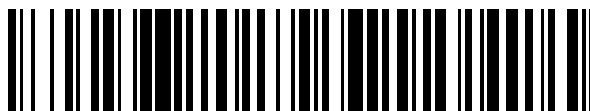


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 546**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007 E 07868651 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2064315**

54 Título: **Sustancias que inhiben la glucólisis en cultivo celular**

30 Prioridad:

03.11.2006 US 856615 P

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

21.07.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, WENGE y
LUAN, YEN-TUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 546 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

Sustancias que inhiben la glucólisis en cultivo celular

Antecedentes de la invención

5 Las proteínas y los polipéptidos se han convertido en agentes terapéuticos y comerciales cada vez más importantes. En la mayoría de los casos, estas proteínas y polipéptidos se producen en cultivo celular, a partir de células que se han diseñado y/o seleccionado para producir niveles inusualmente elevados de la proteína o polipéptido de interés particular. El control y la optimización de las condiciones de cultivo celular son críticamente importantes para el éxito de la producción de proteínas y polipéptidos

10 Muchas proteínas y polipéptidos producidos en cultivo celular son fabricados en un proceso discontinuo o alimentado de forma discontinua, en el que las células se cultivan durante un período de tiempo y después el cultivo se termina y se aísla la proteína o polipéptido producido. Como alternativa, las proteínas o polipéptidos pueden producirse en un proceso de cultivo celular de perfusión en el que el cultivo no se termina y periódicamente se añaden nuevos nutrientes y otros componentes al cultivo y durante el mismo se cosechan periódicamente la proteína o polipéptido expresado. La cantidad y la calidad últimas de la proteína o polipéptido producido pueden verse afectadas espectacularmente por las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, los procesos de cultivo discontinuo o de alimentación discontinua tradicionales a menudo tienen como resultado la producción de productos de desecho metabólicos que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento o la viabilidad celular, y sobre la producción o estabilidad de la proteína o polipéptido de interés. Entre estos productos de desecho perjudiciales está el metabolito lactato de la glucosa. La acumulación de lactato ha mostrado que reduce el pH del cultivo celular y es perjudicial tanto para la viabilidad como para la productividad celular (véase Gorfien y col., Optimized Nutrient Additives for Fed-Batch Cultures, Biopharm. International, Abril 2003). Aunque se han realizado diversos esfuerzos para mejorar la producción de proteínas y polipéptidos en procesos de cultivo celular, sigue habiendo la necesidad de mejoras adicionales.

25 Adicionalmente, se han invertido esfuerzos significativos en el desarrollo de medios definidos (es decir, medios formados por componentes individuales conocidos y que carecen de suero u otros subproductos animales) para su uso en el cultivo de células, particularmente de células de mamíferos. Las características de crecimiento de la célula pueden ser muy diferentes en medios definidos, en contraste con los medios derivados de suero. Existe la necesidad particular del desarrollo de sistemas mejorados para producir proteínas y polipéptidos mediante cultivo celular en medios definidos, en los que la acumulación de productos de desecho perjudiciales se reduce o elimina.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona procedimientos y composiciones mejorados de producción a gran escala de proteínas y/o polipéptidos en cultivo celular. En determinadas realizaciones, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende 2-desoxiglucosa y glucosa, en el que la 2-desoxiglucosa está presente a entre 0,25 gramos por litro y 1 gramo por litro, en el que la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa es igual o inferior a de 1 a 9, y, en el que el medio está definido. En determinadas realizaciones, se proporciona un medio de cultivo celular que contiene una sustancia inhibidora de la glucólisis, en el que la glutamina está presente a una concentración que es menor que aproximadamente 13 mM. En determinadas realizaciones se proporciona un medio de cultivo celular que contiene una sustancia inhibidora de la glucólisis, en el que la glutamina está presente a una concentración que es menor que aproximadamente 4 mM. En determinadas realizaciones, los medios de cultivo celular de la presente invención se usan para cultivar células de mamífero que expresan una proteína o polipéptido de interés.

45 En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de cultivo a escala comercial (por ejemplo, 500 l o más) que utilizan un medio que contiene 2-desoxiglucosa y glucosa, en el que la 2-desoxiglucosa está presente en entre 0,25 gramos por litro y 1 gramo por litro, en el que la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa es igual o menor que de 1 a 9. En determinadas realizaciones, los procedimientos de cultivo como se ha divulgado pueden incluir uno o más cambios de temperatura durante el curso del cultivo celular. De acuerdo con las enseñanzas en el presente documento, el uso de tales procedimientos permite altos niveles de producción de proteínas y disminuye la acumulación de ciertos factores indeseables, incluido, aunque sin limitaciones, lactato.

50 Un experto en la técnica entenderá que las formulaciones de medios de la presente divulgación abarcan medios tanto definidos como complejos. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo es un medio definido en el que se conoce y se controla la composición del medio.

55 En determinadas realizaciones, las células se cultivan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de cultivo celular descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° 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 en una o más de las condiciones descritas en la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° de Serie 60/830.658, presentada el 13 de julio de 2006.

Los cultivos celulares de la presente invención pueden suplementarse opcionalmente con nutrientes y/u otros componentes del medio, incluyendo, por ejemplo, hormonas y/o otros factores de crecimiento, iones (tales como

sodio, cloruro, calcio, magnesio, y/o fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otras fuentes de energía. En determinadas realizaciones, es beneficioso suplementar los medios con uno o más inductores químicos tales como hexametileno-bis (acetamida) ("HMBA") y butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al comienzo del cultivo o pueden añadirse en un momento posterior con el fin de reponer los nutrientes agotados o por otra razón. En general, es deseable seleccionar la composición del medio inicial para minimizar la suplementación de acuerdo con la presente invención.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 muestra el crecimiento celular de células α -GDF-8 en presencia de 2-desoxiglucosa en placas.
- 10 La figura 2 muestra el crecimiento celular de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- La figura 3 muestra la viabilidad de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- La figura 4 muestra el título de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- 15 La figura 5 muestra la acumulación de lactato de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- La figura 6 muestra el crecimiento celular de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- La figura 7 muestra el título de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- 20 La figura 8 muestra la acumulación de lactato de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- La figura 9 muestra la captación de glucosa de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa.
- La Figura 10 muestra la densidad de células viables diarias de células α -GDF-8 células en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa.
- 25 La Figura 11 muestra el título diario de células α -GDF-8 células en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa.
- La Figura 12 muestra los niveles diarios de lactato de células α -GDF-8 células en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa.
- La Figura 13 muestra los niveles diarios de glucosa de células α -GDF-8 células en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa.
- 30 La Figura 14 muestra la productividad específica diaria de células α -GDF-8 células en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa.

Definiciones

35 "Aminoácido": El término "aminoácido" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos de origen natural que se usan normalmente en la formación de polipéptidos o análogos o derivados de dichos aminoácidos o cualquier aminoácido de origen no natural. Los aminoácidos de la presente invención se proporcionan en medio a cultivos celulares. Los aminoácidos proporcionados en el medio se pueden proporcionar como sales o en forma de hidrato.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende al menos uno, y típicamente dos, dominios VH o porciones de los mismos, y/o al menos uno, y típicamente dos, dominios VL o porciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están interconectados a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro. Los anticuerpos, o una porción de los mismos, se pueden obtener de cualquier origen, incluyendo, entre otros, roedores, primates (por ejemplo, primates humanos y no humanos), camélidos, así como los producidos de forma recombinante, por ejemplo, quiméricos, humanizados, y/o generados *in vitro*, como se describe con más detalle en el presente documento.

50 Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a anticuerpo" de un anticuerpo incluyen, entre otros, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL and CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable de cadena pesada (VHH) de camélido o camelizado; (vii) un Fv

- monocatenario Fv (scFv); (viii) un anticuerpo biespecífico; y (ix) uno o más fragmentos de una molécula de inmunoglobulina condensados a una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se formen en forma de una proteína de una cadena en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242: 423 - 26; Huston y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5879 - 83). Estos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que entren dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos se pueden obtener usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica y los fragmentos se evalúan para determinar la función del mismo modo que son anticuerpos intactos.
- 5 El "fragmento de unión a antígeno" puede, opcionalmente, incluir además un resto que potencia una o más de, por ejemplo, la estabilidad, la función de la célula efectora o la fijación del complemento. Por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno puede incluir además un resto pegilado, albúmina o una región constante de la cadena pesada y/o ligera.
- 10 Aparte de los anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante diversos procedimientos, incluidos fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315321 (1990); Kostelny y col., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).
- 15 Se dispone de numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante generación de hibridomas de acuerdo con procedimientos conocidos. Los hibridomas formados de este modo normalmente se detectan usando procedimientos estándar, como ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA) y análisis por resonancia en plasmón superficial (Biacore™) para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno especificado. Cualquier forma del antígeno especificado se puede usar como inmunógeno, por ejemplo antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmentos del mismo, así como péptido antigénico del mismo.
- 20 Un procedimiento de ejemplo de fabricación de anticuerpos incluye la detección selectiva de bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo bibliotecas de expresión en fagos o ribosomas. La expresión en fagos se describe en, por ejemplo, Ladner y col., la patente de EE.UU. N° 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228: 1315 - 1317; los documentos WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690 y WO 90/02809.
- 25 Además del uso de bibliotecas de expresión, el antígeno especificado se pueden usar para inmunizar un animal no humano, por ejemplo un roedor, por ejemplo un ratón, hámster o rata. En determinadas realizaciones, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible modificar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de los loci de Ig humana. Usando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green y col., (1994) *Nature Genetics* 7: 13-21, documento US 2003-0070185, documento WO 96/34096, publicado el 31 de octubre de 1996, y solicitud PCT n° PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996.
- 30 En determinadas realizaciones se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano y, después se puede producir modificado, por ejemplo humanizado, desimmunizado, quimérico, usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia. Se han descrito diversos abordajes 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., LA publicación de patente europea EP171496; LA publicación de patente europea 0173494, la patente del Reino Unido GB 2177096B. Los anticuerpos humanizados también se pueden producir, por ejemplo, usando ratones transgénicos que expresan los genes de las cadenas ligeras y pesadas humanas pero que no pueden expresar los genes de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina de ratón endógena. Winter describe un procedimiento de injerto de CDR ilustrativo que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento (patente de EE.UU. N° 5.225.539). Todas las CDR de un anticuerpo humano concreto pueden sustituirse con al menos una porción de una CDR no humana o solo algunas de las CDR se pueden sustituir con CDR no humanas. Solo es necesario reemplazar el número de CDR necesarias para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.
- 35 Los anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se pueden generar sustituyendo secuencias del dominio variable Fv que no están implicadas directamente en la unión del antígeno con secuencias equivalentes de dominios variables Fv humanos. Procedimientos de ejemplo para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos se proporcionan en Morrison (1985) *Science* 229: 12021207; en Oi y col., (1986) *BioTechniques* 4: 214; y en los documentos US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213. Dichos procedimientos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todos o parte de los dominios
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Dichos ácidos nucleicos se pueden obtener a partir de un hibridoma productor de un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se ha descrito anteriormente, así como de otras fuentes. Un ADN recombinante que codifica una molécula de anticuerpo humanizado se puede clonar después en un vector de expresión adecuado.

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado se optimiza mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencias consenso, sustituciones de línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden producir mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la materia (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 producir de acuerdo con las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400).

10 Un anticuerpo o fragmento del mismo también se puede modificar mediante delección específica de epítomos de linfocitos T humanos o "desinmunización" mediante los procedimientos divulgados en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. En pocas palabras, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo se pueden analizar para detectar péptidos que se unen al MHC de clase II; estos péptidos representan potenciales epítomos de linfocitos T (como se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de potenciales epítomos de linfocitos T se puede aplicar un abordaje de modelo informático denominado "enhebrado de péptidos" y, además, se puede realizar búsquedas en una base de datos de los péptidos de unión del MHC de clase II humano de motivos presentes en las secuencias de V_H y V_L, como se describe en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos principales e DR de MHC de clase II y, por tanto, constituyen potenciales epítomos de los linfocitos T. Los potenciales epítomos de los linfocitos T detectados se pueden eliminar sustituyendo un número pequeño de residuos de aminoácidos en los dominios variables o, preferentemente, mediante sustituciones de un solo aminoácido. Normalmente se realizan sustituciones conservadoras. A menudo, aunque no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana, por ejemplo, se divulgan en Tomlinson, y col., (1992) J. Mol. Biol. 227: 776 - 798; Cook, G. P. y col., (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237 - 242; Chothia, D. y col., (1992) J. Mol. Biol. 227: 799 - 817; y Tomlinson y col., (1995) EMBO J. 14: 4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio exhaustivo de las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina humana (recopilado por Tomlinson, I.A. y col., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Estas secuencias se pueden usar como fuente de secuencias humanas, por ejemplo para regiones marco y CDR. También se pueden usar regiones marco humanas consenso, por ejemplo como se describe en el documento US 6.300.064.

15 En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede contener una región Fc o constante alterada de la inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo producido de acuerdo con las enseñanzas del presente documento se puede unir con más fuerza o con más especificidad a moléculas efectoras, como el complemento y/o receptores de Fc, que pueden controlar varias funciones inmunitarias del anticuerpo, tal como la actividad de las células efectoras, la lisis, la actividad mediada por el complemento, el aclaramiento de anticuerpos y la semivida de los anticuerpos. Los receptores de Fc típicos que se unen a una región Fc de un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo IgG) incluyen, entre otros, receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII y FcRn, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores de Fc se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 45792, 1991; Capel y col., Immunomethods 4: 2534, 1994; y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41, 1995).

20 "Cultivo discontinuo": La expresión "cultivo discontinuo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento de cultivo de células en el que todos los componentes que se usarán en último término en el cultivo de las células, incluyendo el medio (véase la definición de "Medio" más adelante), así como las propias células, se proporcionan al comienzo del proceso de cultivo. Un cultivo discontinuo típicamente se detiene en algún momento y las células y/o componentes en el medio se cosechan y opcionalmente se purifican.

25 "Biorreactor": El término "biorreactor" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier recipiente útil para el crecimiento de un cultivo celular. Un biorreactor puede tener cualquier tamaño con tal de que sea útil para el cultivo de células. 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 en medio. Las condiciones internas del biorreactor, incluyendo, entre otras, el pH y la temperatura, están opcionalmente controladas durante el periodo de cultivo. Un biorreactor puede estar compuesto por cualquier material que sea adecuado para contener cultivos celulares suspendidos en medios en las condiciones de cultivo de la presente invención, incluyendo vidrio, plástico o metal. La expresión "biorreactor de producción", como se usa en el presente documento, se refiere al biorreactor final usado en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen del biorreactor de producción es típicamente de al menos 500 litros y puede ser 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen en medio. Un experto en la técnica será consciente de y será capaz de elegir biorreactores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención.

30 "Densidad celular": La expresión "densidad celular" como se usa en el presente documento se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio.

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

"Medio complejo": La expresión "medio complejo" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un medio que contiene al menos un componente cuya identidad o cantidad es desconocida o no está controlada.

“Cultivo”, “Cultivo celular”: Estos términos, tal como se usa en el presente documento, se refieren a una población de células que se suspende en un medio (véase la definición de "Medio" más adelante) en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o crecimiento de la población celular. Como será evidente para los expertos en la técnica, estos términos como se usan en el presente documento se refieren también a la combinación que comprende la población de células y el medio en el que se suspende la población. En determinadas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de células de mamífero.

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

"Cultivo de alimentación discontinua": La expresión "cultivo de alimentación discontinua" como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento de cultivo de células en las que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos posteriores al comienzo del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados comprenden típicamente suplementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Adicionalmente o como alternativa, los componentes adicionales pueden incluir componentes suplementarios (véase la definición de "componentes suplementarios" más adelante). En determinadas realizaciones, los componentes adicionales se pueden proporcionar en un medio de alimentación (véase la definición de "Medio de alimentación" más adelante). Un cultivo de alimentación discontinua típicamente se detiene en algún momento y las células y/o componentes en el medio se cosechan y opcionalmente se purifican.

