	800	6,01	532,40	4,00	532,40	4,00
Cisteína HClH <sub>2</sub> O	0,00	0,00	0,00	0,00	566	1,87			473,00	1,51
Cisteína -2HCl	48,83	0,16	585,96	1,92	354	2,41	470	1,50	235,38	1,60
ácido glutámico	29,47	0,20	353,64	2,40	214	2,40	235,38	1,60	142,48	1,60
glutamato monosódico										
glutamina	456,25	3,13	5475	37,56			6000	41,10	4820	33,01
glicina	15,01	0,20	180,12	2,40	180	2,40	120,07	1,60	120,07	1,60
Histidina -HClH <sub>2</sub> O	73,53	0,35	862,36	4,20	862	4,20	588,33	2,80	588,32	2,80
isoleucina	118,05	0,90	1415	10,80	1417	10,81	944,52	7,21	944,52	7,21
leucina	170,07	1,30	2040	15,60	2041	15,58	1360	10,39	1360	10,39
Lisina -HCl	182,07	1,00	2184	12,00	2185	12,00	1456	8,00	1456	8,00
metionina	59,62	0,40	715,44	4,80	715	4,80	477,06	3,20	477,06	3,20
fenilalanina	82,53	0,50	990,36	6,00	990	6,00	660,36	4,00	660,36	4,00
prolina	69,03	0,60	828,36	7,20	828	7,20	552,31	4,80	552,31	4,80
serina	158,06	1,51	1895	18,12	1897	18,06	1264	12,04	1264	12,04
treonina	95,24	0,80	1142	9,60	1143	9,60	762,02	6,40	762,02	6,40
triptófano	32,61	0,16	391,32	1,92	391	1,92	260,94	1,28	260,94	1,28
Tirosina -2Na-2H <sub>2</sub> O	104,26	0,40	1251	4,80	1251	4,79	832,62	3,19	832,62	3,19
valina	93,64	0,80	1123	9,60	1124	9,60	749,21	6,40	749,21	6,40



(continuación)

Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
biotina	17,81	73,00	4,92	20,16	4,92	20,17	3,28	13,44	3,28	13,44	3,28	0,01	0,01	0,01
pantotenato cálcico	191,07	401,41	54,00	113,52	54	113,49	36,02	75,67	36,02	75,67	36,02	0,08	0,08	0,08
cloruro colina	270,05	1943	214,92	1545	215	1545	143,28	1030	143,28	1030	143,28	1,03	1,03	1,03
ácido fólico	66,66	151,27	63,72	144,60	64	144,57	42,43	96,21	42,43	96,21	42,43	0,10	0,10	0,10
inositol			302,52	1680	303	1680	201,71	1120,	201,71	1120,	201,71	1,12	1,12	1,12
nicotinamida	48,83	400,41	48,00	393,60	48	393,60	32,018	262,44	32,018	262,44	32,02	0,26	0,26	0,26
Pyridoxal -HCl	29,47	145,17			49	238,93								
Piridoxina -HCl	456,25	2215	49,20	238,92	5,4	14,37	32,82	159,32	32,82	159,32	32,82	0,16	0,16	0,16
riboflavina	15,01	39,92	5,40	14,40	303	275,43	3,60	9,57	3,60	9,57	3,60	0,01	0,01	0,01
Tiamina -HCl	73,53	218,19	92,88	275,40	93	12,40	35,22	104,51	35,22	104,51	35,22	0,10	0,10	0,10
vitamina B12	118,05	87,12	16,80	12,36	17	20,17	11,21	8,27	11,21	8,27	11,21	0,01	0,01	0,01
<b>Sales Inorgánicas</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>
CaCl <sub>2</sub>							113,27	1,02						
KCl														
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>							1640	12,06	1640	12,06	1635	12,02		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>					1566	11,35								
NaCl														
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	130,50	0,95	1566,00	11,40										
MgSO <sub>4</sub>														
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	21,50	0,09	258,00	1,08	258	1,05	170	0,690	170	0,690	171,98	0,70		
MgCl <sub>2</sub>														
NaHCO <sub>3</sub>														

(continuación)

Elementos Traza	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
Selenito Sódico	5,00	28,92	60,00	347,04	60,00	347,02	40	231,35	40,00	231,35	40,00	231,35	40,00	231,35
CuSO <sub>4</sub>	0,43	2,69	5,16	32,28	5,16	32,26	3,44	21,51	3,44	21,51	3,44	21,51	3,44	21,51
Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,54	6,19	18,48	74,28	18,54	74,24	7,49	30,00	7,49	30,00	7,49	30,00	7,49	30,00
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	571,64	2056	6859	24675	6859	24675	2534	9115	2534	9115	2534	9115	2534	9115
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	408,08	1421	4896	17062	4897	17062	2704	9421	2704	9421	2704	9421	2704	9421
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,10	0,57	1,20	6,84	1,15	6,79	0,17	1,01	0,17	1,01	0,17	1,01	0,17	1,01
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	78,75	277,22	945,00	3326	945,00	3326	140	492,84	140	492,84	140	492,84	140	492,84
(NH <sub>4</sub> ) <sub>8</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,70	0,56	8,40	6,72	8,37	6,77	1,24	1,00	1,24	1,00	1,24	1,00	1,24	1,00
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,37	3,13	4,44	37,56	4,39	37,50	0,65	5,56	0,65	5,56	0,65	5,56	0,65	5,56
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,07	0,28	0,84	3,36	0,88	3,34	0,13	0,49	0,13	0,49	0,13	0,49	0,13	0,49
SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,07	0,30	0,84	3,60	0,81	3,59	0,12	0,53	0,12	0,53	0,12	0,53	0,12	0,53
AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O							1,2	4,97	1,2	4,97	1,20	4,97	1,20	4,97
AgNO <sub>3</sub>							0,17	1,00	0,17	1,00	0,17	1,00	0,17	1,00
Ba(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>							2,55	9,98	2,55	9,98	2,55	9,98	2,55	9,98
KBr							0,12	1,01	0,12	1,01	0,12	1,01	0,12	1,01
CdCl <sub>2</sub> ·2,5H <sub>2</sub> O							2,28	9,99	2,28	9,99	2,28	9,99	2,28	9,99
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O							2,38	10,00	2,38	10,00	2,38	10,00	2,38	10,00
CrCl <sub>3</sub>							0,32	2,02	0,32	2,02	0,32	2,02	0,32	2,02
NaF							4,2	100,02	4,20	100,02	4,20	100,02	4,20	100,02
GeO <sub>2</sub>							0,53	5,07	0,53	5,07	0,53	5,07	0,53	5,07
KI							0,17	1,02	0,17	1,02	0,17	1,02	0,17	1,02
RbCl							1,21	10,01	1,21	10,01	1,21	10,01	1,21	10,01
ZrOCl <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O							3,22	9,99	3,22	9,99	3,22	9,99	3,22	9,99

(continuación)

Otros Componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Hydrocortisona	0,04	0,10	0,48	1,20	0,432	1,19	0,288	0,794	0,288	0,794	0,288	0,79
Putrescina -2HCl	1,00	6,21	12,00	74,52	12	74,49	8	49,66	8	49,66	8	49,66
ácido linoleico	0,04	0,15	0,48	1,80	0,505	1,80	0,336	1,20	0,336	1,20	0,336	1,20
ácido fólico	0,11	0,51	1,32	6,12	1,26	6,13	0,841	4,08	0,841	4,08	0,841	4,08
D-glucosa (Dextrosa)	4194,14	23300	50329	279609	50330	279609	43005	23892,2	33005	23892,2	33005	183,37
PVA	200,00		2400				2400		2400		2400	
Nucellina	10,00		120,00				80		80		80,00	
Piruvato Sódico												

**Ejemplo 2: Efectos de la adición de cobre y glutamato a los medios de cultivo definidos**

**Introducción:** Un desafío en la expresión de proteínas o polipéptidos en un cultivo celular es la minimización de versiones mal plegadas o agregadas de la proteína o polipéptido que se expresa. Se han propuesto varias soluciones a este problema, que incluyen disminución del pH y/o la temperatura del cultivo celular, así como la adición de agentes de inducción tales como HMBA.

Para determinar si el ambiente redox del cultivo celular tiene un papel en la acumulación de polipéptidos mal plegados y agregados, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Para conseguir un ambiente más oxidado, se añadieron cobre y glutamato a los medios de cultivo, basándose en sus mecanismos intracelulares conocidos que tienen influencia sobre los estados redox. El cobre cataliza la oxidación extracelular de la cisteína (la forma reducida) a cistina (la forma oxidada). Se propuso la hipótesis de que añadiendo cobre a un medio de cultivo celular se facilitaría la acumulación de cistina, creando un entorno más oxidado. El glutamato había demostrado que interfería con la capacidad de las células para captar cistina, y reducirla a cisteína. Se pensó que utilizando el glutamato para bloquear la capacidad de las células para captar cistina y posteriormente convertirla en cisteína, resultaría un medio más oxidado.

**Materiales y Procedimientos:** Para todos los experimentos siguientes, se cultivó TNFR-Ig en biorreactores de producción de 1 l, seguido por procedimientos de perfusión de referencia. Cada cultivo celular de un grupo particular de experimentos (como se indica en las Tablas 3, 4, y 5) se sembró a partir de la misma fuente de inóculo. Los puntos fijados de pH y las temperaturas se modificaron ligeramente entre los experimentos, cuyos detalles se indican en las Tablas 3, 4 y 5. Se administró el cobre y el glutamato al cultivo celular inicial el Día 0 del proceso de producción. Los agentes de inducción HMBA y NaB se añadieron a los cultivos celulares en los tiempos indicados en las Tablas 3, 4, y 5.

Cada cultivo celular se cultivó inicialmente a una primera temperatura y luego se cambió a una temperatura más baja el día 1. Al final de cada experimento, los medios acondicionados libres de células se almacenaron a -80 °C. Las preparaciones de proteína se llevaron a cabo sobre el material descongelado siguiendo los protocolos de referencia. Los análisis de la calidad del cultivo se llevaron a cabo utilizando el eluido retenido en la columna de cada una de las condiciones de cultivo celular ensayadas.

**Tabla 3. Experimento 1: Evaluación de la adición de cobre o glutamato a los medios de cultivo celular de crecimiento.**

	Cobre (30 °C, pH 6,95)	Glutamato (30 °C, pH 6,95)	Control (30 °C, pH 6,95)
Ajuste de Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C
Ajuste de pH	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02
Ajuste de DO	60	60	60
Cobre	<b>1 µM</b>	-	-
Glutamato	-	<b>5 mM</b>	-
Tasa de alimentación	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8
Agentes de Inducción	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA
Día de Inducción	D1	D1	D1
Agentes de Inducción	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB
Día de Induction	D1	D1	D1
2ª Temperatura	30 °C	30 °C	30 °C
Día de cambio de Temperatura	D1	D1	D1

**Tabla 4. Experimento 2: Evaluación de la adición de cobre, glutamato o ambos a los medios de cultivo celular de crecimiento.**

	Glutamato (30 °C, pH 6,95)	Cobre(30 °C, pH 6,95)	Combo (30 °C, pH 6,95)	Control (30 °C, pH 6,95)	Cobre (29,5 °C, pH 6,85)	Control (29,5 °C, pH 6,85)
Ajuste de Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Ajuste de pH	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,85 +/- 0,02	6,85 +/- 0,02
	Glutamato (30 °C, pH 6,95)	Cobre(30 °C, pH 6,95)	Combo (30 °C, pH 6,95)	Control (30 °C, pH 6,95)	Cobre (29,5 °C, pH 6,85)	Control (29,5 °C, pH 6,85)
Ajuste de DO	60	60	60	60	60	60
Cobre	-	<b>1 µM</b>	<b>1 µM</b>	-	<b>1 µM</b>	-
Glutamato	<b>5 mM</b>	-	<b>5 mM</b>	-	-	-
Tasa de alimentación	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8	5% los días 3, 6, y 8
Agentes de Inducción	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA
Día de Inducción	D1	D1	D1	D1	D1	D1
Agentes de Inducción	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB
Día de Inducción	D1	D1	D1	D1	D1	D1
2ª Temperatura	30 °C	30 °C	30 °C	30 °C	29,5 °C	29,5 °C
Día de cambio de temperatura	D1	D1	D1	D1	D1	D1

**Tabla 5. Experimento 3: Evaluación de adición de cobre, glutamato o ambos a los medios de cultivo celular de crecimiento**

5

	Combo, extra Cu (29,5 °C, pH 6,95)	Combo, Glu bajo (29,5 °C, pH 6,95)	Combo (29,5 °C, pH 6,95)	Combo, extra HMBA (29,5 °C, pH 6,95)	Control (29,5 °C, pH 6,95)	Control (sin cambio de temp.)	Combo (sin cambio de temp.)
Ajuste de Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	29,5 °C	29,5 °C
Ajuste de pH	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,95 +/- 0,02	6,85 +/- 0,02	6,85 +/- 0,02	6,85 +/- 0,02
Ajuste de DO	60	60	60	60	60	60	60

(continuación)

	Combo, extra Cu (29,5 °C, pH 6,95)	Combo, Glu bajo (29,5 °C, pH 6,95)	Combo (29,5 °C, pH 6,95)	Combo, extra HMBA (29,5 °C, pH 6,95)	Control (29,5 °C, pH 6,95)	Control (sin cambio de temp.)	Combo (sin cambio de temp.)
Cobre	1,5 µM	1 µM	1 µM	1 µM			1 µM
Glutamato	5 mM	2,5 mM	5 mM	5 mM			5 mM
Tasa de alimentación	5% los días 3, 6, 8 y 10	5% los días 3, 6, 8 y 10	5% los días 3, 6, 8 y 10	5% los días 3, 6, 8 y 10	5% los días 3, 6, 8 y 10	5% los días 3, 6, 8 y 10	5% los días 3, 6, 8 y 10
Agentes de Inducción	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA	4 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA	3 mM HMBA
Día de Inducción	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1
Agentes de Inducción	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB	1 mM NaB
Día de Inducción	D1	D1	D1	D1	D1	D3	D3
2ª Temperatura	29,5 °C	29,5 °C	29,5 °C	29,5 °C	29,5 °C	-	-
Día de cambio de temperatura	D1	D1	D1	D1	D1	-	-

**Resultados:** Las Figuras 1-5 y 11-15 presentan los resultados de los experimentos descritos en las Tablas 3, 4 y 5, respectivamente. Las Figuras 1, 6 y 11 muestran la densidad celular viable integrada (IVCD) para cada uno de los cultivos celulares ensayados en cada uno de los tres experimentos. Las Figuras 2, 7 y 12 muestran la productividad específica acumulada (Qp) para cada uno de los cultivos celulares ensayados en cada uno de los tres experimentos. Las Figuras 3, 8 y 13 muestran los niveles de glutamato de cada uno de los cultivos celulares ensayados en cada uno de los tres experimentos. Las Figuras 4, 9 y 14 muestran los niveles de lactato para cada uno de los cultivos celulares ensayados en cada uno de los tres experimentos. Las Figuras 5, 10 y 15 muestran la proporción de mal plegamiento de TNFR-Ig el Día 10 del cultivo celular como un porcentaje del total de TNFR-Ig que se produce, así como el título el Día 10 para cada uno de los cultivos celulares ensayados en cada uno de los tres experimentos. La Tabla 6 es una recopilación de los resultados de calidad (porcentaje de TNFR-Ig mal plegada/agregada) para cada uno de los cultivos celulares descritos en las Tablas 3, 4 y 5. Adicionalmente, la Tabla 6 muestra la sialilación total de la TNFR-Ig expresada como porcentaje de la sialilación total de una muestra de TNFR-Ig de referencia.