"Medio de alimentación": La expresión "medio de alimentación" tal como se usa en el presente documento se refiere a una solución que contiene nutrientes que nutren las células de mamíferos en crecimiento que se añade después del comienzo del cultivo celular. Un medio de alimentación puede contener componentes idénticos a los proporcionados en el medio de cultivo celular inicial. Como alternativa, un medio de alimentación puede contener uno o más componentes adicionales además de los proporcionados en el medio de cultivo celular inicial. Adicionalmente o como alternativa, un medio de alimentación puede carecer de uno o más componentes proporcionados en el medio de cultivo celular inicial. En determinadas realizaciones, uno o más componentes de un medio de alimentación se proporcionan a concentraciones o niveles idénticos o similares a las concentraciones o niveles en los que dichos componentes se proporcionan en el medio de cultivo celular inicial. En determinadas realizaciones, uno o más componentes de un medio de alimentación se proporcionan a concentraciones o niveles diferentes a las concentraciones o niveles en los que dichos componentes se proporcionan en el medio de cultivo celular inicial. En determinadas realizaciones, un medio de alimentación contiene componentes suplementarios (véase la definición de "componentes suplementarios" más adelante).

"Fragmento": El término "fragmento" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido y se define como cualquier porción pequeña de un polipéptido dado que es única para o característica de ese polipéptido. El término como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier porción pequeña de un polipéptido dado que retiene al menos una fracción de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad conservada es por lo menos el 10 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad conservada es por lo menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad conservada es por lo menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. En determinadas realizaciones, la fracción de actividad conservada es por lo menos el 100 % o más de la actividad del polipéptido de longitud completa. Como alternativa o adicionalmente, el término tal como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier porción de un polipéptido dado que incluye por lo menos un elemento de secuencia establecido encontrado en el polipéptido de longitud completa. En algunas realizaciones, el elemento de secuencia abarca al menos aproximadamente 4 - 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

"Gen": El término "gen" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, ADN o ARN, por lo menos alguna porción de la cual codifica un producto final pequeño, típicamente, entre otros, un polipéptido. Opcionalmente, el término se refiere no solo a la secuencia de codificación que codifica el polipéptido u otro producto final pequeño, sino también puede englobar regiones que la preceden y/o posteriores a la secuencia de codificación que modulan el nivel de expresión basal (véase la definición de "elemento de control genético" más adelante), así como secuencias intermedias ("intrones") entre segmentos de codificación individuales ("exones").

"Elemento de control genético": La expresión "elemento de control genético" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier elemento de secuencia que modula la expresión de un producto de un gen al que está unido operativamente. Los elementos de control genético pueden funcionar aumentando o disminuyendo los niveles de

expresión de un producto génico y pueden estar situados antes, dentro o después de la secuencia de codificación. Los elementos de control genético pueden actuar en cualquier etapa de la expresión génica regulando, por ejemplo, la iniciación, la elongación o la terminación de la transcripción, el corte y empalme del ARN, la edición del ARNm, la estabilidad del ARNm, la localización del mana dentro de la célula, la iniciación, la elongación o la terminación de la traducción, o cualquier otra etapa de la expresión génica. Los elementos de control genético pueden funcionar individualmente o en combinación unos con otros.

"Glucólisis": El término "glucólisis" tal como se usa en el presente documento se refiere a la oxidación metabólica de la glucosa por las células. Durante la glucólisis, la glucosa se oxida en lactato o piruvato. En condiciones aeróbicas, el producto dominante es piruvato. Cuando el oxígeno se agota, el producto glucolítico dominante es lactato. Ciertos objetos de la presente invención son prevenir o retrasar la producción o acumulación de lactato en el cultivo celular mediante la alteración del proceso normal de la glucólisis. En determinadas realizaciones de la divulgación, la producción o acumulación de lactato es impedido o ralentizado por las células en crecimiento en un cultivo celular que comprende una sustancia inhibidora de la glucólisis, por ejemplo, 2-desoxiglucosa, di(2-etilhexil)fosfato, fosfato de tributilo, fosfato de dodecilo, éster etílico de 2-dimetilamino de ácido (difenilmetil difenil)fosfórico, yoduro de [2-(difenilfosfinilo)etil]trimetilamonio, acetato de yodo y/o acetato de flúor.

"Sustancia inhibidora de la glucólisis": La expresión "sustancia inhibidora de la glucólisis" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia (por ejemplo, un compuesto, polipéptido, fármaco, metabolito, etc.) que inhibe, o de otra manera altera de forma negativa, la glucólisis de la glucosa y la posterior producción o acumulación de lactato. En determinadas realizaciones, dicha sustancia inhibidora de la glucólisis se proporciona en un medio de cultivo celular. En determinadas realizaciones, una sustancia inhibidora de la glucólisis es 2-desoxiglucosa. En determinadas realizaciones, a sustancia inhibidora de la glucólisis es di(2-etilhexil)fosfato, fosfato de tributilo, fosfato de dodecilo, éster etílico de 2-dimetilamino de ácido (difenilmetil)fosfórico, yoduro de [2-(difenilfosfinilo)etil]trimetilamonio, acetato de yodo y acetato de flúor. Un experto ordinario en la técnica reconocerá o será capaz de determinar las sustancias inhibidoras de la glucólisis sin experimentación indebida que se puede utilizar de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención.

"Célula huésped": La expresión "célula huésped" como se usa en el presente documento se refiere a una célula que crece en cultivo de acuerdo con la presente invención para producir una proteína o polipéptido de interés. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero.

"Híbrido": El término "híbrido" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula o progenie de una célula resultante de la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de anticuerpos. El híbrido resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales usadas para crear el híbrido pueden proceder de cualquier fuente de mamífero, incluyendo, entre otras, rata, cerdo, conejo, oveja, cabra y ser humano. El término también abarca líneas de células de trioma, que son el resultado cuando la progenie de fusiones de mieloma heterohíbrido, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, posteriormente se fusionan con una célula plasmática. Adicionalmente, con el término se pretende incluir cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos tales como, por ejemplo, cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein y col., Nature, 537: 3053, 1983).

"Densidad de células viables integradas", "DCVI": Las expresiones "densidad de células viables integrada" o "DCVI", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la densidad promedio de células viables durante el transcurso del cultivo multiplicada por la cantidad de tiempo durante el cual se ha producido el cultivo. Cuando la cantidad de polipéptido y/o proteína producido es proporcional al número de células viables presentes durante el transcurso del cultivo, la densidad de células viables integradas es una herramienta útil para estimar la cantidad de polipéptido y/o proteína producido durante el transcurso del cultivo.

"Medio", "Medio de cultivo celular", "Medio de cultivo": Estas expresiones, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una solución que contiene nutrientes que alimentan a las células en crecimiento. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo es útil para el cultivo de células de mamífero. Típicamente, un medio de cultivo proporciona aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes energéticas, lípidos, y oligoelementos requeridos por la célula para el crecimiento y/o supervivencia mínimos. Un medio de cultivo también puede contener componentes suplementarios (véase la definición de "componentes suplementarios" más adelante) que potencian el crecimiento y/o supervivencia por encima de la velocidad mínima, incluyendo, entre otros, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones concretos (por ejemplo, sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, y/o glucosa u otra fuente de energía. En determinadas realizaciones, un medio se formula ventajosamente a un pH y concentración de sal óptimos para la supervivencia y la proliferación celular. En determinadas realizaciones, el medio es un medio de alimentación que se añade después del comienzo del cultivo celular (véase la definición de "medio de alimentación", en lo que antecede). En determinadas realizaciones, el medio de cultivo celular es una mezcla de una solución de nutrientes de partida y cualquier medio de alimentación que se añade después del comienzo del cultivo celular.

"Producto de desecho metabólico": La expresión "producto de desecho metabólico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto producido por el cultivo celular como resultado de procesos metabólicos normales o no normales que son de la misma manera perjudiciales para el cultivo celular, particularmente en

relación con la expresión o actividad de un polipéptido o proteína recombinante deseado. Por ejemplo, los productos de desecho metabólicos pueden ser perjudiciales para el crecimiento o viabilidad del cultivo celular, pueden disminuir la cantidad de polipéptido o proteína recombinante producido, pueden alterar el plegamiento, la estabilidad, la glicosilación u otra modificación postraducciona del polipéptido o proteína expresado, o pueden ser perjudiciales para las células y/o la expresión o la actividad del polipéptido o proteína recombinante en una serie de otras maneras. Los ejemplos de productos de desecho metabólicos incluyen 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 uno, producto metabólico de desecho. Un objetivo de la presente invención es ralentizar la producción de, reducir o incluso eliminar los productos de desecho metabólicos en cultivos celulares.

"Polipéptido": El término "polipéptido" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. El término se utiliza para hacer referencia a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto ordinario en la materia entenderá que el término no se limita a cadenas largas y se puede referir a una cadena mínima que comprende dos aminoácidos unidos entre sí a través de un enlace peptídico. Como saben los expertos en la técnica, los polipéptidos pueden procesarse y/o modificarse. Por ejemplo, un polipéptido puede estar glicosilado. Un polipéptido que se expresa de acuerdo con la presente invención puede ser un polipéptido terapéutico. Un polipéptido terapéutico es un polipéptido que tiene un efecto biológico sobre una región en el cuerpo sobre la que actúa o sobre una región del cuerpo sobre la que actúa de forma remota a través de intermediarios. Ejemplos de agentes terapéuticos polipeptídicos se tratan con más detalle a continuación.

"Proteína". El término "proteína" tal como se usa en el presente documento se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad discreta. Si un solo polipéptido es la unidad de funcionamiento discreta y no requiere asociación física permanente o temporal con otros polipéptidos a fin de formar la unidad de funcionamiento discreta, los términos "polipéptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente. Si la unidad funcional discreta está compuesta por múltiples polipéptidos que se asocian físicamente entre sí, el término "proteína" tal como se usa en el presente documento se refiere a los múltiples polipéptidos que están acoplados físicamente y función juntos como la unidad discreta. Una proteína que se expresa de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína terapéutica. Una proteína terapéutica es una proteína que tiene un efecto biológico sobre una región en el cuerpo sobre la que actúa o sobre una región del cuerpo sobre la que actúa de forma remota a través de intermediarios. Los ejemplos de agentes terapéuticos proteínicos se tratan con más detalle a continuación.

"Polipéptido expresado de forma recombinante" y "polipéptido recombinante": Estas expresiones, tal como se usan en el presente documento, se refieren a un polipéptido expresado a partir de una célula huésped que ha sido manipulada por la mano del hombre para expresar ese polipéptido. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero. En determinadas realizaciones, esta manipulación puede comprender una o más modificaciones genéticas. Por ejemplo, las células huésped se pueden modificar genéticamente mediante la introducción de uno o más genes heterólogos que codifican el polipéptido a expresar. El polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante puede ser idéntico o similar a los polipéptidos que normalmente se expresan en la célula huésped. El polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante también puede ser ajeno a la célula huésped, por ejemplo, heterólogo a los polipéptidos que normalmente se expresan en la célula huésped. En determinadas realizaciones, el polipéptido heterólogo expresado de forma recombinante es quimérico. Por ejemplo, las porciones de un polipéptido pueden contener secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a los polipéptidos expresados normalmente en la célula huésped, mientras que otras porciones contienen secuencias de aminoácidos que son extrañas para la célula huésped. Adicionalmente o como alternativa, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos a partir de dos o más polipéptidos diferentes que se expresan normalmente en la célula huésped. Adicionalmente, un polipéptido puede contener secuencias de aminoácidos a partir de dos o más polipéptidos que son ambos extraños para la célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped se modifica genéticamente por la activación o regulación por aumento de uno o más genes endógenos.

"Componentes suplementarios": La expresión "componentes suplementarios", como se usa en el presente documento, se refiere a componentes que potencian el crecimiento y/o supervivencia por encima de la velocidad mínima, incluyendo, entre otros, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones concretos (por ejemplo, sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, y/o glucosa u otra fuente de energía. En determinadas realizaciones, se añaden componentes suplementarios al cultivo celular inicial. En determinadas realizaciones, se añaden componentes suplementarios después del comienzo del cultivo celular.

"Título": El término "título" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad total de polipéptido o proteína expresado recombinantemente producido por un cultivo celular en una cantidad dada del volumen de medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos o microgramos de polipéptido o proteína por mililitro de medio.

Descripción detallada de determinadas realizaciones

La presente invención proporciona procedimientos y formulaciones de medios mejorados para la producción de proteínas y/o polipéptidos mediante cultivo celular. En determinadas realizaciones, la invención proporciona

procedimientos que minimizan la producción de productos de desecho metabólicos en un cultivo celular. En determinadas realizaciones, la invención proporciona procedimientos que minimizan la producción del producto de desecho metabólico lactato. El lactato ha mostrado que es perjudicial para el crecimiento celular, la viabilidad, y/o la producción o calidad de proteína. Los trabajos anteriores han demostrado que los niveles de lactato en cultivos celulares pueden mantenerse bajos, manteniendo bajos los niveles de glucosa durante toda la duración del cultivo (Cruz y col., *Metabolic Shifts by Nutrient Manipulation in Continuous Culture of BHK Cells*, *Biotechnology and Bioengineering*, 66(2):104 - 13, 1999). Sin embargo, la monitorización y el ajuste continuos de los niveles de glucosa no son prácticos para la producción a gran escala de proteínas o polipéptidos. La presente invención proporciona procedimientos y formulaciones de medios mejorados para la producción de proteínas y/o polipéptidos mediante cultivo celular que evitan la necesidad de vigilar y ajustar continuamente los niveles de glucosa del cultivo. En determinadas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo discontinuo o de alimentación discontinua.

Determinadas composiciones de la presente invención incluyen un medio de cultivo celular que comprende una sustancia inhibidora de la glucólisis. En determinadas realizaciones de la divulgación, dichas sustancias inhibidoras de la glucólisis comprenden 2-desoxiglucosa, di(2-etilhexil)fosfato, fosfato de tributilo, fosfato de dodecilo, éster etílico de 2-dimetilamino de ácido (defenilmetil)fosfórico, yoduro de [2-(difenilfosfinilo)etil]trimetilamonio, acetato de yodo y acetato de flúor. De acuerdo con algunas realizaciones, los niveles de los productos de desecho metabólicos del cultivo son más bajos que los niveles de los productos de desecho metabólicos producidos en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de dicha sustancia inhibidora de la glucólisis. De acuerdo con algunas realizaciones, los niveles de lactato del cultivo son más bajos que los niveles de lactato producidos en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de dicha sustancia inhibidora de la glucólisis.

Otras realizaciones de la invención se tratan con detalle más adelante. No obstante, los expertos en la técnica entenderán que diversas modificaciones de estas realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las reivindicaciones y equivalentes de las mismas son las que definen el alcance de la presente invención, que no está y no deberá estar limitada a o por esta descripción de determinadas realizaciones.

Células

Cualquier célula huésped sensible al cultivo celular y a la expresión de proteínas o polipéptidos se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, la célula huésped es de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de mamíferos que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, N° ECACC: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países bajos)); línea CV1 de riñón de ratón transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.*, 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario 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 cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W 138, ATCC CCL 75); células hepáticas humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44 - 68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Adicionalmente, cualquier número de líneas celulares de hibridoma comercialmente y no comercialmente disponibles que expresan polipéptidos o proteínas pueden usarse de acuerdo con la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que las líneas celulares de hibridoma pueden tener diferentes requisitos de nutrición y/o podrían necesitar diferentes condiciones de cultivo para el crecimiento óptimo y la expresión de polipéptidos o proteínas y será capaz de modificar las condiciones según sea necesario.

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

Ciertos polipéptidos pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o alguna otra característica 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 diseñado para expresar un polipéptido específico, la variabilidad dentro de la población celular puede existir de tal modo que determinadas células individuales crecerán mejor y/o producirán más polipéptido de interés. En determinadas realizaciones, la línea celular se selecciona empíricamente por el profesional para el crecimiento sólido en las condiciones particulares escogidas para el cultivo de las células. En determinadas realizaciones, las células individuales diseñadas para expresar un polipéptido particular se escogen para la producción a gran escala en base al crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, el título del polipéptido expresado o cualquier combinación de estos o cualquier otra condición que el profesional considere importante.

Cultivo de las células

La presente invención puede usarse con cualquier procedimiento o sistema de cultivo celular que sea susceptible a la expresión de polipéptidos. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en cultivos discontinuos o de alimentación discontinua, en los que el cultivo se termina después de una expresión suficiente del polipéptido, tras lo cual el polipéptido expresado se cosecha y, opcionalmente, se purifica. Como alternativa, las células pueden cultivarse en cultivos de perfusión, en los que el cultivo no se termina y periódicamente o continuamente se añaden nuevos nutrientes y otros componentes al cultivo, durante el cual el polipéptido expresado se cosecha periódica o continuamente.