15 **Tabla 6. Tabla sumario de los resultados de calidad de los polipéptidos para los experimentos descritos en las Tablas 3, 4 y 5.**

Experimento	Condición	Día	% Mal plegado/Agregado	Sialilación (% de la referencia)
1	Control (30 °C, pH 6,95)	10	25,42	91,51
	Cobre (30 °C, pH 6,95)	10	15,16	144,1
	Glutamato (30 °C, pH 6,95)	10	16,55	101,05
2	Control (30 °C, pH 6,95)	8	16,58	98,50
		10	19,27	92,95
	Cobre (30 °C, pH 6,95)	8	15,26	72,75
		10	16,84	87,54

ES 2 541 454 T3

(continuación)

Experimento	Condición	Día	% Mal plegado/Agregado	Sialilación (% de la referencia)	
	Glutamato (30 °C, pH 6,95)	8	15,71	69,24	
		10	17,12	80,78	
	Combo (30 °C, pH 6,95)	8	14,24	71,88	
		10	14,83	84,00	
	Control (29,5 °C, pH 6,85)	8	13,94	88,26	
		10	13,79	82,41	
	Cobre (29,5 °C, pH 6,85)	8	13,43	68,45	
		10	12,93	74,26	
	<b>3</b>	Control (29,5 °C, pH 6,95)	8	12,29	113,02
			10	13,7	107,43
			12	15,46	97,60
		Combo (29,5 °C, pH 6,95)	8	11,76	115,35
	10		11,77	117,38	
	12		12,13	124,55	
	Combo, extra HMBA (29,5 °C, pH 6,95)	8	11,85	117,46	
		10	11,92	122,81	
		12	13,13	123,57	
	Combo, extra Cu (29,5 °C, pH 6,95)	8	11,74	119,44	
		10	11,35	108,53	
		12	11,96	115,05	
	Combo, glu bajo (29,5 °C, pH 6,95)	8	12,2	117,06	
		10	12,6	113,99	
		12	12,54	116,77	
	Control (sin cambio de temperatura)	8	10,38	126,90	
		10	12,67	111,32	
		12	15,64	97,91	
	Combo (sin cambio de temperatura)	8	8,97	110,22	
		10	10,76	110,58	
		12	13,15	116,94	

Las Figuras 16 y 17 muestran los porcentajes de TNFR-Ig mal plegada/agregada los días 8 y 10 para cada uno de los cultivos celulares ensayados por los experimentos descritos en las Tablas 4 y 5, respectivamente. Las Figuras 18 y 19 muestran la sialilación total de la TNFR-Ig expresada los Días 8, 10 y 12 como un porcentaje de la sialilación total de una muestra de referencia de TNFR-Ig por los experimentos descritos en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

5 **Actuación del cultivo celular:** La adición de cobre, glutamato o una combinación de los dos no impactó significativamente la actuación del cultivo cuando se comparaba con la condición de control en cada experimento. La densidad celular acumulada no se afectó negativamente por las adiciones, como se muestra en las Figuras 1, 6, y 11. Como se aprecia en las Figuras 2, 7 y 12, un efecto uniforme entre todas las adiciones era una ligera reducción de la productividad específica comparada con el control, una diferente observada constantemente en los tres experimentos. Bajo la mayoría de las condiciones, los títulos de recolección eran ligeramente inferiores que el el proceso de control, como se esperaba debido a las pequeñas diferencias en las tasas de productividad específica.

10 Se midió la acumulación de glutamato durante el curso de cada proceso de producción. Como se aprecia en las Figuras 3, 8 y 13, las condiciones en las que el glutamato se administraba por adelantado (condiciones de glutamato solo y en combinación) tenían una tasa de producción total de glutamato más baja. Aunque la tasa de producción específica era más baja, un efecto uniforme entre estas adiciones que contenían glutamato era que la concentración de glutamato final era constantemente aproximadamente 1,5 mM mayor que el control. Las condiciones en las que se administraba solo cobre eran idénticas a la condición de control en términos del perfil de producción de glutamato (véase las Figuras 3, 8 y 13). Esto sugiere que la adición de cobre solo no tiene impacto en el mecanismo normal de acumulación de glutamato.

15 Se observaba un descenso en el consumo de lactato en todas las condiciones en las que se añadían cobre, glutamato o una combinación de los dos (véase las Figuras 4, 9 y 14). Por lo tanto, estas condiciones se recolectaron con una acumulación más alta de lactato en comparación con el control. Sin el deseo de quedar ligados a teoría particular, los inventores proponen que la tendencia inversa observada entre la adición de cobre y/o glutamato y el consumo de lactato puede ser indicativo de una relación entre los estados redox y las tasas de consumo celular de lactato.

20 **Efectos de la calidad del producto:** El objetivo final de estos experimentos era evaluar el impacto sobre la calidad del polipéptido producido cuando se añadía cobre, glutamato o una combinación de los dos a un cultivo celular. Específicamente, estos experimentos se realizaron para determinar si la adición de cobre, glutamato o ambos podían disminuir la cantidad total de mal plegamiento y/o agregación del polipéptido producido sin afectar negativamente la actuación del cultivo celular. Como se puede ver en la Tabla 6, la adición de cobre, glutamato o la combinación de los dos de hecho mejoraba la calidad del polipéptido producido. En los tres experimentos, la cantidad total de polipéptido mal plegado y/o agregado era menor en las condiciones que contenían cobre y/o glutamato.

25 Resulta interesante que los datos en el curso de tiempo de las condiciones de cultivo de los Experimentos 2 y 3 indicaban que la cantidad total de polipéptido mal plegado y/o agregado se estabilizaba a lo largo del tiempo en las condiciones que contenían cobre y/o glutamato (véase las Figuras 16 y 17, respectivamente, y la Tabla 6). Las condiciones de control mostraban un claro aumento de niveles de polipéptido mal plegado y/o agregado a lo largo del tiempo. Este efecto no se observaba en el proceso modificado "sin cambio de temperatura" (véase la Figura 17, Exp3a Control vs. Exp3a Combo), que indicaba que bajo ciertas condiciones experimentales, un cambio de temperatura es útil para el descenso de polipéptido mal plegado y/o agregado. En total, se demostró en los tres experimentos que la cantidad total de polipéptido mal plegado y/o agregado era menor en un día determinado de recolección (8, 10, o 12) para las condiciones con cobre y/o glutamato en comparación con el proceso de control. De todas las condiciones investigadas, la combinación de glutamato y cobre reducía constantemente la cantidad de polipéptido mal plegado y/o agregado en la recolección.

30 Un resultado inesperado pero prometedor era el efecto de estas varias adiciones sobre la sialilación total. Como se aprecia en la Tabla 6, los resultados del Experimento 1 indicaban que tanto las condiciones de cobre y glutamato tenían una sialilación total mayor que la condición de control. Además, los datos en el curso del tiempo de los experimentos descritos en las Tablas 4 y 5 indicaban una estabilización o un ligero aumento en la sialilación total durante el tiempo en las condiciones que contenían cobre y/o glutamato (véase las Figuras 18 y 19). Las condiciones de control en los experimentos mostraban una disminución en la sialilación total con el tiempo. Adicionalmente, el aumento de la sialilación total se observaba en la condición de cultivo a pH bajo (véase la Tabla 6 y la Figura 18) así como en la condición de cultivo sin cambio de temperatura (véase la Tabla 6 y la Figura 19) sugiriendo que el mecanismo puede ser independiente de la estrategia de procesar el pH y la temperatura.

35 La descripción anterior se tiene que entender como representativa solamente y no pretende ser limitante. Los procedimientos alternativos y materiales para la realización de la invención y también las aplicaciones adicionales serán aparentes para el experto en la técnica, y se pretende que se incluyan en el alcance de las siguientes reivindicaciones.



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un polipéptido en un cultivo celular que comprende las etapas de:
  - 5 cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés en un medio de cultivo celular que comprende entre 0,5 y 5  $\mu\text{M}$  de cobre y entre 1,7 y 33 mM de glutamato;
  - mantener el cultivo en un primer intervalo de temperaturas durante un primer periodo de tiempo suficiente para permitir que las células se reproduzcan hasta una densidad celular viable en el intervalo de un 20%-80% de la máxima densidad celular viable posible si el cultivo se mantuviera en el primer intervalo de temperaturas;
  - 10 cambiar el cultivo a un segundo intervalo de temperaturas, en que al menos una temperatura del segundo intervalo de temperaturas es más baja que la temperatura más baja del primer intervalo de temperaturas;
  - mantener el cultivo durante un segundo periodo de tiempo bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la expresión del polipéptido, en el que la fracción de polipéptido mal plegado y/o agregado, con respecto al total de polipéptido producido, está disminuido en comparación con la fracción de polipéptido mal plegado y/o agregado que se observaría bajo condiciones del medio de otra manera idénticas que carezcan de cobre y glutamato;
  - 15 en que el polipéptido es TNFR-Ig.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer intervalo de temperaturas comprende un intervalo de temperaturas que es de 30 a 42 grados Celsius.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo intervalo de temperaturas comprende un intervalo de temperaturas que es de 25 a 41 grados Celsius.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, que incluye una segunda etapa de cambio posterior a dicha primera etapa de cambio que comprende el cambio de dicho cultivo a una tercera temperatura o tercer intervalo de temperaturas, en el que al menos una temperatura del tercer intervalo de temperaturas es más baja que la temperatura más baja del segundo intervalo de temperaturas.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el tercer intervalo de temperaturas comprende un intervalo de temperaturas que es 25 a 40 grados Celsius.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración inicial de glutamina del medio de cultivo celular es menor o igual a 4 mM.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular es suplementado además con 2 gramos por litro de glucosa.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular es suplementado además con componentes suplementarios.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que los componentes suplementarios son proporcionados en un medio de alimentación.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los componentes suplementarios son proporcionados en múltiples intervalos.
- 35 11. El procedimiento de una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo celular es definido.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el medio de cultivo celular definido no contiene suero ni hidrolizados añadidos.
- 40 13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el medio de cultivo celular definido está libre de proteínas.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo celular comprende entre 0,7 y 1,5  $\mu\text{M}$  de cobre.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el medio de cultivo celular comprende 1  $\mu\text{M}$  de cobre.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de cultivo celular comprende entre 3 y 7 mM de glutamato.
- 45 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el medio de cultivo celular comprende 5 mM de glutamato.
18. Un procedimiento de producción de un polipéptido en un cultivo celular que comprende las etapas de:
  - cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés en un medio de cultivo

5 celular que comprende entre 0,5 y 5  $\mu\text{M}$  de cobre y entre 1,7 y 33 mM de glutamato;  
 mantener el cultivo en un primer intervalo de temperaturas durante un primer periodo de tiempo suficiente para  
 permitir que las células se reproduzcan hasta una densidad celular viable en un intervalo del 20%-80% de la  
 máxima densidad celular viable posible si el cultivo se mantuviera en el primer intervalo de temperaturas;  
 10 cambiar el cultivo a un segundo intervalo de temperaturas, en el que al menos una temperatura del segundo  
 intervalo de temperaturas es más baja que la temperatura más baja del primer intervalo de temperaturas;  
 mantener el cultivo durante un segundo periodo de tiempo bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para  
 permitir la expresión del polipéptido, en el que el patrón de glucosilación del polipéptido expresado está  
 aumentado con respecto al patrón de glucosilación que se observaría bajo condiciones del medio de otra manera  
 idénticas que carezca de cobre y glutamato;

en que el polipéptido es TNFR-Ig.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el aumento del patrón de glucosilación del polipéptido expresado comprende un aumento de la sialilación total.
20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el medio de cultivo celular es definido.
- 15 21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el medio de cultivo celular definido no contiene suero ni hidrolizados añadidos.
22. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el medio de cultivo celular definido está libre de proteínas.
23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en el que el medio de cultivo celular comprende entre 0,7 y 1,5  $\mu\text{M}$  de cobre.
- 20 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que el medio de cultivo celular comprende 1  $\mu\text{M}$  de cobre.
25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en el que el medio de cultivo celular comprende entre 3 y 7 mM de glutamato.
26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el medio de cultivo celular comprende 5 mM de glutamato.
27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en el que el polipéptido es TNFR-Fc.
- 25 28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, el que la etapa de cultivo comprende el cultivo de células de mamífero en un cultivo discontinuo.
29. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que el polipéptido o proteína están aislados y/o purificados.

Figura 1. Densidad de células viables integrada (IVCD) de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 1.

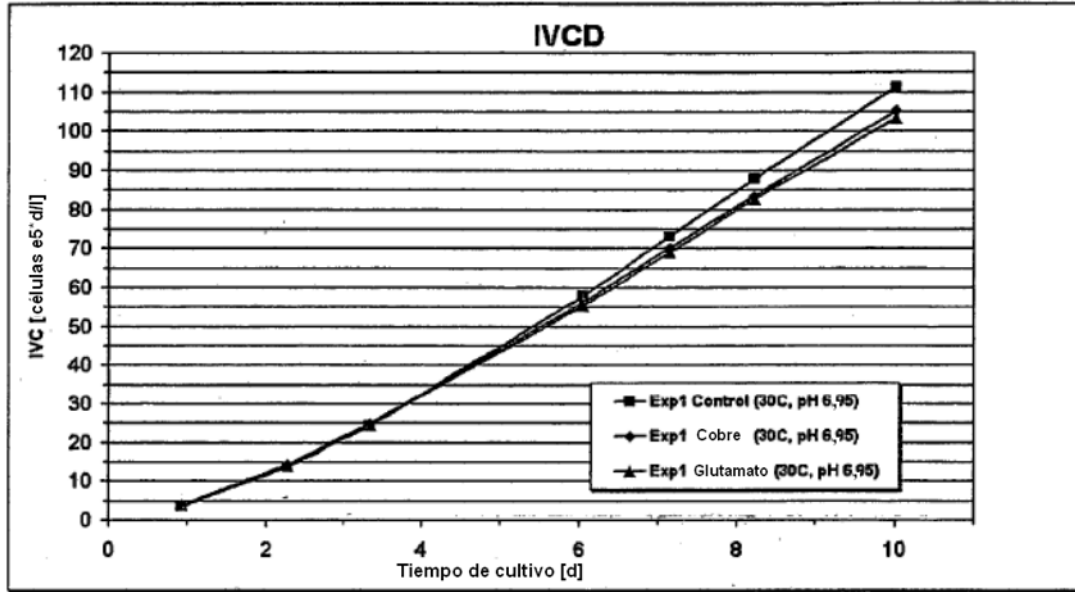


Figura 2. Productividad específica acumulada (Qp) de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 1.

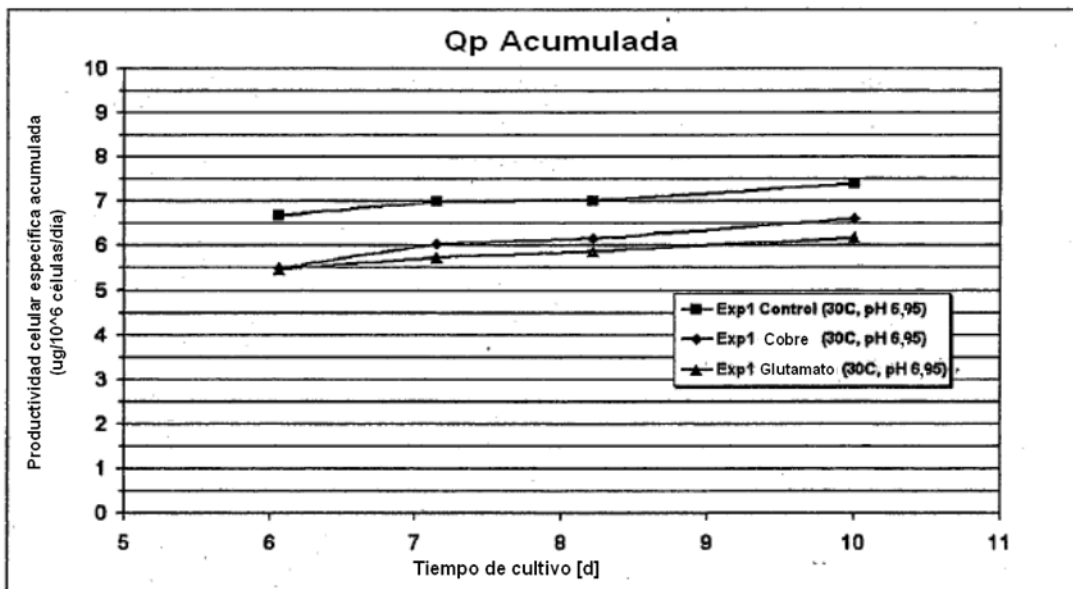


Figura 3. Niveles de glutamato de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones descritas en la Tabla 1.