Las células pueden cultivarse en cualquier volumen conveniente elegido por el profesional. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en recipientes de reacción a pequeña escala cuyo volumen varía desde unos pocos mililitros a varios litros. Como alternativa, las células pueden cultivarse en biorreactores comerciales a gran escala cuyo volumen varía de aproximadamente al menos 1 litro a 10, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 8.000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entremedias.

La temperatura del cultivo celular se seleccionará en base principalmente al intervalo de temperaturas a las que el cultivo celular sigue siendo viable, a las que se produce un nivel elevado de polipéptido, la temperatura a la cual se minimiza la producción o la acumulación de productos metabólicos de desecho y/o cualquier combinación de estos u otros factores considerados importantes por el profesional. Como ejemplo no limitante, las células CHO crecen bien y producen niveles altos de proteína o polipéptido a aproximadamente 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamíferos crece bien y/o puede producir niveles altos de proteína o polipéptido dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos enseñados por la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. Determinadas células de mamíferos crecen bien y/o pueden producir niveles altos o proteína o polipéptido dentro del intervalo de aproximadamente 35 °C a 40 °C. En determinadas 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 una o más veces durante el proceso de cultivo celular. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas apropiadas a las cuales cultivar las células, dependiendo de las necesidades de las células y los requisitos de producción del profesional.

Adicionalmente, el cultivo puede someterse a uno o más cambios de temperatura durante el transcurso del cultivo. Al cambiar la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede tardar varias horas o días completar el cambio de temperatura. Como alternativa, el cambio de temperatura puede ser relativamente brusco. La temperatura puede aumentarse o disminuirse de manera constante durante el proceso de cultivo. Como alternativa, la temperatura puede aumentarse o reducirse en cantidades pequeñas a diversos tiempos durante el proceso de cultivo. La(s) temperatura(s) posterior(es) o intervalo(s) de temperatura puede ser inferiores o superiores a la(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura inicial(es) o previo(s). Un experto en la técnica entenderá que múltiples cambios de temperatura pequeños están abarcados en estas realizaciones. Por ejemplo, la temperatura puede cambiarse una vez (a una temperatura o intervalo de temperatura mayor o menos), las células mantenidas a esta temperatura o intervalo de temperatura para un determinado período de tiempo, después de lo cual la temperatura puede cambiarse de nuevo a una nueva temperatura o intervalo de temperatura, que puede ser mayor o menor que la temperatura o intervalo de temperatura de la temperatura o intervalo de temperatura anterior. La temperatura del cultivo después de cada cambio pequeño puede ser constante o puede mantenerse dentro de un cierto intervalo de temperaturas.

Al igual que con la temperatura o intervalo de temperatura inicial, la temperatura o intervalo de temperatura del cultivo celular después del o los cambios de temperatura se seleccionará principalmente según la(s) temperatura(s) a la(s) que el cultivo celular sigue siendo viable, el intervalo en el que se produce un alto nivel de polipéptido o proteína, el intervalo en el que se minimiza la producción o acumulación de productos metabólicos de desecho, y/o cualquier combinación de estos u otros factores considerados importantes por el profesional. En general, la mayoría de las células de mamíferos siguen siendo viables y producen niveles altos o proteína o polipéptido dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C, aunque los procedimientos enseñados por la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. En determinadas realizaciones, las células de mamíferos siguen siendo viables y producen niveles altos o proteína o polipéptido dentro de un intervalo de aproximadamente 25 °C a 35 °C. En determinadas 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 una o más veces después del o los cambios de temperatura. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura adecuados a las cuales cultivar las células después del o los cambios de temperatura, dependiendo de las necesidades concretas de las células y de los requisitos de producción concretos del profesional. Las células pueden cultivarse durante cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del profesional y de los requisitos de las propias células.

En determinadas realizaciones, las reacciones discontinuas y con alimentación discontinua se terminan una vez que el polipéptido expresado alcanza un título suficientemente alto, según lo determinado por las necesidades del profesional. Como ejemplos no limitantes, los cultivos celulares se pueden terminar cuando el título polipéptido es 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2000 mg/l o superior. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar uno o más títulos apropiados a los que se puede cosechar un cultivo

discontinuo o de alimentación discontinua. Adicionalmente o como alternativa, las reacciones discontinuas y con alimentación discontinua se terminan una vez que las células alcanzan una densidad suficientemente alta, según lo determinado por las necesidades del profesional. Por ejemplo, el cultivo puede terminarse una vez que las células alcanzan 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.

En determinadas realizaciones, los cultivos celulares discontinuos y/o de alimentación discontinua se terminan para evitar la producción o acumulación indeseable de los productos metabólicos de desecho, tales como lactato y amonio. En determinadas realizaciones, un cultivo celular se termina antes de que el lactato se acumule en el cultivo a un nivel indeseable. Como ejemplos no limitantes, un cultivo de células puede terminarse antes de que el lactato alcance 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 g/l. En determinadas realizaciones, los cultivos de células cultivadas de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención son capaces de crecer durante un período de tiempo más largo de lo que sería posible usando los procedimientos de cultivo tradicionales, ya que se minimiza la producción o acumulación de productos metabólicos de desecho.

En determinadas realizaciones, las reacciones discontinuas y con alimentación discontinua se terminan una vez que la densidad celular alcanza un título suficientemente alto, según lo determinado por las necesidades del profesional. Por ejemplo, un cultivo celular puede terminarse una vez que la densidad celular alcanza 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 millones de células por ml, o más. En determinadas realizaciones, las reacciones discontinuas y de alimentación discontinua se terminan antes de que la densidad celular alcance 1 millón de células por ml. En determinadas realizaciones, los cultivos de células cultivadas de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención son capaces de crecer a una densidad celular más alta de lo que sería posible usando procedimientos de cultivo tradicionales.

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 se han agotado o han sido metabolizados por las células. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular con hormonas u otros factores de crecimiento, iones concretos (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. Estos componentes suplementarios pueden añadirse todos al cultivo celular de una sola vez o se pueden proporcionar al cultivo celular en una serie de adiciones.

En determinadas realizaciones, las células se cultivan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de cultivo celular descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Serie. 11/213.308, 11/213.317 y 11/213.633 cada una de los cuales se presentó el 25 de agosto de 2005. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la concentración de aminoácidos acumulada es mayor que aproximadamente 70 mM. En determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la relación molar entre glutamina acumulada y asparagina acumulada es menor que aproximadamente 2. En determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la relación molar entre glutamina acumulada y los aminoácidos totales acumulados es menos de aproximadamente 0,2. En determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la relación molar entre los iones inorgánicos acumulados y los aminoácidos totales acumulados está entre aproximadamente 0,4 a 1. En determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo en el que la concentración combinada de glutamina acumulada y asparagina acumulada está entre aproximadamente 16 y 36 mM. En determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo que contiene dos, tres, cuatro o las cinco condiciones del medio precedentes.

En algunas realizaciones, las células se cultivan en una o más de las condiciones descritas en la solicitud de patente provisional de EE.UU. N° de Serie 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 en 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 contiene manganeso a una concentración de aproximadamente 40 nM.

Un experto en la técnica será capaz de adaptar las condiciones específicas de cultivo de células con el fin de optimizar determinadas características del cultivo celular, incluyendo, entre otros, la tasa de crecimiento, la viabilidad celular, la densidad celular final del cultivo celular, la concentración final de los subproductos metabólicos perjudiciales tales como lactato y amonio, el título final del polipéptido expresado, o cualquier combinación de estas u otras condiciones consideradas importantes por el profesional.

Composiciones de los medios

Se puede usar cualquiera de una amplia variedad de medios de crecimiento de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una variedad de medios químicamente definidos, en el que los componentes de los medios son conocidos y están controlados. En determinadas realizaciones, las células se cultivan en cualquiera de una variedad de medios complejos en los que no todos los

componentes de los medios son conocidos y están controlados.

Se han desarrollado ampliamente medios de cultivo químicamente definidos para el cultivo de células y se han publicado durante las últimas décadas, incluidos los medios de cultivo químicamente definidos para el cultivo de células de mamíferos. Todos los componentes de los medios definidos están bien caracterizados y los medios definidos de este modo no contienen aditivos complejos tales como suero o hidrolizados. Las primeras formulaciones de medios se desarrollaron para permitir el crecimiento celular y el mantenimiento de la viabilidad con poca o ninguna preocupación por la producción de proteínas. Más recientemente, las formulaciones de medios se han desarrollado con el propósito expreso de soportar cultivos de células altamente productivos que produzcan proteínas y/o polipéptidos recombinantes.

Los medios definidos típicamente consisten en aproximadamente cincuenta entidades químicas a concentraciones conocidas en agua. Los medios más definidos también contienen una o más proteínas bien caracterizadas, tales como insulina, IGF-1, transferrina o BSA, pero otros no requieren componentes proteicos y, por consiguiente, se denominan medios definidos libres de proteínas. Los componentes químicos de los medios definidos generalmente entran en cinco grandes categorías: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos y una categoría variada que desafía la clasificación neta.

Todos los medios, definidos o complejos, incluyen una fuente de energía para las células en crecimiento. 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 de los medios tradicionales, incluidos los medios disponibles comercialmente, tal como medio F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco ([DMEM], Sigma), tienen niveles relativamente altos obtenidos de glucosa. Tradicionalmente se ha pensado que la glucosa requiere en abundancia, ya que es la principal fuente de energía metabólica para las células. Sin embargo, el consumo rápido de la glucosa conduce 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 el cultivo celular (véase Gorfien y col., Optimized Nutrient Additives for Fed-Batch Cultures, Biopharm. International, April 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 abarca el descubrimiento de que ciertos procedimientos de cultivo celular y formulaciones de medio minimizan e incluso invierten la acumulación de productos de desecho metabólicos, por ejemplo, lactato, en el cultivo. Roth y col., han demostrado que la 2-desoxiglucosa reduce flujo de glucosa/energía cuando se alimenta a ratas sin disminuir su ingesta total de alimentos (Caloric Restriction in Primates and Relevance to Humans, Annals of the New York Academy of Sciences, 928: 305 - 15, 2001). La 2-desoxiglucosa es un análogo estructural de la glucosa en el que el grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar está sustituida por un resto de hidrógeno. Esta divulgación demuestra que las formulaciones de medios que contienen sustancias inhibitoras de la glucólisis, incluidas, entre otras, la 2-desoxiglucosa, tienen como resultado una disminución en la acumulación de productos de desecho metabólicos, incluyendo lactato, cuando se usan para hacer crecer células en cultivo celular. Sin desear quedar ligado a teoría concreta alguna, es posible que al proporcionar dicha sustancia inhibitora de la glucólisis en los medios de partida, la glucólisis se ralentiza o altera de alguna manera, de modo que se frena o previene la acumulación de lactato en el cultivo. Las formulaciones de medios de la presente invención que contienen tales sustancias inhibitoras de la glucólisis también tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento celular y/o la viabilidad, lo que lleva a una DCVI global más alta.

En determinadas realizaciones de la divulgación, una sustancia inhibitora de la glucólisis que se utilizará de acuerdo con la presente invención comprende 2-desoxiglucosa. En determinadas realizaciones, la 2-desoxiglucosa se proporciona 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, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más gramos por litro. En determinadas realizaciones de la divulgación, la relación entre la 2-desoxiglucosa y la glucosa en el cultivo celular es 1/50, 1/45, 1/40, 1/39, 1/38, 1/37, 1/36, 1/35, 1/34, 1/33, 1/32, 1/31, 1/30, 1/29, 1/28, 1/27, 1/26, 1/25, 1/24, 1/23, 1/22, 1/21, 1/20, 1/19, 1/18, 1/17, 1/16, 1/15, 1/14, 1/13, 1/12, 1/11, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3, 1/2, 1/1 o cualquier proporción superior o inferior a estos. Un experto ordinario en la técnica entenderá que las concentraciones y proporciones anteriores de 2-desoxiglucosa en un medio de cultivo celular se pueden conseguir usando un cultivo discontinuo, un cultivo de alimentación discontinua o un cultivo de perfusión.

La presente invención también abarca formulaciones de medios en las que la concentración de glutamina es limitada. En determinadas realizaciones, la concentración de glutamina en el medio de cultivo celular se limita a menos de aproximadamente 13 mM. En determinadas realizaciones, la concentración de glutamina en el medio de cultivo celular se limita a menos de aproximadamente 4 mM.

Los productos de desecho metabólicos (por ejemplo, lactato) se acumulan con el tiempo a medida que las células crecen en el cultivo. Como se ha descrito anteriormente, en los cultivos de células cultivadas de acuerdo con las enseñanzas descritas en el presente documento se puede cambiar, opcionalmente, la temperatura a una temperatura inferior después de una fase de crecimiento inicial a una temperatura superior. Un resultado interesante y beneficioso de la utilización de un medio de partida en el que la concentración de glutamina es limitada es que los

niveles de lactato dejan de aumentar y realmente comienzan a disminuir después de cambiar el cultivo celular a una temperatura inferior (por ejemplo, véanse los Ejemplos 3 y 4). Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, es posible que las células cultivadas en condiciones de niveles bajos de glutamina como se enseña en la presente invención puedan, en realidad, empezar a consumir y/o procesar el lactato.

5 De acuerdo con las enseñanzas descritas en el presente documento, generalmente es deseable cultivar un cultivo de células en el que el la DCVI total es alta. Al proporcionar un medio de cultivo en el que la concentración de glutamina está limitada y cambiar el cultivo celular a una temperatura inferior después de una fase de crecimiento inicial, los niveles de lactato en el cultivo empiezan a disminuir, lo que potencialmente permite un cultivo de células más viable y/o denso. Un problema con esta estrategia es que si la temperatura se cambia demasiado tarde, las
10 células serán incapaces de captar lactato, lo que tiene como resultado un cultivo celular menos viable y/o menos denso. Por lo tanto, es deseable cambiar el cultivo a una temperatura más baja antes de que el lactato se acumule a un nivel crítico. Sin embargo, un efecto negativo del cambio de las células a la temperatura más baja demasiado pronto es que, en consecuencia, el crecimiento celular se ralentiza. Por lo tanto, los procedimientos de cultivo celular tradicionales obligan a los profesionales a elegir entre dos opciones no tan ideales: 1) cambiar el cultivo temprano, lo
15 que tiene como resultado una acumulación general menor (y la posterior disminución si se cultiva en condiciones de niveles bajos de glutamina) de lactato pero una disminución de la tasa de crecimiento de las células después del cambio temprano de la temperatura, o 2) cambiar el cultivo más tarde, lo que tiene como resultado un aumento de la tasa de crecimiento celular pero una mayor acumulación global de lactato.

La presente divulgación demuestra que uno de los beneficios de las células en crecimiento en un medio de cultivo celular que contiene una sustancia inhibidora de la glucólisis, por ejemplo, 2-desoxiglucosa, es que el lactato se
20 acumula a un ritmo más lento de lo que lo haría en un medio de cultivo comparable que carece de dicha sustancia inhibidora de la glucólisis. Como resultado, el cultivo puede cambiarse a una temperatura inferior en un punto posterior de lo que sería posible si la cultura careciera de dicha sustancia inhibidora de la glucólisis, con el resultado de que las células todavía comenzarán a captar lactato después del cambio. Por lo tanto, mediante la utilización de algunos medios de la invención y procedimientos descritos en el presente documento, la densidad celular será mayor en el momento del cambio y la DCVI total se incrementará.

La presente divulgación enseña que al menos dos factores pueden ser importantes en la determinación de cuándo cambiar el cultivo para asegurar que las células comienzan a captar lactato después del cambio: la concentración de lactato en el momento del cambio y la densidad celular en el momento del cambio (por ejemplo, véase el Ejemplo 3).
30 Líneas celulares particulares pueden producir diferentes cantidades de lactato o pueden ser más o menos resistentes al lactato que se ha acumulado en el cultivo. Independientemente, la utilización de los procedimientos de la invención y las composiciones de los medios descritos en el presente documento se traducirá en una menor acumulación global de lactato en cualquier cultivo celular dado, de modo que se permite el cambio del cultivo a una temperatura inferior en un punto de tiempo más tarde y aumentar la DCVI total del cultivo. Un experto en la técnica
35 será capaz de seleccionar el punto de tiempo exacto en el que el cultivo se cambia a la temperatura menor en base a la naturaleza de la línea celular utilizada, la naturaleza de la proteína o polipéptido que se va a producir, la presencia o ausencia de otros componentes en el medio o cualquier otro factor que sea deseable para sus necesidades experimentales y/o de otro tipo.