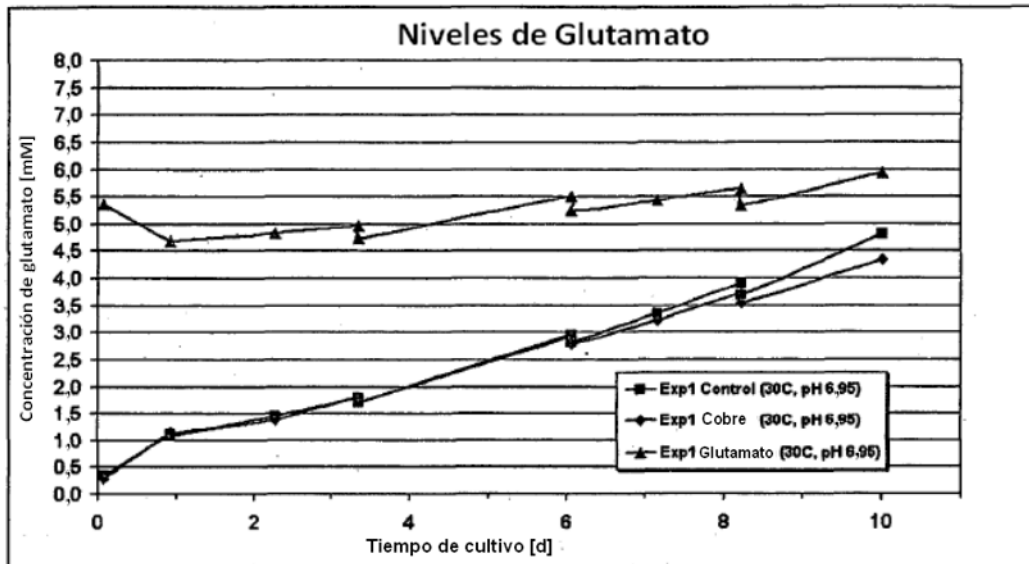


Figura 4. Niveles de lactato de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones descritas en la Tabla 1.

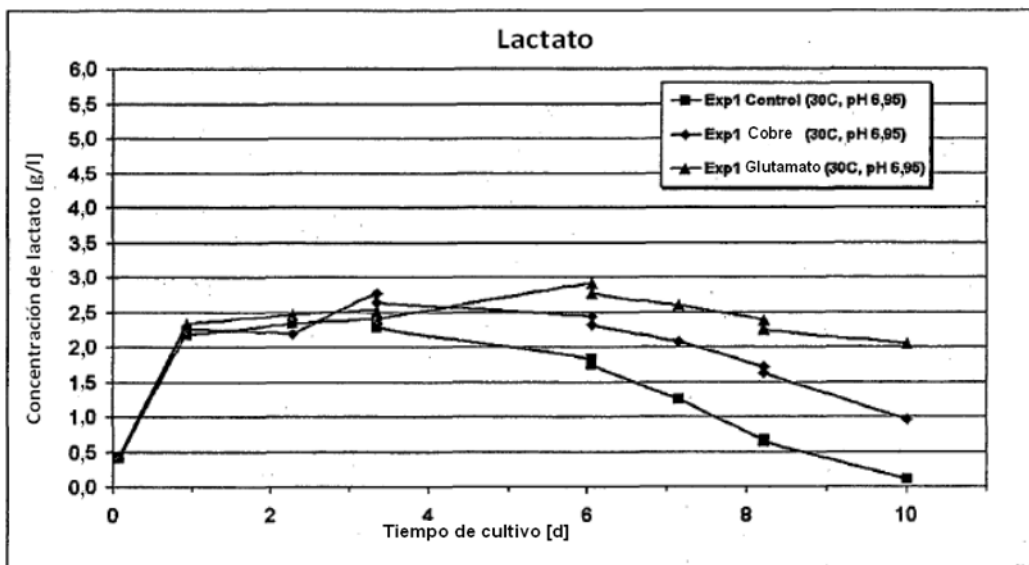


Figura 5. Nivel relativo el día 10 de TNFR-Ig mal plegada y/o agregada producida y el título el día 10 de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 1.

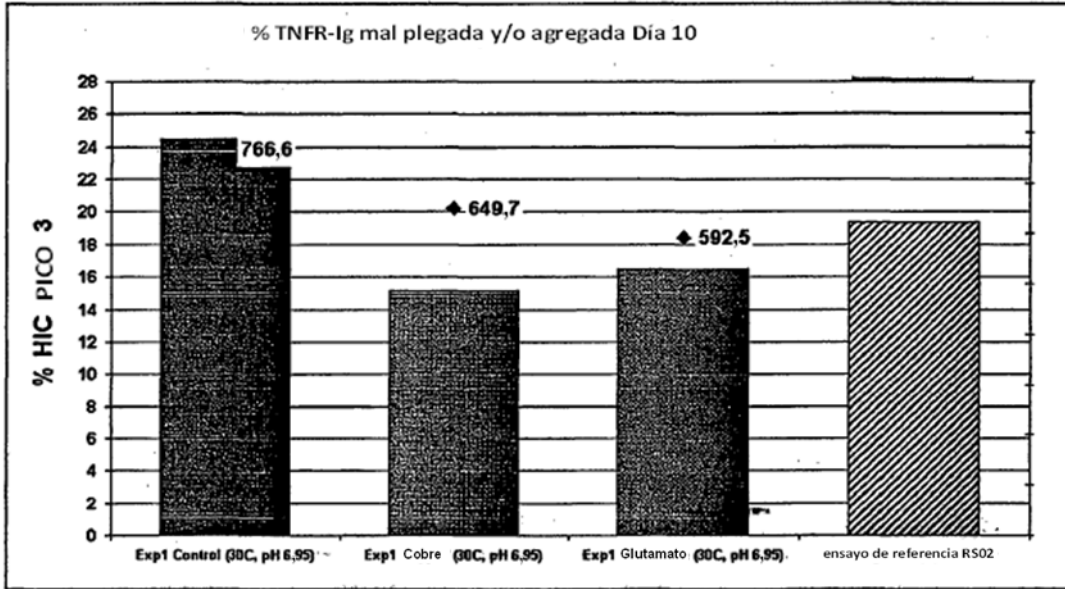


Figura 6. Densidad celular viable integrada (IVCD) de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

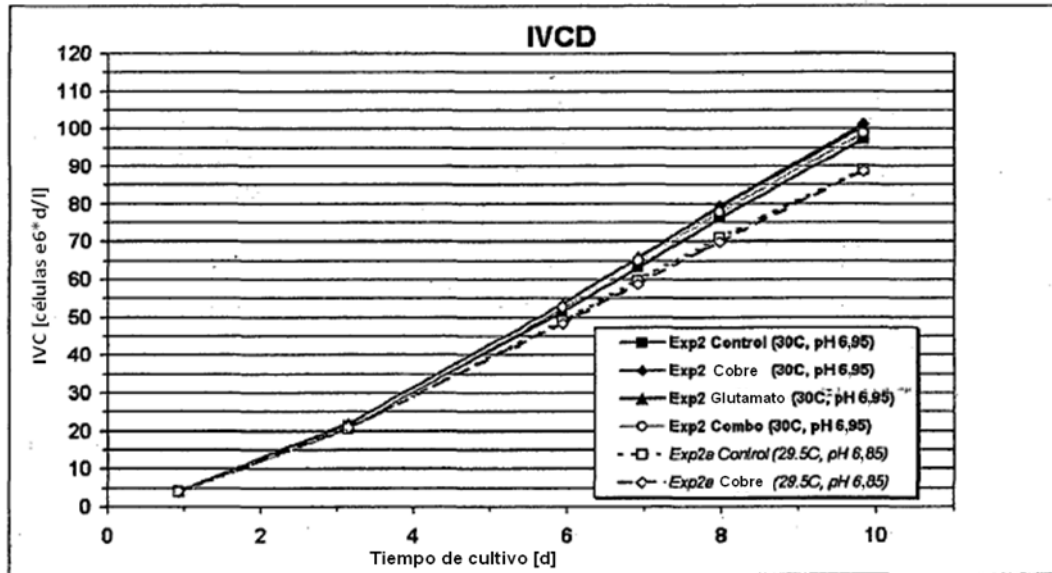


Figura 7. Productividad específica acumulada (Qp) de los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

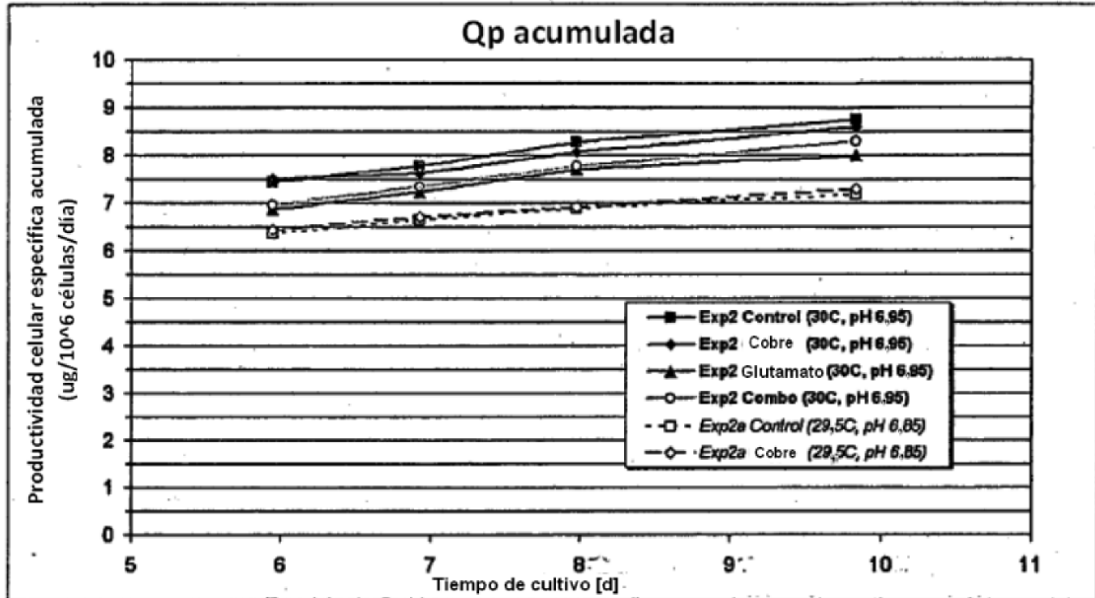


Figura 8. Niveles de glutamato de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

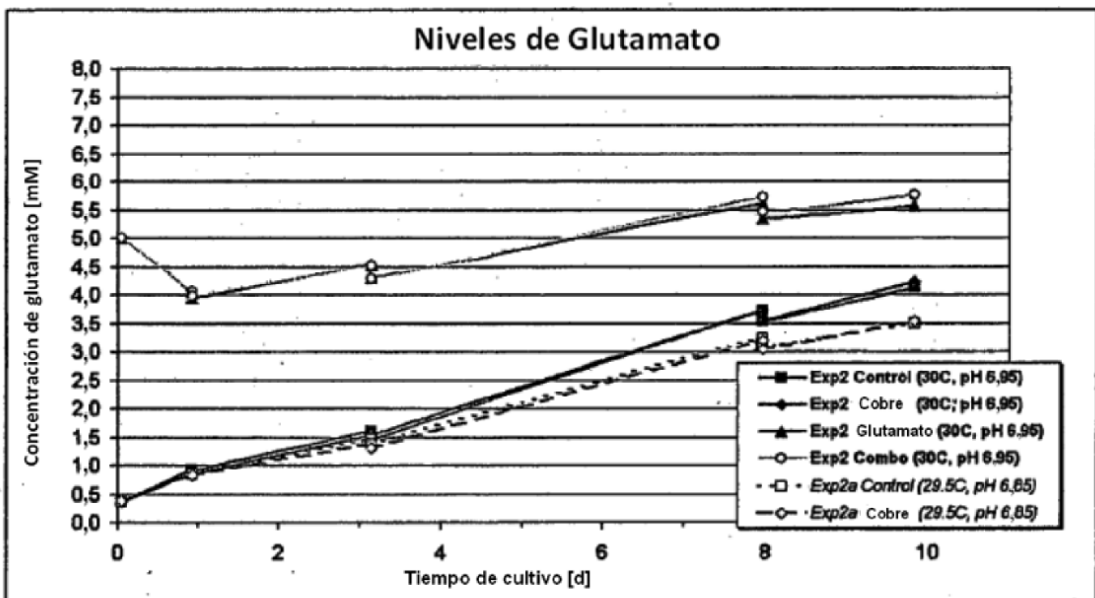


Figura 9. Niveles de lactato de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

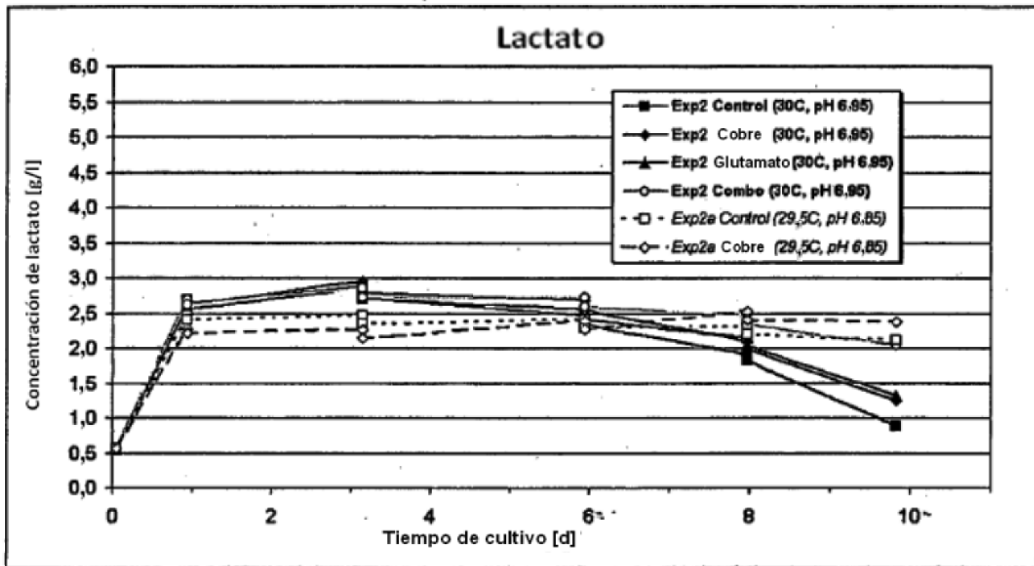


Figura 10. Nivel relativo el Día 10 de TNFR-Ig mal plegada y/o agregada producida y el título del Día 10 de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

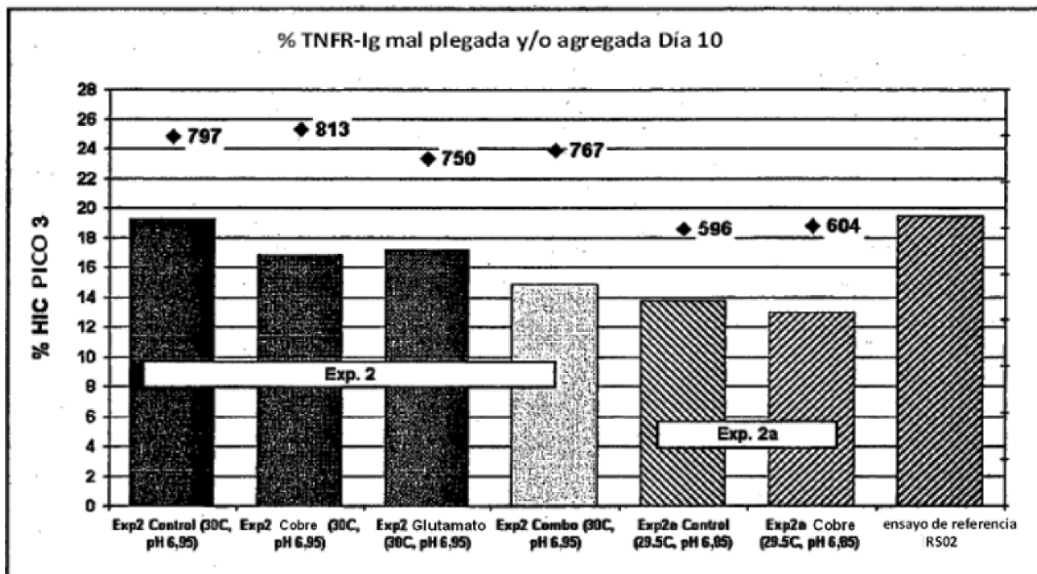


Figura 11. Densidad celular viable integrada (IVCD) de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales de la Tabla 3.