Las formulaciones de los medios de la invención divulgadas en el presente documento pueden suplementarse, opcionalmente, según sea necesario o deseable con hormonas u otros factores de crecimiento, iones concretos (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, hidrolizados de proteínas o glucosa u otra fuente de energía. En determinadas realizaciones de la presente invención puede ser beneficioso suplementar los medios con uno o más inductores químicos tales como
45 hexametileno-bis (acetamida) ("HMBA") y/o butirato de sodio ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al comienzo del cultivo o pueden añadirse en un momento posterior con el fin de reponer los nutrientes agotados o por otra razón. Un experto en la técnica será consciente de cualquier suplemento deseable o necesario que se puede incluir en las formulaciones de los medios de la presente invención y será capaz de seleccionar qué suplementos en particular añadir en base a sus necesidades experimentales y/o de otro tipo.

50 Polipéptidos

Cualquier polipéptido que se pueda expresar en una célula huésped puede producirse de acuerdo con los procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento. El polipéptido puede expresarse a partir de un gen que es endógeno de la célula huésped o a partir de un gen heterólogo que se introduce en la célula huésped. El polipéptido puede ser uno que se produzca en la naturaleza o puede tener, como alternativa, una secuencia
55 diseñada o seleccionada por la mano del hombre. Un polipéptido que se va a producir puede ensamblarse a partir de fragmentos de polipéptidos que se producen individualmente en la naturaleza. Adicionalmente o como alternativa, el polipéptido diseñado puede incluir uno o más fragmentos que no son de origen natural.

Los polipéptidos que se pueden expresar deseablemente de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán en base a una actividad biológica o química interesante o útil. En determinadas realizaciones, los
60 procedimientos y/o composiciones de la presente invención se emplean para expresar un polipéptido terapéutico o

proteína terapéutica. Por ejemplo, la presente invención se puede emplear para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión etc farmacéuticamente o comercialmente relevantes. La siguiente lista de polipéptidos y proteínas que se pueden producir de acuerdo con la presente invención es de naturaleza meramente ejemplar y no está destinada a ser un listado limitante. Un experto en la técnica entenderá que cualquier polipéptido o proteína puede expresarse de acuerdo con la presente invención y será capaz de seleccionar el polipéptido particular que se va a producir sobre la base de sus necesidades particulares.

Factores de coagulación

Los factores de coagulación han mostrado que son eficaces como agentes comerciales y/o farmacéuticos. Dada la importancia de los factores de coagulación recombinantes en el tratamiento de enfermedades tales como la hemofilia, la optimización de la expresión de factores de coagulación producidos de forma recombinante de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la presente invención es de particular interés. Un ejemplo no limitante de un factor de coagulación que se puede producir de acuerdo con la presente invención Uno es el factor de coagulación IX (Factor IX o "FIX"). El FIX es una glicoproteína de cadena única cuya deficiencia produce hemofilia B, un trastorno en el que la sangre del que lo sufre es incapaz de coagular. Por lo tanto, cualquier pequeña herida que produzca hemorragia es potencialmente un acontecimiento que amenaza la vida.

El FIX se sintetiza como un cimógeno de una sola cadena que puede activarse en una serín proteasa de dos cadenas (Factor IXa) mediante la liberación de un péptido de activación. El dominio catalítico del Factor IXa se encuentra en la cadena pesada (véase Chang y col., J. Clin. Invest., 100: 4, 1997). El FIX tiene múltiples sitios de glicosilación, incluidos hidratos de carbono unidos a N o unidos a O. En un momento se pensó que una estructura ligada a O en la serina 61 (Sia- α 2,3-Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Fuc- α 1-O-Ser) era única del FIX, pero desde entonces se ha encontrado en algunas otras moléculas, incluidas la proteína Nocht en mamíferos y *Drosophila* (Maloney y col., Journal of Biol. Chem., 275(13), 2000). El FIX producido por células de ovario de hámster chino ("CHO") en cultivo celular exhibe cierta variabilidad en la cadena de oligosacárido Serina 61. Estas diferentes glicofomas, y otras glicofomas 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, lo que tiene como resultado una coagulación menos eficaz.

La hemofilia A, que es clínicamente indistinguible de la hemofilia B, está causada por un defecto en el factor de coagulación VIII humano, otra glicoproteína que se sintetiza como un cimógeno de cadena sencilla y después se procesa en una forma activa de dos cadenas. La presente invención también se puede emplear para controlar o alterar el patrón de glicosilación del factor de coagulación VIII con el fin de modular su actividad de coagulación. Otros factores de coagulación glucoproteicos que se pueden producir y cuyo patrón de glicosilación puede controlarse o alterarse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, entre otros, el factor tisular y el factor de von Willebrand.

Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno concreto. Dado el gran número de anticuerpos actualmente en uso o en investigación como agentes farmacéuticos u otros comerciales, la producción de anticuerpos de acuerdo con procedimientos y composiciones de la presente invención es de particular interés.

Cualquier anticuerpo que puede expresarse en una célula huésped puede usarse de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, el anticuerpo que se va a expresar es un anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Como se sabe en la técnica, un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón, rata, u otras especies, con regiones constantes humanas. Se han descrito diversos abordajes 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., LA publicación de patente europea EP171496; LA publicación de patente europea 0173494, la patente del Reino Unido GB 2177096B.

En determinadas 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 aminoácidos derivan de anticuerpos humanos, de modo que se minimiza cualquier potencial reacción inmunitaria cuando se libera a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los restos de aminoácidos en la región hipervariable se reemplazan por restos de una especie no humana que confieren una especificidad o afinidad de antígeno deseada. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento idéntica o superior a la de un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado se optimiza mediante la introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencias consenso, sustituciones de línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden producir mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la materia (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 producir de acuerdo con las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400).

5 Como solo un ejemplo no limitante, un anticuerpo que puede producirse de acuerdo con las presentes enseñanzas es un anticuerpo anti-ABeta. Los anticuerpos anti-ABeta son una potencial avenida particularmente prometedora de la terapia en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer ("EA"). La EA es una enfermedad progresiva que tiene 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). En términos generales, la enfermedad se divide en dos categorías: inicio tardío, que se produce en la vejez (más de 65 años) e inicio temprano, que se desarrolla mucho antes que el período senil, es decir, entre los 35 y los 10 60 años de edad. En ambos tipos de la enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en los casos en que comienza a una edad temprana. La enfermedad se caracteriza por al menos dos tipos de lesiones en el cerebro, marañas neurofibrilares y placas seniles. Las marañas neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau asociada a los microtúbulos que consiste en dos filamentos trenzados unos con otros en pares. Las placas seniles (es decir, placas amiloides) son áreas de neuropilo desorganizado de hasta 150 µm a través con depósitos amiloides extracelulares en el centro que son visibles mediante análisis 15 microscópico de secciones de tejido cerebral. La acumulación de placas amiloides dentro del cerebro también está asociada con el síndrome de Down y otros trastornos cognitivos.

20 El constituyente principal de las placas es un péptido denominado ABeta o péptido beta-amiloide. El péptido ABeta es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de una glucoproteína transmembrana más grande denominada proteína precursora de amiloide (APP). Como resultado del procesamiento proteolítico de la APP por diferentes enzimas secretasa, la ABeta se encuentra principalmente tanto en una forma corta, de 40 aminoácidos de longitud, como una forma larga, que tiene una longitud de 42 a 43 aminoácidos. Parte del dominio transmembrana hidrófobo de la APP se encuentra en el extremo carboxi de la ABeta y puede ser el responsable de la capacidad de la ABeta para agregarse en placas, particularmente en el caso de la forma larga. La acumulación de placas 25 amiloides en el cerebro conduce en último término a la muerte celular neuronal. Los síntomas físicos asociados con este tipo de deterioro neural caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

30 Varias mutaciones dentro de la proteína APP se han correlacionado con la presencia de EA (véase, por ejemplo, Goate y col., Nature 349: 704, 1991 (valine717 a isoleucina); Chartier Harlan y col., Nature 353: 844, 1991 (valine717 a glicina); Murrell y col., Science 254: 97.1991 (valina717 a fenilalanina); Mullan y col., Nature Genet. 1: 345.1992 (una doble mutación que cambia lisina595-metionina596 a asparagina595-leucina596). Se piensa que dichas mutaciones causan EA mediante un procesamiento aumentado o alterado de la APP a ABeta, particularmente el procesamiento de APP a cantidades mayores de la forma larga de ABeta (es decir, ABeta1-42 y ABeta1 43). Se cree que las mutaciones en otros genes, tales como los genes de la presenilina, PS1 y PS2, afectan de forma indirecta al procesamiento de la APP para generar mayores cantidades de la forma larga de ABeta (véase 35 Hardy, TINS 20: 154.1997).

40 Los modelos de ratón se han utilizado con éxito para determinar la importancia de las placas de amiloide en la EA (Games y col., citad anteriormente; Johnson-Wood y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1550, 1997). En particular, cuando a los ratones transgénicos PDAP (que expresan una forma mutante de la APP humana y desarrollan enfermedad de Alzheimer a una edad joven) se inyecta la forma larga de ABeta, muestran tanto una disminución de la progresión de la enfermedad de Alzheimer como un aumento de los títulos de anticuerpos frente al péptido ABeta (Schenk y col., Nature 400, 173, 1999). Las observaciones analizadas anteriormente indican que la ABeta, particularmente en su forma larga, es un elemento causante de la enfermedad de Alzheimer.

45 El péptido ABeta puede existir en solución y puede detectarse en el SNC (por ejemplo, en el LCR) y en el plasma. En determinadas condiciones, la ABeta soluble se transforma en formas en lámina beta, fibrilares, tóxicas que se encuentran en las placas neuríticas y los vasos sanguíneos cerebrales de los pacientes con EA. Se han investigado los tratamientos que implican inmunización con anticuerpos monoclonales contra ABeta. Se ha analizado la inmunización tanto activa como pasiva como en modelos de EA en ratón. La inmunización activa tuvo como resultado alguna reducción en la carga de placas en el cerebro, pero solo mediante administración nasal. La inmunización pasiva de ratones transgénicos PDAPP también se ha investigado (Bard, y col., Nat. Med. 6: 916 - 50 19.2000). Se encontró que los anticuerpos que reconocen los dominios amino-terminales y centrales de ABeta estimulaban la fagocitosis de los depósitos ABeta, mientras que los anticuerpos contra los dominios cercanos al dominio carboxi-terminal no lo hicieron.

55 El mecanismo de eliminación de la ABeta después de la inmunización pasiva o activa está en investigación continua. Se han propuesto dos mecanismos para la eliminación eficaz, es decir, la degradación central y la degradación periférica. El mecanismo de degradación central se basa en que los anticuerpos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, se unen a las placas e inducen la eliminación de las placas preexistentes. La eliminación ha mostrado que está estimulada por la fagocitosis mediada por el receptor Fc (Bard, y col., citado anteriormente). El mecanismo de degradación periférica de la eliminación de ABeta se basa en la alteración del equilibrio dinámico de la ABeta entre el cerebro, el LCR y el plasma tras la administración de anticuerpo, lo que da lugar al transporte de la ABeta de un compartimento a otro. La ABeta derivada centralmente se transporta al LCR y al plasma, donde se 60 degrada. Los estudios recientes han concluido que la ABeta soluble y no unida están involucrados en el deterioro de

la memoria asociado con la EA, incluso sin reducción en la deposición de amiloide en el cerebro. Se necesitan más estudios para determinar la acción y/o interacción de estas rutas para la eliminación de la ABeta (Dodel, y col., The Lancet Vol. 2: 215, 2003).

5 Los anticuerpos anti-Abeta son una ruta potencialmente prometedora de tratamiento de la EA, ya que pueden unirse a y eliminar la ABeta u otros componentes que componen las placas amiloides. Los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación pueden servir para tratar mejor la EA u otras enfermedades relacionadas mediante, por ejemplo, la unión y eliminación de componentes de placas amiloides de manera más eficaz, eliminando las placas de amiloide con menos efectos secundarios o menos graves o mediante la prevención de la formación o acumulación de las placas de amiloide. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas son anticuerpos monoclonales.

10 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen específicamente a la forma agregada de ABeta sin unirse a la forma soluble. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen específicamente a la forma soluble de anti-ABeta en condiciones en las que no se unen a la forma agregada. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen tanto a las formas agregadas como solubles. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a ABeta en las placas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas atraviesan la barrera hematoencefálica. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas reducen la carga de amiloide en un sujeto. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas reducen la distrofia neurítica en un sujeto. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta pueden mantener la arquitectura sináptica (por ejemplo, sinaptofisina).

15 De acuerdo con algunas realizaciones, los anticuerpos anti-Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a un epítipo dentro de los residuos 13-28 de ABeta (designándose el primer residuo en N terminal de la ABeta natural 1). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a un epítipo dentro de los residuos 19-22 de ABeta. En algunas realizaciones, se usan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión a diferentes epítopos anti-ABeta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo específico de un epítipo dentro de los residuos 19-22 de ABeta se coadministra con un anticuerpo específico de un epítipo fuera de los residuos 19 a 22 de ABeta. Dichos anticuerpos se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. También se pueden usar anticuerpos contra componentes amiloides distintos de ABeta (por ejemplo, administrar o coadministrar).

20 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti Abeta producidos de acuerdo con las presentes enseñanzas se unen a un epítipo de ABeta con más fuerza o con más especificidad que los anticuerpos anti-ABeta producidos de otra manera. La especificidad de epítipo de un anticuerpo puede determinarse mediante técnicas conocidas, por ejemplo, formando una biblioteca de expresión en fagos en la que diferentes miembros expresan diferentes subsecuencias de ABeta. La biblioteca de expresión en fagos puede seleccionarse después para detectar miembros que se unen específicamente a un anticuerpo en análisis. Se aísla una familia de secuencias. Típicamente, tal familia contiene una secuencia central común y diferentes longitudes de secuencias flanqueantes en diferentes miembros. La secuencia central más corta que muestra unión específica al anticuerpo define típicamente el epítipo unido por el anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, los anticuerpos pueden analizarse para determinar la especificidad de epítipo en un ensayo de competición con un anticuerpo cuya especificidad de epítipo ya se haya determinado. Por ejemplo, se considera que los anticuerpos que compiten con el anticuerpo 15C11 por la unión a ABeta se unen al mismo epítipo o similar que 15C11, es decir, dentro de los residuos ABeta 19 - 22. En determinadas realizaciones, la detección selectiva de anticuerpos para la especificidad de epítipo es un predictor útil de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, es probable que un anticuerpo que se ha determinado que se une a un epítipo dentro de los residuos 13 a 28 (por ejemplo, a Aß 19-22) de ABeta sea eficaz en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con las metodologías de la presente invención.

25 Los anticuerpos que se unen específicamente a un segmento preferido de ABeta sin unirse a otras regiones de ABeta tienen una serie de ventajas con respecto a los anticuerpos monoclonales que se unen a otras regiones, o a sueros policlonales a ABeta intacta. Entre otras cosas, para dosificaciones de igual masa, las dosificaciones de anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos contienen una dosificación molar mayor de anticuerpos eficaces en la eliminación de las placas de amiloide. Asimismo, los anticuerpos que se unen específicamente a segmentos preferidos pueden inducir una respuesta de eliminación contra depósitos de amiloide sin inducir una respuesta de eliminación contra el polipéptido APP intacto, de modo que se reduce los efectos secundarios potenciales.

30 En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos, de cadena única o humanizados descritos anteriormente pueden contener residuos de aminoácidos que no se producen de forma natural en cualquier anticuerpo en cualquier especie en la naturaleza. Estos residuos extraños se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir una especificidad, afinidad o función efectora nueva o modificada sobre el anticuerpo monoclonal, quimérico, de cadena sencilla o humanizado.

Enzimas

Otra clase de polipéptidos que han mostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que pueden producirse deseablemente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluye enzimas. Dada la importancia de las enzimas recombinantes en el tratamiento de enfermedades y otros usos comerciales y farmacéuticos, la producción de enzimas de acuerdo con la presente invención es de particular interés.