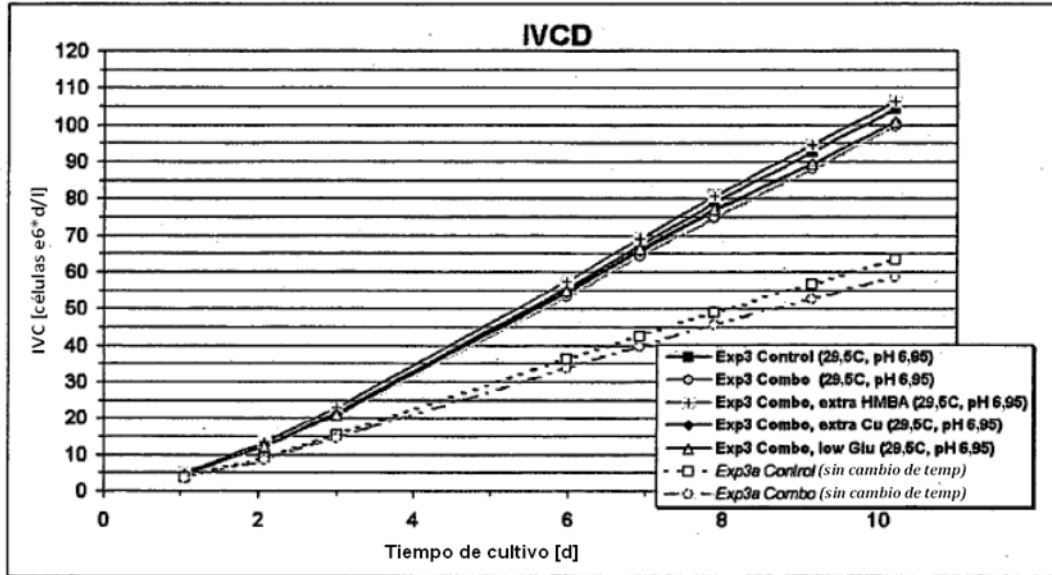


Figure-12. Cumulative specific productivity (Qp) of cell cultures grown under the experimental conditions described in Table 3.

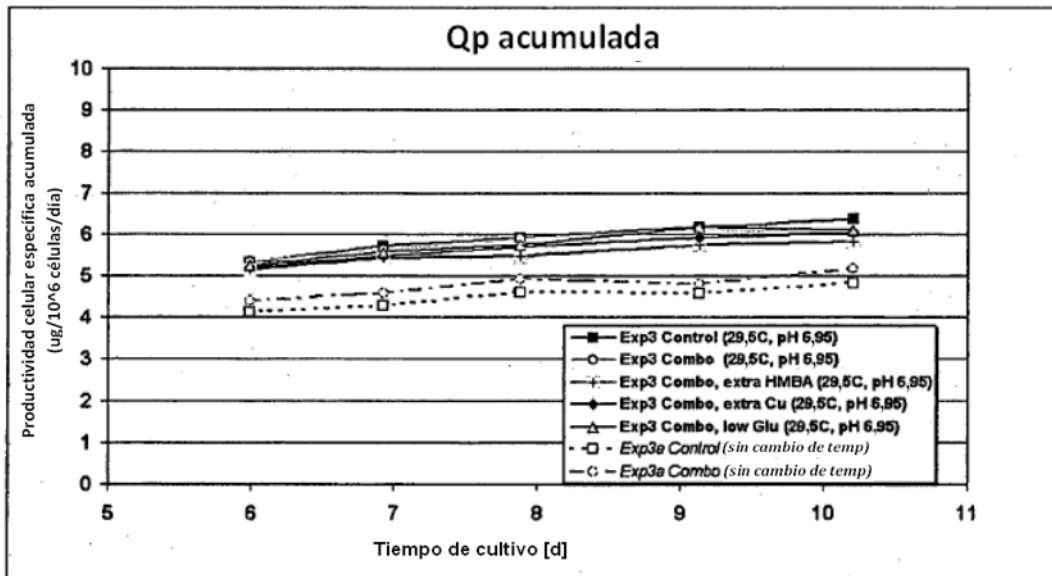




Figura 13. Niveles de glutamato de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

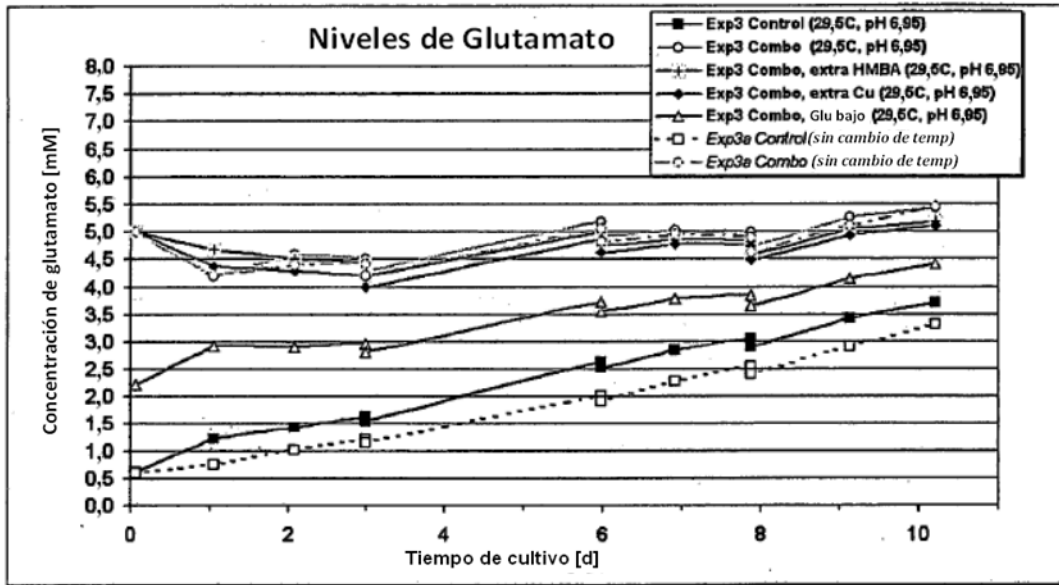


Figura 14. Niveles de lactato de cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

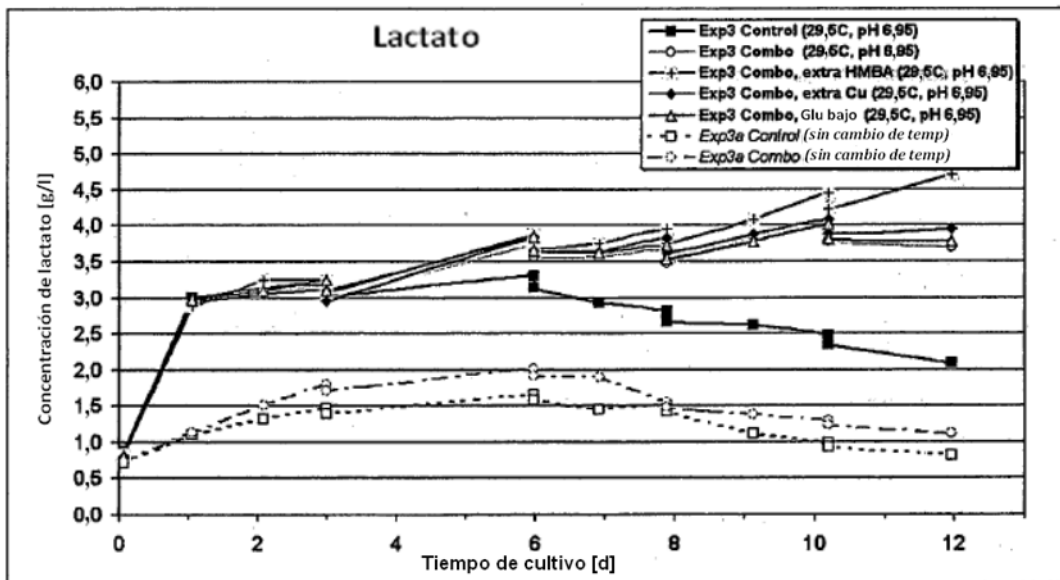


Figura 15. Nivel relativo el Día 10 de TNFR-Ig mal plegada y/o agregada producida y el título del Día 10 de cultivos celulares cultivados bajo condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