Como solo un ejemplo no limitante, una deficiencia en la glucocerebrosidasa (GCR) tiene como resultado una afección conocida como enfermedad de Gaucher, que está causada por una acumulación de glucocerebrosidasa en los lisosomas de determinadas células. Los sujetos con la enfermedad de Gaucher presentan una serie de síntomas que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trastorno esquelético, trombocitopenia y anemia. Friedman y Hayes mostraron que el GCR recombinante (r-GCR) que contiene una sola sustitución en la secuencia primaria de aminoácidos exhibía un patrón de glicosilación alterado, específicamente un aumento en los restos de fucosa y de N-acetil glucosamina en comparación con el GCR de origen natural (véase la patente de Estados Unidos número 5.549. 892).

Por tanto se contempla la producción de GCR de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. Los expertos en la técnica conocerán otras enzimas deseables que pueden producirse de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

Otra clase de polipéptidos que han mostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que pueden producirse deseablemente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluye factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Dada la importancia biológica de los factores de crecimiento y otras moléculas de señalización y su importancia como agentes terapéuticos potenciales, la producción de estas moléculas en conformidad con los procedimientos y composiciones de la presente invención es de particular interés. Los factores de crecimiento son típicamente glicoproteínas que son secretadas por las células y se unen a y activan los receptores en otras células, iniciando un cambio metabólico o en el desarrollo en la célula receptora.

Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento de mamíferos y otras moléculas de señalización incluyen citocinas; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como aFGF y bFGF; factores transformantes de crecimiento (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4, o TGF-beta 5; factor de crecimiento de 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 de tipo insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; proteínas morfogenéticas óseas (BMP); interferones tales como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (TL), por ejemplo IL-1 a IL-10; factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimulante de los folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, el factor IX, factor tisular y el factor de von Willebrand; factores anti-coagulación tales como Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; activadores de plasminógeno, tales como uroquinasa o activador de plasminógeno de tipo tisular o de orina humano (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; RANTES (regulada con la activación de linfocitos T de expresión y secreción normales); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); sustancia inhibidora muleriana; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; factores neurotróficos tal 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 nervioso, tal como NGF-beta. Un experto ordinario en la técnica conocerá otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que se pueden expresar de acuerdo con la presente invención.

Receptores

Otra clase de polipéptidos que han mostrado que son eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales y que pueden producirse deseablemente de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluye receptores. Dada la importancia biológica de los receptores y su importancia como agentes terapéuticos potenciales, la producción de estas moléculas de conformidad con los procedimientos y composiciones de la presente invención es de particular interés. Los receptores son generalmente glicoproteínas transmembrana que funcionan mediante el reconocimiento de un ligando de señalización extracelular. Los receptores a menudo tienen un dominio de proteína cinasa, además un dominio de reconocimiento del ligando. Este dominio de la proteína cinasa inicia una ruta de señalización mediante la fosforilación de moléculas diana intracelulares tras la unión del ligando, lo que conduce a cambios metabólicos o de desarrollo dentro de la célula.

En determinadas realizaciones, los inhibidores del factor de necrosis tumoral, en forma de receptores del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNFR-1; EP 417.563 publicado el 20 de marzo 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014 publicado el 20 de marzo 1991) se expresan 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 de TNF soluble. En determinadas

realizaciones, un inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un TNFR-Ig soluble. En determinadas realizaciones, los inhibidores del TNF de la presente invención son formas solubles de TNFR I y TNFR II. En determinadas realizaciones, los inhibidores del TNF de la presente invención son proteínas de unión al TNF soluble. En determinadas realizaciones, los inhibidores de TNF de la presente invención son proteínas de fusión TNFR-Ig, por ejemplo, TNFR-Fc o etanercept. Como se usa en el presente documento, "etanercept," se refiere a TNFR-Fc, que es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor de TNF- α p75, consistiendo cada molécula en una porción Fc de 235 aminoácidos de la IgG1 humana.

En determinadas realizaciones, los receptores que se producen de acuerdo con la presente invención son tirosina quinasa receptoras (RTK). La familia de las RTK incluye receptores que son cruciales para diversas funciones de numerosos tipos celulares (véase, por ejemplo, Yarden y Ullrich, Ann. Rev. Biochem. 57: 433 - 478, 1988; Ullrich y Schlessinger, Cell 61: 243 - 254, 1990). Los ejemplos no limitantes de RTK incluyen los receptores alfa y beta del factor de necrosis tumoral (TNFR-1; documento EP 417.563 publicado 20 de marzo 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014 publicado 20 de marzo 1991; para una revisión, véase Naismith and Sprang, J Inflamm. 47(1 - 2):1 - 7, 1995 - 96), miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tirosina quinasa con los dominios de homología de los receptores de inmunoglobulina y EGF 1 (TIE-1) y TIE-2 (Sato y col., Nature 376(6535):70 - 74, 1995) y el receptor de c-Met, algunos de los cuales se ha sugerido que estimulan la angiogénesis, directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, J. Cell Biol. 129: 895 - 898, 1995). Otros ejemplos no limitantes de RTK incluyen la quinasa de hígado fetal 1 (FLK-1) (en ocasiones denominada receptor que contiene el dominio de inserción de la quinasa (KDR) (Terman y col., Oncogene 6: 1677 - 83, 1991) o receptor del factor de crecimiento celular endotelial vascular 2 (VEGFR-2)), tirosina quinasa 1 de tipo fms (Flt-1) (DeVries y col., Science 255:989 - 991, 1992; Shibuya y col., Oncogene 5: 519 - 524, 1990), en ocasiones denominado receptor 1 del factor de crecimiento celular endotelial vascular 1 (VEGFR-1), neuropilina-1, endogлина, endosialina y Axl. Los expertos en la técnica conocerán otros receptores que se pueden expresar de acuerdo con determinados procedimientos y composiciones de la presente invención.

En determinadas realizaciones, el receptor que se va a producir de acuerdo con la presente invención es un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Los CPGR son un objetivo importante para el desarrollo de los fármacos. De hecho, los receptores han conducido a más de la mitad de los fármacos actualmente conocidos (Drews, Nature Biotechnology, 14: 1516, 1996) y los GPCR representan el objetivo más importante para la intervención terapéutica siendo un 30 % de los fármacos prescritos clínicamente agonistas o antagonistas de un GPCR (Milligan, G. y Rees, S., TIPS, 20: 118 - 124, 1999). Dado que estos receptores tienen un historial establecido probado como dianas terapéuticas, la producción de GPCR de acuerdo con la presente invención también es de particular interés.

Los GPCR son proteínas que tienen siete dominios transmembrana. Tras la unión de un ligando a un GPCR, se transduce una señal dentro de la célula que se traduce en un cambio en una propiedad biológica o fisiológica de la célula. Los GPCR, junto con las proteínas G y los efectores (enzimas intracelulares y canales que están modulados por proteínas G), son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de segundos mensajeros intracelulares a las entradas extracelulares. Estos genes y productos génicos son posibles agentes causantes de enfermedad.

La superfamilia de proteínas GPCR contiene ahora más de 250 tipos de parálogos, receptores que representan variantes generadas por duplicaciones de genes (u otros procesos), en oposición a los ortólogos, del mismo receptor de diferente especie. La superfamilia se puede dividir en cinco familias: Familia I, receptores tipificados por la rodopsina y el receptor beta2-adrenérgico y actualmente representada por más de 200 miembros únicos; familia II, la recién caracterizada familia de los receptores de hormona paratiroidea/calcitonina/ secretina; familia III, la familia de receptores de glutamato metabotrópicos en mamíferos; familia IV, la familia del receptor de AMPc, importante en la quimiotaxis y desarrollo de *D. discoideum*; familia V, los receptores de feromonas de apareamiento de hongos, tales como STE2.

Los GPCR incluyen receptores de aminas biogénicas, de mediadores lipídicos de la inflamación, de hormonas peptídicas y mediadores de señales sensoriales. El GPCR se activa cuando el receptor se une a su ligando extracelular. Los cambios conformacionales en el GPCR, que son el resultado de la interacción ligando-receptor, afectan a la afinidad de unión de una proteína G a los dominios intracelulares de GPCR. Esto permite que el GTP se una con una mayor afinidad a la proteína G.

La activación de la proteína G por GTP conduce a la interacción de la subunidad α de la proteína G con la adenilato ciclasa u otros generadores de moléculas de segundo mensajero. Esta interacción regula la actividad de la adenilato ciclasa y, por lo tanto, la producción de una molécula de segundo mensajero, AMPc. El AMPc regula la fosforilación y la activación de otras proteínas intracelulares. Como alternativa, los niveles celulares de otras moléculas de segundo mensajero, tales como GMPc o eicosinoides, pueden regularse por aumento o regularse por disminución mediante o la actividad de los GPCR. La subunidad α de la proteína G se desactiva mediante la hidrólisis del GTP por la GTPasa y las subunidades α , β y γ se reasocian. Después, las proteínas G heterotriméricas se disocian de la adenilato ciclasa u otro generador de molécula de segundo mensajero. Actividad de GPCR también puede regularse mediante la fosforilación de los dominios o bucles intra y extracelulares.

Los receptores de glutamato forman un grupo de GPCR que son importantes en la neurotransmisión. El glutamato es el principal neurotransmisor en el SNC y se cree que tiene un papel importante en la plasticidad neuronal, la cognición, la memoria, el aprendizaje y en algunos trastornos neurológicos tales como epilepsia, accidente cerebrovascular 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 intestinal vasoactivo (VIP) es un grupo de polipéptidos relacionados cuyas acciones también están mediadas por GPCR. Los miembros clave de esta familia son el propio VIP, la secretina y el factor de liberación de la hormona de crecimiento (GRF). El VIP tiene un amplio perfil de acciones fisiológicas, que incluyen relajación de los músculos lisos, estimulación o inhibición de la secreción en varios tejidos, modulación de diversas actividades celulares inmunitarias y diversas actividades inhibitorias y excitatorias en el SNC. La secretina estimula la secreción de enzimas e iones en el páncreas y el intestino, y también está presente en pequeñas cantidades en el cerebro.

En general, los profesionales de la presente invención seleccionarán su polipéptido de interés y conocerán su secuencia de aminoácidos precisa. Cualquier proteína dada que se va a expresar de acuerdo con la presente invención tendrá sus propias características particulares y puede influir en la densidad o la viabilidad celular de las células cultivadas, y puede expresarse a niveles más bajos que otro polipéptido o proteína cultivados en condiciones de cultivo idénticas. Un experto en la técnica será capaz de modificar apropiadamente los medios y procedimientos de la invención descritos en el presente documento con el fin de optimizar el crecimiento celular y/o la producción de cualquier polipéptido o proteína expresado dado.

Introducción de genes para la expresión de polipéptido en las células huésped

En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico introducido en la célula codifica el polipéptido deseado que se va a expresar de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico puede codificar un producto génico 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. Como alternativa o adicionalmente, la molécula de ácido nucleico introducida puede aumentar la traducción o la estabilidad de un polipéptido expresado por la célula.

Los procedimientos adecuados para la introducción de ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de un polipéptido de interés en células huésped de mamífero se conocen 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., documentos EP 117.060 y EP 117.058. Para las células de mamíferos, los procedimientos habituales de introducción de material genético en la célula incluyen el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham and van der Erb, Virology, 52: 456 - 457, 1978 o lipofectamine™ (Gibco BRL) Method of Hawley-Nelson, Focus 15: 73, 1993. Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos han sido descritos por Axel en la patente de EE.UU. Nº 4.399.216 expedida el 16 de agosto de 1983. Para varias técnicas para introducir material genético en células de mamíferos, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 185: 527 - 537, 1990, y Mansour y col., Nature, 336: 348 - 352, 1988.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que se ha introducido está en forma de una molécula de ácido nucleico desnuda. En algunos aspectos de estas realizaciones, la molécula de ácido nucleico introducida en una célula consiste sólo en el ácido nucleico que codifica el polipéptido y los elementos de control genéticos necesarios. En algunos aspectos de estas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el polipéptido (incluyendo los elementos reguladores necesarios) está contenido dentro de un vector plásmido. Los ejemplos no limitantes representativos de vectores adecuados para la expresión de polipéptido en las células de mamíferos incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, y col., Mol. Cell Biol. 5: 1136 - 1142, 1985; pMCIneo Poli-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 determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que se introduce en una célula está contenida dentro de un vector viral. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido puede insertarse en el genoma viral (o un genoma viral parcial). Los elementos reguladores que dirigen la expresión del polipéptido pueden incluirse con el ácido nucleico insertado en el genoma viral (es decir, unido al gen insertado en el genoma viral) o puede estar proporcionado por el propio genoma viral.

El ADN desnudo puede introducirse en las células mediante la formación de un precipitado que contiene el ADN y fosfato de calcio. Adicionalmente o como alternativa, el ADN desnudo también se puede introducir en las células mediante la formación de una mezcla de ADN y de DEAE-dextrano y la incubación de la mezcla con las células o mediante la incubación de las células y el ADN juntos en un tampón apropiado y sometiendo las células a un pulso eléctrico de alta tensión (es decir, mediante electroporación). En algunas realizaciones, el ADN desnudo se introduce en las células mezclando el ADN con una suspensión de liposomas que contienen lípidos catiónicos. A continuación, el complejo de ADN/liposoma se incuba con las células. El ADN desnudo también se puede inyectar directamente en las células mediante, por ejemplo, microinyección.

Adicionalmente o como alternativa, el ADN desnudo se puede introducir en las células mediante la formación de complejos de ADN con un catión, tal como polilisina, que se acopla a un ligando para un receptor de superficie celular (véase, por ejemplo, Wu, G. and 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. Nº 5.166.320). La unión del complejo ADN-ligando al receptor facilita la

captación del ADN mediante endocitosis mediada por receptor.

El uso de vectores virales que contienen secuencias particulares de ácidos nucleicos, por ejemplo, un ADNc que codifica un polipéptido, es un enfoque frecuente para la introducción de secuencias de ácido nucleico en una célula. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de células reciben el ácido nucleico, que puede obviar la necesidad de la selección de células que han recibido el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector viral, generalmente se expresan de manera eficiente en las células que han captado el ácido nucleico del vector viral.

Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia génica para fines de terapia génica (para una revisión véase, Miller, A.D., *Blood* 76: 271, 1990). Se puede construir un retrovirus recombinante que tiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés insertado en el genoma retroviral. Adicionalmente, las porciones del genoma retroviral se pueden eliminar para hacer que la replicación del retrovirus sea defectuosa. El retrovirus de replicación defectuosa se empaqueta después en viriones que pueden usarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas estándar.

El genoma de un adenovirus puede manipularse de un modo tal que codifique y exprese un polipéptido de interés, pero que esté inactivado en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral 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. Vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa 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 requieren que las células en división sean vehículos de liberación génica eficaces y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluyendo el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld y col., 1992, citado anteriormente), células endoteliales (Lemarchand y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6482 - 6496, 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 extraño contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula huésped sino que permanece episomal, evitando de este modo problemas potenciales que pueden producirse como resultado de mutagénesis por inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Por otra parte, la capacidad portadora del genoma adenoviral para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de liberación génica (Berkner y col., citado anteriormente, Haj-Ahmand y Graham, *J. Virol.* 57: 267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales de replicación defectuosa actualmente en uso se eliminan para todos o parte de los genes virales E1 y E3, pero retienen tanto como 80 % del material genético adenoviral.

El virus adenoasociado (VAA) es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus herpes, como virus auxiliar para que la replicación sea eficiente y tener 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 están en división y exhibe 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; and McLaughlin y col., *J. Virol.* 62: 1963 - 1973, 1989). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de VAA pueden empaquetarse y pueden integrarse. El espacio para el ADN exógeno se limita a aproximadamente 4,5 kb. Un vector VAA tal como el descrito en Tratschin y col., (*Mol. Cell. Biol.* 5: 3251 - 3260, 1985) puede usarse para introducir ADN en las células. Se han usado diversos ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores de VAA (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 utilizado para introducir moléculas de ácido nucleico en una población de células tiene como resultado la modificación de una gran proporción de las células y la expresión eficaz del polipéptido por las células, la población modificada de células puede usarse sin más aislamiento o subclonación de las células individuales dentro de la población. Es decir, puede haber suficiente producción del polipéptido por la población de células de tal manera que no se necesita ningún aislamiento más de células y la población puede usarse inmediatamente para sembrar un cultivo de células para la producción del polipéptido. En algunas realizaciones, puede ser deseable aislar y expandir una población homogénea de células de una única célula que produzca de manera eficiente el polipéptido.