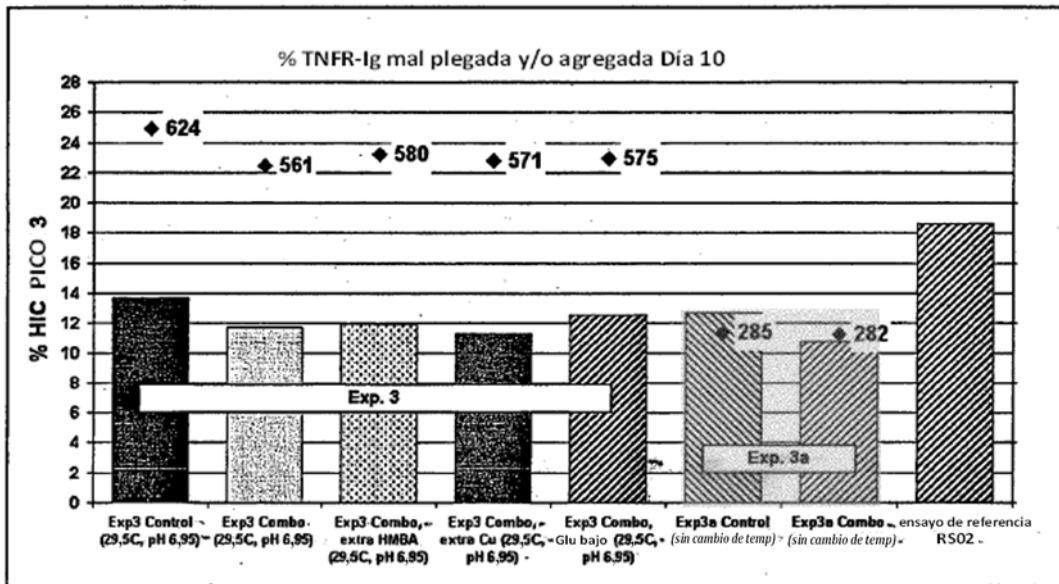


Figura 16. TNFR-Ig mal plegada y/o agregada como porcentaje de una muestra de TNFR-Ig de referencia los días 8 y 10 para los cultivos celulares cultivados bajo condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

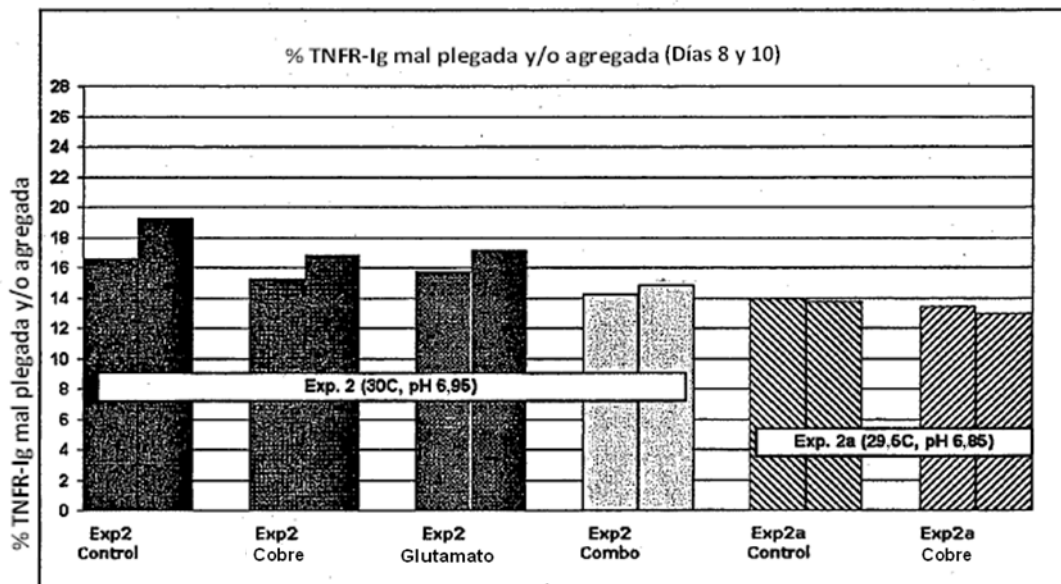


Figura 17. TNFR-Ig mal plegada y/o agregada como un porcentaje de una muestra de TNFR-Ig de referencia los días 8, 10 y 12 para cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

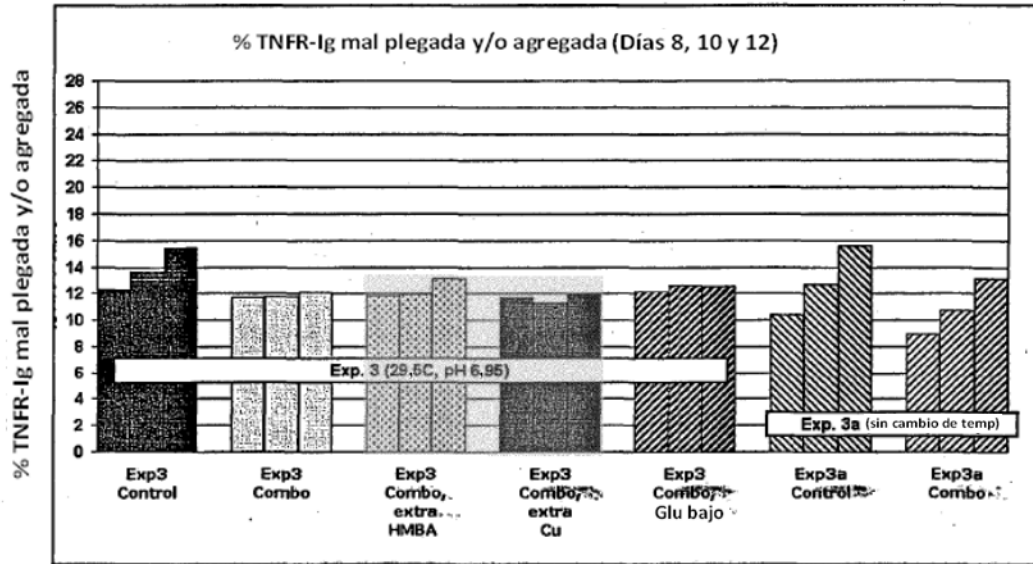


Figura 18. Sialilación de TNFR-Ig expresada como un porcentaje de una muestra TNFR-Ig de referencia los días 8 y 10 para cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

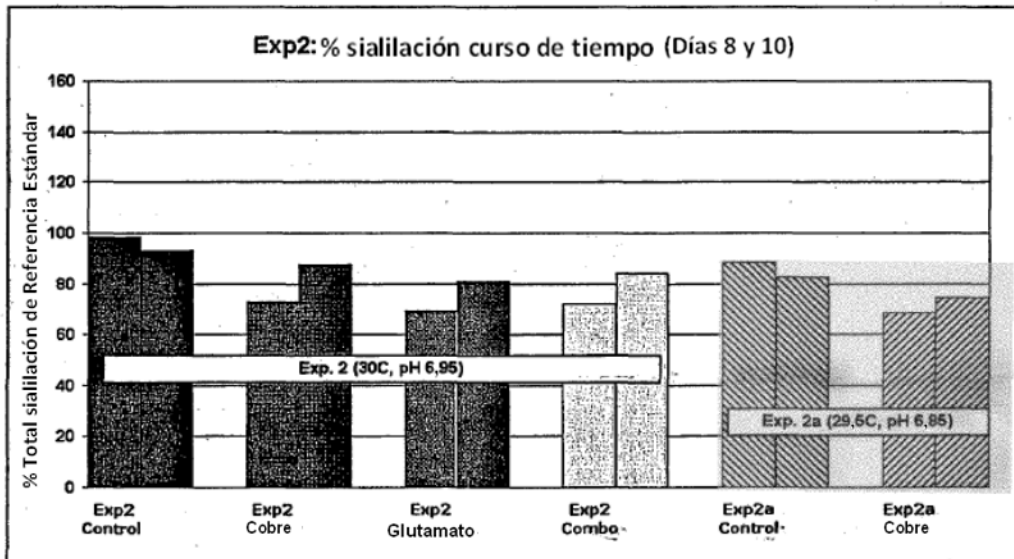


Figura 19. Sialilación de TNFR-Ig expresada como un porcentaje de una muestra de TNFR-Ig de referencia los días 8 y 10 para los cultivos celulares cultivados bajo las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.