Como alternativa a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula que codifica un polipéptido de interés, un ácido nucleico introducido puede codificar otro polipéptido, proteína o elemento regulador que induzca o aumente 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 en particular, pero es posible que no lo pueda hacer sin tratamiento adicional de la célula. Del mismo modo, la célula puede expresar cantidades insuficientes del polipéptido para el propósito deseado. Por lo tanto, un agente que estimula la expresión del polipéptido de interés puede usarse para inducir o aumentar la expresión de ese polipéptido por la célula. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico introducido puede codificar un factor de transcripción que activa o regula por aumento la transcripción del polipéptido

de interés. La expresión de un factor de transcripción de este tipo a su vez conduce a la expresión, o la expresión más sólida, del polipéptido de interés. Del mismo modo, la molécula de ácido nucleico introducido puede contener uno o más elementos reguladores que valoran uno o más represores transcripcionales a partir de una región reguladora del polipéptido de interés.

- 5 En determinadas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión del polipéptido se introduce de forma estable en la célula huésped. En determinadas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión del polipéptido se introduce de forma transitoria en la célula huésped. Un experto en la técnica será capaz de elegir si introducir de manera estable o transitoria el ácido nucleico en la célula sobre la base de sus necesidades experimentales.
- 10 Un gen que codifica el polipéptido de interés puede opcionalmente estar ligado 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, se puede usar un elemento de control genético que proporciona expresión inducible de un gen que codifica el polipéptido de interés. El uso de un elemento inducible de control genético (por ejemplo, un promotor inducible) permite la modulación de la producción del polipéptido en la célula. Ejemplos no
- 15 limitantes de elementos de control genético inducibles potencialmente útiles para el uso en las 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 sintéticos reglados por ligando (véase, por ejemplo, Spencer, D.M. y col., Science 262: 1019 - 1024, 1993) y elementos regulados por radiación ionizante (véase, por ejemplo, Manome, Y. y col., Biochemistry 32: 10607 - 10613, 1993; Datta, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10149 - 10153, 1992). Se
- 20 pueden usar sistemas reguladores específicos de células y de otros tipos conocidos en la técnica pueden utilizarse de acuerdo con los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento.

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

25 Aislamiento del polipéptido expresado

En determinadas realizaciones, es deseable aislar y/o purificar proteínas o polipéptidos expresados de acuerdo con la presente invención. En determinadas realizaciones, un polipéptido o proteína expresado se secreta al medio y, por tanto, las células y otros sólidos pueden eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, como una primera etapa en el proceso de purificación.

- 30 En algunas realizaciones, un polipéptido o proteína expresado está unido a la superficie de la célula huésped. En tales realizaciones, se retira el medio y las células huésped que expresan el polipéptido o proteína se lisan como una primera etapa en el proceso de purificación. La lisis de células huésped de mamíferos se puede lograr mediante cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo la alteración física por perlas de vidrio y la exposición a condiciones de pH alto.
- 35 El polipéptido o proteína pueden aislarse y purificarse mediante procedimientos estándar, incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, de exclusión por tamaño, y de 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. y Hames, B.D. (eds.), Protein Expression: A
- 40 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). Para la cromatografía de inmunoafinidad en particular, la proteína se puede aislar mediante la unión a una columna de afinidad que comprende anticuerpos producidos contra esa proteína y fijados a un soporte estacionario. Como alternativa, los marcadores afinidad, tales como una secuencia de recubrimiento de influenza, poli-histidina, o
- 45 glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína mediante técnicas recombinantes estándar para permitir la purificación fácil mediante el paso sobre la columna de afinidad apropiada. Un experto en la técnica conocerá otros marcadores de afinidad útiles para aislar el polipéptido expresado. Los inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina pueden añadirse en cualquiera o en todas las etapas a fin de reducir o eliminar la degradación del polipéptido o proteína durante el proceso de purificación. El uso
- 50 de inhibidores de la proteasa a menudo es ventajoso cuando las células deben lisarse con el fin de aislar y purificar el polipéptido o proteína expresado.

Un experto en la técnica apreciará que la técnica exacta de purificación puede variar dependiendo de la naturaleza del polipéptido o proteína a purificar, de la naturaleza de las células a partir de las que se expresa el polipéptido o proteína y la composición del medio en el se cultivaron las células.

55 Composiciones inmunogénicas

Las proteínas o polipéptidos producidos de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación también se pueden usar en composiciones inmunogénicas, por ejemplo, como vacunas. En general, la selección de la "cantidad eficaz" apropiada o la dosis para los componentes de una o más composiciones inmunogénicas de la invención

(normalmente se basa en diversos factores, incluidos, pero no limitados a, la identidad del o los polipéptidos seleccionados en la composición inmunogénica empleada, el patrón de glicosilación del o los polipéptidos y el estado físico del sujeto, más especialmente incluyendo la salud general, la edad y el peso del sujeto inmunizado. Como se sabe en la técnica, los procedimientos y vías de administración particulares y la presencia de componentes adicionales en las composiciones inmunogénicas también pueden afectar a las dosis y cantidades de las composiciones de plásmido de ADN. Dicha selección y ajuste al alza o a la baja de la dosis efectiva está dentro de la experiencia de la técnica. La cantidad de composición inmunogénica requerida para inducir una respuesta inmunológica, incluyendo, aunque sin limitaciones, una respuesta protectora, o producir un efecto exógeno en el paciente sin efectos secundarios adversos significativos varía dependiendo de estos factores. Los expertos en la técnica determinarán fácilmente dosis adecuadas.

Determinadas composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden contener un adyuvante. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o antígeno. Numerosas citocinas o linfocinas han mostrado que tienen actividad moduladora inmunitaria y, por lo tanto, pueden usarse como adyuvantes, incluidas, entre otras, las interleucinas 1- α , β -1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones- α , β y γ , el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.078.996), el factor estimulante de colonias de macrófagos, el factor estimulante de colonias de granulocitos, GSF, y los factores de necrosis tumoral α y β . Aún otros adyuvantes útiles en esta invención incluyen una quimiocina, incluidas, sin limitaciones, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , y RANTES. Las moléculas de adhesión, tales como una selectina, por ejemplo, L-selectina, P-selectina y E-selectina, también pueden ser útiles como adyuvantes. Aún otros adyuvantes útiles incluyen, sin limitaciones, una molécula similar a la mucina, por ejemplo, CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de las 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 coestimuladoras tales como CD40 y CD40L, factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento vascular, el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1, y el factor de crecimiento endotelial vascular, moléculas receptoras incluidas Fas, el receptor del 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 más incluye caspasa (ICE). Véase, también las publicaciones de patente internacional n° WO94/17799 y WO94/43839.

También son útiles como adyuvantes las toxinas del cólera (TC) y mutantes de las mismas, incluyendo los descritos en la solicitud de patente Internacional publicada número WO 00/18434 (en el que el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se sustituye por otro aminoácido (distinto de ácido aspártico, para ejemplo una histidina). En la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098368 (en la que la isoleucina en la posición de aminoácido 16 está sustituida por otro aminoácido, solo o en combinación con la sustitución de la serina en la posición de aminoácido 68 por otro aminoácido; y en la que la valina en la posición de aminoácido 72 se sustituye por otro aminoácido) se describen TC similares o mutantes. Otras toxinas TC se describen en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098369 (en la que la arginina en la posición de aminoácido 25 se sustituye por otro aminoácido; y/o un aminoácido se inserta en la posición aminoacídica 49; y/o dos amino ácidos se insertan en las posiciones de aminoácidos 35 y 36).

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas de la presente invención se administran a un ser humano o a un vertebrado no humano a través de diversas rutas incluyendo, entre otras, 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 ruta adecuada se puede seleccionar dependiendo de la naturaleza de la composición inmunogénica utilizada, una evaluación de la edad, el peso, el sexo y la salud general del paciente y de los antígenos presentes en la composición inmunogénica, y/o otros factores conocidos por aquellos de ordinaria expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones, las composiciones inmunogénicas se administran en varias veces. El orden de administración de la composición inmunogénica y los períodos de tiempo entre las administraciones individuales pueden ser seleccionados por un experto en la técnica basándose en factores relevantes conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, entre otros, las características físicas y las respuestas precisas del huésped a la aplicación del procedimiento.

Formulaciones farmacéuticas

En determinadas realizaciones, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones de la invención como se ha descrito anteriormente se pueden administrar a un sujeto o pueden formularse primero para la liberación mediante cualquier vía disponible, incluyendo, entre otras, las vías parenteral, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, oral, bucal, sublingual, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen típicamente un polipéptido o proteína purificado expresado a partir de una línea celular de mamífero, un agente de liberación (es decir, un polímero catiónico, un péptido transportador molecular, tensioactivo, etc., como se ha descrito anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable"

incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. En las composiciones también pueden incorporarse en composiciones de la presente invención. Por ejemplo, una proteína o polipéptido producido de acuerdo con la presente invención se pueden conjugar con fármacos para la farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica y radionúclidos (véase, por ejemplo, Kunz y col., Calicheamicin derivative-carrier conjugates, documento US20040082764 A1). Los ingredientes adicionales útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, deslizantes, adyuvantes de compresión, aglutinantes, agentes disgregantes de comprimidos, materiales de encapsulación, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes espesantes, agentes colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores, o sus combinaciones.

Como alternativa o adicionalmente, una proteína o polipéptido producido de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en combinación con (simultáneamente o secuencialmente) uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Una lista de ejemplos de estos agentes farmacéuticamente activos se puede encontrar en el Physicians' Desk Reference, 55 Edición, publicado por Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ, 2001. Para muchos de estos agentes mencionados, las dosis y regímenes farmacéuticamente efectivos son conocidos en la técnica; muchos se presentan en el propio 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 aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, deslizantes, adyuvantes de compresión, aglutinantes o agentes de disgregación de comprimidos o un material de encapsulación. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión o resinas de intercambio iónico, o combinaciones de los mismos. En las composiciones farmacéuticas en polvo, el vehículo puede ser un sólido finamente dividido que está mezclado con el ingrediente activo finamente dividido. En los comprimidos, el ingrediente activo generalmente se mezcla con el vehículo que tiene las necesarias propiedades de compresión en proporciones adecuadas y, opcionalmente, otros aditivos, y se compacta en la forma y el tamaño deseados.

Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener el polipéptido o proteína expresado de acuerdo con la presente invención y uno o más vehículos líquidos para formar soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires, o composiciones presurizadas. 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 farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores, o combinaciones de los mismos. Si la formulación líquida es para uso pediátrico, en general es deseable evitar la inclusión de, o limitar la cantidad de, alcohol.

Los ejemplos de vehículos líquidos adecuados para administración oral o parenteral incluyen agua (que contiene opcionalmente aditivos tales como derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa sódica), alcoholes o sus derivados (incluyendo alcoholes monohídricos o alcoholes polihídricos tales como glicoles) o aceites (por ejemplo, aceite de coco y aceite de cacahuete fraccionados). Para la administración parenteral, el vehículo puede ser también un éster oleoso, tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. El vehículo líquido para composiciones presurizadas puede ser hidrocarburos halogenados u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

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

En determinadas realizaciones, se formula una composición farmacéutica de modo que sea compatible con su vía de administración prevista. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenes; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable normalmente incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución fisiológica salina, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina

tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. De forma ventajosa, determinadas formulaciones farmacéuticas son estables en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a 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, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenes, clorobutanol, 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 efectuar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del polipéptido o proteína purificado en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del polipéptido o proteína purificado expresado en una línea de células de mamífero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación ventajosos son secado al vacío y liofilización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar.

Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el fin de la administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificado se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo líquido, por ejemplo para usar como colutorio. Se pueden incluir como parte de la composición compuestos de unión o materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz, un lubricante tal como estearato de magnesio o esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato metílico o sabor a naranja. Tales preparaciones pueden ser formulaciones líquidas o masticables o materiales alimentarios o líquidos si es deseable, por ejemplo para facilitar la administración a niños, a individuos cuya capacidad para tragar comprimidos esté comprometida, o a animales. Las formulaciones para administración oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad en el tracto gastrointestinal y/o para mejorar la absorción.

Para la administración por inhalación, las composiciones de la invención comprenden un polipéptido o proteína purificado expresado a partir de una línea celular de mamífero y un agente de liberación también se pueden administrar por vía intranasal o mediante inhalación y se liberan convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización de aerosol a partir de un recipiente presurizado, 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 TM) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA TM), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula la cual administra una cantidad medida, por ejemplo una cantidad terapéuticamente eficaz. La presente invención contempla particularmente la liberación composiciones de la invención utilizando un pulverizador nasal, inhalador, u otra liberación directa a la las vías respiratorias altas y/o bajas. La administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra los virus de gripe ha mostrado que induce respuestas de células T CD8, lo que indica que por lo menos algunas células en el tracto respiratorio pueden captar ADN cuando se liberan por esta vía y los agentes de liberación la invención potenciarán la captación celular. De acuerdo con determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado expresado a partir de una línea celular de mamífero y un agente de liberación se formulan como grandes partículas porosas para la administración en aerosol.

Las formas de dosificación de liberación modificada y pulsátil pueden contener excipientes que actúan como modificadores de la velocidad de liberación, que están recubiertos y/o incluidos en el cuerpo del dispositivo. Los modificadores de la tasa de liberación incluyen, pero no limitados exclusivamente a ellos, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa, acetato de celulosa, óxido de polietileno, goma xantana, carbómero, copolímero de metacrilato amónico, aceite de ricino hidrogenado, cera de carnauba, cera de parafina, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico y mezclas de los mismos. Las formas de dosificación oral de liberación modificada y de 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 dentro de la forma de dosificación, es decir dentro de la matriz, y/o sobre la forma de dosificación, es decir sobre la superficie o recubrimiento.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración

transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. En general, estos penetrantes se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales de bilis y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el polipéptido o proteína purificado y los agentes de liberación pueden formularse con una pomada adecuado que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera de emulsión y agua. Como alternativa, pueden formularse con una loción o crema adecuada, suspendidas o disueltas en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, ésteres cetílicos, cera, alcohol estearílico, 2-octildeodecanol, alcohol bencílico y agua.

Como alternativa, los compuestos se pueden administrar en forma de un supositorio o pesario o pueden aplicarse tópicamente en forma de un gel, hidrogel, loción u otros glicéridos, solución, crema, pomada o polvo para espolvorear.

En algunas realizaciones, las composiciones se preparan con vehículos que protegerán el polipéptido o proteína frente a la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de liberación microencapsulada. En general, las composiciones de la invención pueden formularse para liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada, o controlada. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales adecuados también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones de liposomas (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) también se pueden usar transportadores farmacéuticamente aceptables. Éstos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.522.811.

Las proteínas y polipéptidos producidos de acuerdo con la presente invención también pueden usarse en combinación con una ciclodextrina. Se sabe que las ciclodextrinas forman complejos de inclusión y de no inclusión con determinadas moléculas. La formación de un complejo de ciclodextrina puede modificar la solubilidad, el índice de disolución, la biodisponibilidad y/o la propiedad de estabilidad de una proteína o polipéptido. En general, los complejos fármaco-ciclodextrina son útiles para la mayoría de las formas farmacéuticas y vías de administración. Como alternativa a la formación de complejos directos con la proteína o polipéptido, la ciclodextrina puede usarse como aditivo auxiliar, p. ej., como un transportador, diluyente o solubilizante. Las alfa, beta y gamma-ciclodextrinas son los más utilizados y los ejemplos adecuados se describen en las solicitudes internacionales de patentes publicadas WO91/11172, WO94/02518 y WO98/55148.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se proporcionan en forma de dosificación unitaria, tales como comprimidos o cápsulas. Puede ser ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. En dicha forma, la composición se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del polipéptido o proteína. Las formas de dosificación unitaria pueden ser composiciones envasadas, por ejemplo polvos envasados, viales, ampollas, jeringas precargadas o bolsitas que contienen líquidos. La forma de dosificación unitaria puede ser, por ejemplo, una cápsula o comprimido, o puede ser un número adecuado de cualquiera de estas formas envasadas. Como un experto en la técnica reconocerá, la dosificación unitaria terapéuticamente eficaz dependerá de varios factores, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento de administración, la potencia del polipéptido o proteína, y/o el peso del receptor y las identidades de otros componentes en la composición farmacéutica.

Un polipéptido o proteína expresado de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a diversos intervalos y durante diferentes períodos de tiempo según se requiera, por ejemplo, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, entre 2 y 8 semanas, entre aproximadamente 3 y 7 semanas, aproximadamente 4, 5, o 6 semanas, etc. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, incluyendo, entre otros, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los 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 como se describe en el presente documento puede comprender un tratamiento único o una serie de tratamientos. Se entiende además que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y pueden opcionalmente adaptarse al receptor particular, por ejemplo, a través de la administración de dosis crecientes hasta que se logra una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular puede depender de varios factores, incluyendo la actividad del polipéptido o proteína específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo 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 la actividad a modular.

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden incluir en un contenedor, envase o dispensador junto con instrucciones de administración.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el crecimiento celular de células α -GDF-8 en placas de cultivo

5 **Introducción:** El lactato es un inhibidor conocido del crecimiento celular en cultivo celular (véase Lao y Toth, Biotechnology. Prog. 13(5): 688 - 691, 1997). La disminución de la cantidad de glucosa en el cultivo celular conduce a una disminución concomitante en la cantidad de lactato producido. La 2-desoxiglucosa es un análogo estructural de la glucosa en el que el grupo hidroxilo en la posición 2' del azúcar está sustituida por un resto de hidrógeno. Roth y col., han demostrado que la 2-desoxiglucosa reduce flujo de glucosa/energía cuando se alimenta a ratas sin disminuir su ingesta total de alimentos (Annals of the New York Academy of Sciences, 928: 305 - 15, 2001). En este ejemplo, se realizaron experimentos para determinar si la adición de 2-desoxiglucosa al cultivo de células de mamífero era perjudicial para el crecimiento de las células en las placas de cultivo.

15 **Materiales y procedimientos:** Las células de ovario de hámster chino ("CHO") diseñadas para expresar un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento y diferenciación 8 ("células α -GDF-8 ") (véase Veldman y col., Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor, US20040142382 A1) se cultivaron en placas de cultivo en medio 1 suplementado con glucosa a una concentración inicial final de 9 g/l con concentraciones variables de 2-desoxiglucosa. La Tabla 1 muestra la composición del medio 1.

Tabla 1. Composición del medio 1.

Aminoácidos	mg/l	mM	Sales inorgánicas	mg/l	mM
alanina	17,80	0,20	CaCl ₂	116,09	1,05
arginina	347,97	2,00	KCl	311,77	4,18
asparagina•H ₂ O	75,00	0,50	Na ₂ HPO ₄	0,00	0,00
ácido aspártico	26,20	0,20	NaCl	70,99	0,50
cisteína•HCl•H ₂ O	70,19	0,40	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	5539	94,85
cisteína-2HCl	62,25	0,20	MgSO ₄	62,49	0,45
ácido glutámico	29,40	0,20	MgSO ₄ •7H ₂ O	48,83	0,41
Glutamato monosódico			MgCl ₂	0,00	0,00
glutamina	1163,95	7,98	NaHCO ₃	28,61	0,30
glicina	29,00	0,40			
Histidina•HCl•H ₂ O	46,00	0,22			
isoleucina	105,00	0,80	Selenito sódico	5,00	28,92
leucina	105,00	0,80	Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	50,00	123,75
lisina•HCl	145,99	0,80	CuSO ₄	0,80	5,00
metionina	29,80	0,20	CuSO ₄ •5H ₂ O	0,00	0,00
fenilalanina	65,99	0,40	FeSO ₄ •7H ₂ O	839,96	3021
prolina	68,99	0,60	ZnSO ₄ •7H ₂ O	429,96	1498
serina	126,00	1,20			
treonina	95,00	0,80	Otros componentes	mg/l	µM
triptófano	16,00	0,08	Hidrocortisona	0,04	0,10
tirosina•2Na•2H ₂ O	103,80	0,40	Putrescina•2HCl	1,08	6,70
valina	93,99	0,80	ácido linoleico	0,04	0,14
			Ácido tioóctico	0,10	0,49
Vitaminas	mg/l	µM	D-glucosa (Dextrosa)	6150	34170
biotina	0,20	0,82	PVA	2400	
Pantotenato cálcico	2,24	4,71	Nucelina	10,00	

Aminoácidos	mg/l	mM	Sales inorgánicas	mg/l	mM
Cloruro de colina	8,98	64,60	Piruvato sódico	55,00	499,95
Ácido fólico	2,65	6,01			
inositol	12,60	69,99			
nicotinamida	2,02	16,56			
piridoxal•HCl	2,00	9,85			
piridoxina•HCl	0,03	0,15			
riboflavina	0,22	0,59			
tiamina•HCl	2,17	6,44			
vitamina B12	0,78	0,58			

Resultados y conclusión: Las tasas de crecimiento específicas de las células α -GDF-8 en placas de cultivo celular se muestran en la Figura 1. Las células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa exhibió una tasa específica de crecimiento (" μ ") de aproximadamente 0,03 l/h . La adición de cantidades crecientes de 2-desoxiglucosa redujo la tasa de crecimiento específico de una manera dependiente de la dosis. Por ejemplo, las células cultivadas en presencia de 1 g/l de 2-desoxiglucosa (una proporción 2-desoxiglucosa:glucosa de 1:9) exhibió una tasa de crecimiento específico de poco más de 0,02 l/h mientras que las células cultivadas en presencia de 2,5 g/l de 2-desoxiglucosa exhibió una tasa de crecimiento específico de aproximadamente 0,015 l/h, aproximadamente la mitad que la de las células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa. Así pues, parece que la presencia de 2-desoxiglucosa inhibe el crecimiento celular y que una proporción entre 2-desoxiglucosa y glucosa superior a aproximadamente 1 a 9 reduce la tasa de crecimiento específica a un nivel por debajo de la mitad del observado en ausencia de 2-desoxiglucosa.

Ejemplo 2: Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el lactato de células α -GDF-8 en placas de cultivo

Introducción: El ejemplo 1 demostró que los cultivos de células cultivadas en placas de cultivo toleraron la 2-desoxiglucosa bien cuando se proporcionaba a concentraciones bajas. En este ejemplo, se realizaron experimentos para probar si la presencia de 2-desoxiglucosa tuvo un efecto sobre la acumulación de lactato en cultivos de células cultivadas en placas de cultivo.

Materiales y procedimientos: Las células α -GDF-8 se cultivaron en placas de cultivo en Medio 1 que contiene aproximadamente 6 g/l de glucosa con concentraciones variables de 2-desoxiglucosa. Algunos cultivos de α -GDF-8 se suplementaron opcionalmente con glucosa hasta una concentración inicial final de 9 g/l. Las células se pasaron dos veces y se cultivaron durante tres días después de cada paso. Al final de tres días cada uno de los cultivos pasados se midió para determinar la viabilidad, la densidad celular, los niveles de glucosa, los niveles de lactato y el título de α -GDF-8. Se calcularon la tasa de producción de titulación específica (" Q_p ") y la velocidad de captación de lactato específica (" Q_{lact} "). Q_{lact} se calculó del siguiente modo: ((nivel de lactato final - nivel inicial de lactato)/(densidad celular final - densidad celular inicial)) x tasa de crecimiento x 24, donde los niveles de lactato se miden en g/l, las densidades celulares se miden en 10^6 células/ml, la tasa de crecimiento se mide como l/h, y el Q_{lact} final se calcula como mg/e6/día. Q_p se calculó del siguiente modo: ((título final - título inicial)/(densidad celular final - densidad celular inicial)) x tasa de crecimiento x 24, donde el título se mide en mg/l; la densidad celular se mide en 10^6 células/ml, la tasa de crecimiento se mide como l/h y la Q_p se calcula como μ g/e6/día.

Resultados: La tabla 2 muestra las densidades celulares iniciales y finales, la viabilidad, las concentraciones finales de glucosa y lactato, la tasa específica de crecimiento, título, Q_{lact} y Q_p de los dos cultivos celulares a pasas α -GDF-8. Como puede verse, la viabilidad de las células no está afectada en gran medida por la presencia de 2-desoxiglucosa en el cultivo celular, por lo menos hasta una proporción entre 2-desoxiglucosa y glucosa de 1 a 6 (Tabla 2, columna marcada como "viab"). Sin embargo, la tasa de crecimiento específico de las células se ve afectada negativamente por la presencia de 2-desoxiglucosa de forma dependiente de la dosis (Tabla 2, columnas marcadas como " μ "). Los cultivos de control de los pases primero y segundo exhiben una tasa de crecimiento específico de 0,032 y 0,037, respectivamente, mientras que los cultivos cultivados en la presencia de 1 g/l de 2-desoxiglucosa exhiben tasas de crecimiento específico de 0,027 (primer pase, 9 g/l de glucosa), 0,028 (segundo pase, 9 g/l de glucosa) y 0,027 (segundo pase, 6 g/l de glucosa). Por lo tanto, similar a los resultados observados en el Ejemplo 1, la presencia de 2-desoxiglucosa en el cultivo celular inhibe la tasa de crecimiento específica.

La presencia de 2-desoxiglucosa en el cultivo celular también redujo la acumulación de lactato en el cultivo de una manera dependiente de la dosis. Como se muestra en la Tabla 2 (columna marcada como "lact"), en el primer pase, el lactato se acumuló el cultivo de control que carece de 2-desoxiglucosa hasta un nivel de 1,88 g/l, mientras que en presencia de 1 g/l de 2-desoxiglucosa (con 9 g/l de glucosa), el lactato solamente se acumuló a un nivel de 0,9 g/l. Del mismo modo, en el segundo pase, el lactato se acumuló en el cultivo de control que carece de 2-desoxiglucosa a

un nivel de 2,39 g/l, mientras que en presencia de 1 g/l de 2-desoxiglucosa, el lactato solamente se acumuló a un nivel de 0,98 g/l (con 9 g/l de glucosa) o 0,68 g/l (con 6 g/l de glucosa). Además, como puede verse en la Tabla 2, no solo disminuyó el lactato total en el cultivo celular a medida que aumentaba la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa, sino que la tasa de producción de lactato específica ("Q_{lact}") también disminuyó. En el primer pase, el cultivo de control que no contenía 2-desoxiglucosa tenía una Q_{lact} de 0,948, mientras que en un cultivo que contenía una relación de uno a nueve entre 2-desoxiglucosa y glucosa, la Q_{lact} descendió a 0,553. Del mismo modo, en el segundo pase, el cultivo de control que no contenía 2-desoxiglucosa tenía una Q_{lact} de 0,582, mientras que en un cultivo que contenía una relación de uno a nueve entre 2-desoxiglucosa y glucosa, la Q_{lact} descendió a 0,290.

La presencia de 2-desoxiglucosa en el cultivo celular también redujo el título de α-GDF-8 de una manera dependiente de la dosis. Como se muestra en la Tabla 2 (columna marcada como "título"), en el segundo pase, α-GDF-8 se acumuló en el cultivo de control que carecía de 2-desoxiglucosa hasta un nivel de 67,3 mg/l, mientras que en presencia de 1 g/l de 2-desoxiglucosa (con 6 g/l de glucosa), se acumuló α-GDF-8 solo hasta un nivel de 28,22 mg/l. Además, como puede verse en la Tabla 2, no sólo disminuyó el título total en el cultivo celular a medida que aumentaba la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa, sino que la tasa de producción del título específico ("Q_p") también disminuyó. En el segundo pase, el cultivo de control que no contenía 2-desoxiglucosa tenía una Q_p de 16,376, mientras que en un cultivo que contenía una relación de uno a seis entre 2-desoxiglucosa y glucosa, la Q_p descendió a 12,038.

Tabla 2. Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el lactato de células α-GDF-8 en placas de cultivo

Primer pase									
Condiciones	c. d (inicio)	c. d (fin)	viab	Gluc	lact	μ	Q _{lact}		
Control	0,16	1,54	99,4	6,86	1,88	0,032	0,948		
0,25/9	0,14	1,3	99,7	7,55	1,53	0,032	0,899		
0,5/9	0,16	1,12	99,3	7,88	1,22	0,028	0,727		
0,5/6	0,15	1,24	99,1	5,21	1,2	0,030	0,701		
1/9.	0,16	1,05	99,7	8,13	0,9	0,027	0,553		
1/6.									
Segundo pase									
Condiciones	c.d (inicio)	c.d (fin)	viab	Gluc	lact	título	Q _p	Q _{lact}	μ
Control	0,26	3,6	99,1	6,97	2,39	67,3	16,376	0,582	0,037
0,25/9	0,25	3,2	99,5	7,25	2,17	58,28	15,477	0,576	0,035
0,5/9	0,26	2,8	99,6	7,65	1,79	50,37	14,252	0,506	0,033
0,5/6	0,24	2,6	99	5,04	1,36	43	13,135	0,415	0,033
1/9.	0,25	1,9	99	9	0,98	34,85	12,400	0,349	0,028
1/6.	0,22	1,5	98,6	6,51	0,68	28,22	12,038	0,290	0,027

Nota: Las cifras en la primera columna indican la proporción de g/l desoxiglucosa a g/l de glucosa. por lo tanto, 0,25/9 indica 0,25 g/l de desoxiglucosa y 9 g/l de glucosa

Conclusión: Similar a los resultados observados en el Ejemplo 1, la presencia de 2-desoxiglucosa en el cultivo celular inhibió el crecimiento celular de forma dependiente de la dosis. Como resultado, la densidad celular final fue menor en los cultivos suplementados con 2-desoxiglucosa y el título de α-GDF-8 expresado se redujo de una manera directamente proporcional a la relación de 2-desoxiglucosa a la glucosa en el cultivo. Sin embargo, la presencia de 2-desoxiglucosa parecía tener poco o ningún efecto sobre la viabilidad de las células en el cultivo celular. Es importante destacar que la presencia de 2-desoxiglucosa en el cultivo celular inhibió la acumulación de lactato de una forma dependiente de la dosis. Dado que el lactato es un conocido inhibidor del crecimiento y la viabilidad celular a densidades celulares altas, estos resultados demuestran que la adición de 2-desoxiglucosa a un cultivo de células puede dar lugar a una densidad celular final mayor o a un cultivo celular más sano a densidades celulares más altas.

Ejemplo 3: Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el crecimiento celular y la productividad de células α-GDF-8 en biorreactores

Introducción: Los ejemplos 1 y 2 demostraron que los cultivos celulares cultivadas en placas de cultivo toleraron bien la 2-desoxiglucosa añadida cuando se proporcionó a bajas concentraciones y que la acumulación de lactato disminuyó en presencia de 2-desoxiglucosa. En este ejemplo, se realizaron experimentos para determinar si la 2-desoxiglucosa disminuía la cantidad de lactato producido durante los cultivos celulares cultivados en biorreactores y si la presencia de 2-desoxiglucosa tenía otros efectos beneficiosos o perjudiciales aparte de la reducción de la tasa de crecimiento, particularmente cuando el cultivo de células se cultiva durante un período prolongado de tiempo.

Materiales y procedimientos: Las células α -GDF-8 se cultivaron en medio 2 en biorreactores de 1 l y se alimentaron con Medio 3. Las composiciones de Medio 2 y Medio 3 se muestran en la Tabla 3. Algunos de los cultivos se suplementaron con 0,5 g/l de 2-desoxiglucosa al principio del cultivo. Los cultivos se pasaron de 37 °C a 31 °C el día 4 ("cambio temprano") o el día 6 ("cambio tardío"). Las condiciones experimentales y el horario de alimentación para los cultivos celulares cultivados en biorreactores se resumen en la Tabla 4.

Tabla 3. Composición del medio 2 y el medio 3.

	Medio 2		Medio 3	
Aminoácidos	mg/l	mM	mg/l	mM
alanina	17,80	0,20	213,68	2,40
arginina	696,00	4,00	2292	13,18
asparagina•H ₂ O	3000	20,00	3240	21,60
ácido aspártico	219,45	1,65	799,98	6,01
cisteína•HCl•H ₂ O	70,40	0,40		
cisteína•2HCl	468,75	1,50	586	1,87
ácido glutámico			353,67	2,41
Glutamato monosódico	33,80	0,20		
glutamina	584,00	4,00		
glicina	115,50	1,54	180,07	2,40
Histidina•HCl•H ₂ O	474,60	2,26	882,35	4,20
isoleucina	570,73	4,36	1416	10,81
leucina	1030	7,87	2040	15,58
lisina•HCl	1401	7,70	2184	12,00
metionina	387,40	2,60	715,48	4,80
fenilalanina	507,00	3,07	990,39	6,00
Prolina	539,50	4,69	828,32	7,20
serina	1052	10,02	1896	18,06
treonina	564,80	4,75	1142	9,60
triptófano	274,16	1,34	391,325	1,92
tirosina•2Na•2H ₂ O	745,75	2,86	1251	4,79
valina	749,00	6,40	1123	9,60
Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM
biotina	2,68	11,00	4,92	20,17
Pantotenato cálcico	21,92	46,06	54,02	113,49
Cloruro de colina	158,46	1140.	214,88	1545
Ácido fólico	25,93	58,80	63,76	144,57
inositol	163,98	911,00	302,52	1680
nicotinamida	26,23	215,00	48,02	393,60

ES 2 541 546 T3

Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM
piridoxal•HCl	2,03	10,00		
piridoxina•HCl	36,13	175,38	49,22	238,93
riboflavina	2,41	6,42	5,40	14,37
tiamina•HCl	39,43	117,00	92,82	275,43
vitamina B12	21,17	15,62	16,81	12,40
Sales inorgánicas	mg/l	mM	mg/l	mM
CaCl ₂	116,55	1,05		
KCl	312,90	4,19		
Na ₂ HPO ₄	56,60	0,40		
NaCl	1100	18,80		
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	645,84	4,68	1566,00	11,40
MgSO ₄				
MgSO ₄ •7H ₂ O	138,00	1,15	258,00	1,05
MgCl ₂	28,50	0,30		
NaHCO ₃	2000	23,81		
Oligoelementos	µg/l	nM	µg/l	nM
Selenito sódico	69,16	400,00	60,00	347,02
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	50,00	123,76		
CuSO ₄	10,24	64,00		
CuSO ₄ •5H ₂ O	99,88	400,00	5,16	32,26
FeSO ₄ •7H ₂ O	4170	15000	18,54	74,24
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2640	9200	6859	24675
MnSO ₄ •H ₂ O	33,80	200,00	4897	17062
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	284,07	1000	1,15	6,79
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	247,20	200,00	945,00	3326
NH ₄ VO ₃	2,34	20,00	8,37	6,77
NiSO ₄ •6H ₂ O	5,26	20,00	4,39	37,50
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,90	4,00	0,88	3,34
AlCl ₃ •6H ₂ O	0,97	4,00		
KBr	0,48	4,00		
CrCl ₃	15,83	100,00		
NaF	0,17	4,00		
GeO ₂	0,42	4,00		
KI	33,20	200,00		
RbCl	0,48	4,00		
H ₃ BO ₃	12,37	200,00		
LiCl	0,17	4,00		
Otros componentes	mg/l	µM	mg/l	µM
Hidrocortisona	540,00	1,49	0,43	1,19
Putresano•2HCl	15000	93,11	12,00	74,49

Otros componentes	mg/l	µM	mg/l	µM
ácido linoleico	290,00	1,04	0,51	1,80
Ácido tioúctico	716,00	3,48	1,26	6,13
D-glucosa (Dextrosa)	15000	83,33	50329	279609
PVA	2560		2400	
Nucelina	50,00		120,00	
Piruvato sódico	55,00	0,50		

Tabla 4. Condiciones del biorreactor para el ejemplo 3.

Condi- ción	2- desoxiglucosa	Cam- bio de temp.	Alimentación				
			Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11
1	-	Día 4			5 % en volumen	3 g/l de glucosa	2 g/l de glucosa
2	0,5 g/l	Día 4			5 % en volumen	3 g/l de glucosa	
3	-	Día 6	10 % en volumen 2,5 g/l de glucosa	5 g/l de glucosa	5 % en volumen	3 g/l de glucosa	
4	0,5 g/l	Día 6	10 % en volumen 2,5 g/l de 2- desoxiglucosa	5 g/l de glucosa	5 % en volumen, 0,025 g/l de 2- desoxiglucosa	3 g/l de glucosa	2 g/l de glucosa

5 **Resultados:** Las figuras 2, 3, 4 y 5 muestran la densidad celular diaria, la viabilidad, la concentración de lactato y el título de células α -GDF-8 cultivadas en biorreactores de producción en las cuatro condiciones descritas en la Tabla 4. Como puede verse en la Figura 2, la densidad celular de las células de cambio tardío cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa fue significativamente mayor comenzando en aproximadamente el día 4 que cualquiera de las otras tres condiciones. Además, la viabilidad de las células de cambio tardío cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa fue significativamente mayor que la viabilidad de las células de cambio tardío cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa. Una comparación de las Figuras 4 y 5 muestra que el título general de α -GDF-8 se correlaciona inversamente con la cantidad de lactato en el cultivo. Los dos cultivos de cambio temprano (que contienen y que carecen de 2-desoxiglucosa) tenían cada uno los niveles más bajos de lactato hacia el final del cultivo y cada uno tenía los títulos generales más altos. Los inventores observaron que el cultivo de cambio temprano que contenía 2-desoxiglucosa tenía niveles de lactato ligeramente más bajos que el cultivo de cambio temprano que carecía de 2-desoxiglucosa y tenía un título final correspondiente ligeramente más alto. De forma similar, el cultivo de cambio tardío que contenía 2-desoxiglucosa tenía niveles de lactato ligeramente más bajos que el cultivo de cambio tardío que carecía de 2-desoxiglucosa y tenía un título final correspondiente ligeramente más alto. Ambos cultivos de cambio temprano mostraron una reducción de los niveles de lactato a partir de aproximadamente el día 4, el día del cambio de temperatura. Sin embargo, ambos cultivos de cambio tardío no pudieron mostrar una reducción de los niveles de lactato después del cambio y los niveles de lactato siguieron aumentando a lo largo de la vida del cultivo.

20 **Conclusiones:** En contraste con el efecto perjudicial en la densidad de células observada en los cultivos celulares cultivados durante solo unos pocos días en placas de cultivo en los Ejemplos 1 y 2, este ejemplo demostró que la presencia de 2-desoxiglucosa en un cultivo de células cultivadas en un biorreactor durante 12 días dio lugar a una densidad celular significativamente mayor al final del cultivo que cualquiera de los cultivos de células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa o un cultivo celular cultivado con 2-desoxiglucosa, pero la temperatura se cambió dos días antes. Adicionalmente, un cultivo de cambio tardío que contenía 2-desoxiglucosa exhibió una viabilidad significativamente más alta que un cultivo de cambio tardío que carecía de 2-desoxiglucosa. Adicionalmente, los cultivos de células cultivadas en medios con 2-desoxiglucosa contenían menos niveles de lactato que los correspondientes cultivos cultivados en los medios que carecían de 2-desoxiglucosa. No obstante, significativamente, ambos cultivos de cambio temprano exhibieron una reducción en los niveles generales de lactato después del cambio de temperatura, mientras que ambos cultivos de cambio tardío continuaron acumulando lactato durante todo el transcurso del cultivo. Los niveles de lactato en el momento del cambio de los cultivos tempranos

estaban muy por debajo de los niveles de lactato en el momento del cambio de los cultivos tardíos. Por lo tanto, es posible que los niveles de lactato en el momento del cambio determinen si las células en un cultivo comenzarán a captar lactato. Sin embargo, aunque el nivel de lactato del cultivo de cambio tardío que carecía de 2-desoxiglucosa fue significativamente mayor en el momento del cambio de los niveles de lactato en el momento del cambio de los dos cultivos de cambio temprano (véase la Figura 4, de aproximadamente 10 g/l frente a aproximadamente 4 - 5 g/l), el nivel de lactato del cultivo temprano que contenía 2-desoxiglucosa no fue significativamente mayor (véase la figura 4, aproximadamente 6 g/l frente a aproximadamente 4 - 5 g/l). Sin embargo, la densidad celular del cambio tardío, el cultivo que contenía 2-desoxiglucosa fue significativamente mayor (véase la Figura 2, aproximadamente 18×10^6 /ml vs. 12×10^6 /ml). Por lo tanto, además de la concentración de lactato en el momento del cambio, este ejemplo demuestra que la densidad celular en el momento del cambio también puede desempeñar un papel en la determinación de si las células en un cultivo comenzarán a captar lactato.

Por último, este ejemplo demuestra que el título de un cultivo se correlaciona inversamente con los niveles de lactato en el cultivo. Por tanto, a los cultivos de cambio temprano que comenzaron a captar lactato tenían los títulos finales más altos, mientras que los cultivos de cambio tardío que continuaron acumulando lactato tenían los títulos finales más bajos. Esto es así a pesar de que el cultivo de cambio tardío que contenía 2-desoxiglucosa tenía una densidad celular significativamente mayor. Por tanto, parece que el exceso de los niveles de lactato afectan a la productividad de las células de cambio tardío cultivadas en un medio que contenía 2-desoxiglucosa.

Ejemplo 4: Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el crecimiento celular y la productividad de células α -GDF-8 en biorreactores

Introducción: El ejemplo 3 demostró que la presencia de 2-desoxiglucosa en un cultivo de células cultivadas en un biorreactor durante 12 días tenía como resultado una densidad celular significativamente mayor al final del cultivo que cualquiera de los cultivos de células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa o un cultivo de células cultivadas con 2-desoxiglucosa pero en los que se cambió la temperatura dos días antes. Adicionalmente, los cultivos que contenían 2-desoxiglucosa acumulaban lactato en menor medida que los correspondientes cultivos que carecen de 2-desoxiglucosa. Sin embargo, debido a los altos niveles de lactato y/o las altas densidades celulares en el momento del cambio, el título de los cultivos de cambio tardío se redujo significativamente. En este ejemplo, los inventores intentaron restaurar el título de los cultivos de cambio tardío mediante la alteración de los niveles de lactato y/o densidades de células en el momento del cambio.

Materiales y procedimientos: Las células α -GDF-8 se cultivaron en medio 2 en biorreactores de 1 l y se alimentaron con Medio 3. Algunos de los cultivos se suplementaron con 0,5 g/l de 2-desoxiglucosa al inicio del cultivo. Las células se alimentaron con 3 g/l de glucosa o 0,3 g/l de 2-desoxiglucosa el día 4 y con 10 % de medio de alimentación (en volumen) o 10 % de medio de alimentación (en volumen) suplementado con 0,2 g/l de 2-desoxiglucosa el día 5. Los cultivos se pasaron de 37 °C a 31 °C el día 5 ("cambio temprano") o el día 6 ("cambio tardío"). Se proporcionaron alimentaciones adicionales los días 7 y 10. Las condiciones experimentales para los cultivos de células cultivadas en biorreactores se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones del biorreactor para el ejemplo 4.

N° RXT	2-desoxiglucosa	Cambio de temp.	Alimentación			
			Día 4	Día 5	Día 7	Día 10
1	-	Día 6	3g/l de glucosa	10 % en volumen	5 % en volumen	2,5 g/l de glucosa
2	-	Día 5	3g/l de glucosa	10 % en volumen	5 % en volumen	2,5 g/l de glucosa
3	0,5 g/l	Día 5	0,3g/l de 2-desoxiglucosa	10 % en volumen, 0,2 g/l de 2-desoxiglucosa	5 % en volumen	2,5 g/l de glucosa
4	0,5 g/l	Día 6	0,3g/l de 2-desoxiglucosa	10 % en volumen, 0,2 g/l de 2-desoxiglucosa	10 % en volumen	2,5 g/l de glucosa

Resultados: Las figuras 6, 7 y 8 muestran la densidad celular diaria, la viabilidad, la concentración de lactato y el título de células α -GDF-8 cultivadas en biorreactores de producción en las cuatro condiciones descritas en la Tabla 5. Similar al resultado observado en el ejemplo 3, la figura 6 muestra que la densidad celular de las células de cambio tardío cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa es significativamente mayor comenzando en aproximadamente el día 5 que cualquiera de las otras tres condiciones. La Figura 7 muestra que todos los cultivos celulares se sometieron a una reducción en los niveles de lactato después de haberse producido un cambio a una temperatura más baja. Adicionalmente, el cultivo celular que contiene 2-desoxiglucosa que se cambió tarde tenía

una concentración final de lactato inferior a la de los cultivos celulares que se cambiaron temprano, independientemente de si había o no 2-desoxiglucosa. Adicionalmente, los niveles generales de lactato fueron similares entre los de cultivos celulares de cambio tardío cultivados en presencia o ausencia de 2-desoxiglucosa. Sin embargo, ya que la Figura 6 muestra que el cultivo de células de cambio tardío cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa contenía más células, se deduce que las células en el cultivo de 2-desoxiglucosa producían menos lactato que las células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa, o de alguna manera metabolizaban el lactato existente en mayor medida que las células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa o ambas cosas. La Figura 8 muestra que el título general de α -GDF-8 fue similar para las cuatro condiciones de cultivo. Sin embargo, ya que la densidad celular global de las células de cambio tardío cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa era mayor (véase la figura 6), las células de cambio tardío con 2-desoxiglucosa parecen haber producido menos α -GDF-8 por célula que las células cultivadas en las otras tres condiciones de cultivo.

La Figura 9 muestra la captación de glucosa de las células α -GDF-8 cultivadas en las cuatro condiciones descritas en la Tabla 5. La presencia de 2-desoxiglucosa en el medio de cultivo tuvo como resultado una disminución en la captación de glucosa (Figura 9, barras tercera y cuarta). Adicionalmente, las células de cambio tardío cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa captaron la glucosa a una tasa menor que las células de cambio temprano cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa.

Conclusión: De forma similar a los resultados observados en el ejemplo 3, este ejemplo demuestra que la presencia de 2-desoxiglucosa en un cultivo de células cultivadas en un biorreactor durante 12 días tenía como resultado una densidad celular significativamente mayor al final del cultivo que cualquiera de los cultivos de células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa o un cultivo de células cultivadas con 2-desoxiglucosa pero en los que se cambió la temperatura un día antes. Significativamente, parece que las células cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa produjeron menos de lactato y/o consumieron lactato en mayor medida que las células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa (comparar las densidades celulares de las dos muestras como se muestra en la figura 6 con la acumulación de lactato en general que se muestra en la Figura 7). También cabe destacar que el cultivo de células de cambio tardío cultivadas en la presencia de 2-desoxiglucosa contenía niveles de lactato en general más bajos que los cultivos celulares de cambio temprano cultivados en presencia o ausencia de 2-desoxiglucosa. Por último, aunque la cantidad de α -GDF-8 producida por célula es inferior en los cultivos de cambio tardío con 2-desoxiglucosa (compárense las densidades celulares de las dos muestras como se muestra en la Figura 6 con el título general de α -GDF-8 título mostrado en la Figura 8), el título general de α -GDF-8 es similar al título de α -GDF-8 de los cultivos de células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa, lo que demuestra que la presencia de 2-desoxiglucosa tiene un efecto positivo sobre la densidad celular general, pero, en contraste con los resultados del Ejemplo 3, no tiene un efecto perjudicial sobre el título final de α -GDF-8. Por tanto, la presente invención demuestra que mediante la manipulación de las condiciones de cultivo de forma que el lactato se capta después del cambio de temperatura, es posible aumentar la densidad celular del cultivo de cambio tardío que contiene 2-desoxiglucosa sin un efecto negativo correspondiente sobre el título general de α -GDF-8.

Ejemplo 5: Efecto de la 2-desoxiglucosa sobre el crecimiento celular y la productividad de células α -GDF-8 en biorreactores en presencia de niveles elevados de glucosa

Introducción: El ejemplo 4 demostró que la presencia de 2-desoxiglucosa en biorreactores de producción tuvo como resultado un aumento de la densidad celular general al final de 12 días cuando se cambió la temperatura de las células tarde. Aunque el título general de α -GDF-8 fue similar al título de α -GDF-8 de los cultivos de células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa, la producción de α -GDF-8 por célula fue significativamente menor. En este ejemplo, se realizaron experimentos para determinar si la producción de α -GDF-8 por célula podría aumentarse suplementando el cultivo periódicamente con glucosa adicional.

Materiales y procedimientos: Las células α -GDF-8 se cultivaron en medio 2 en biorreactores de 1 l y se alimentaron con Medio 3. Los medios de cultivo de partida se suplementaron o no con 0,5 g/l de 2-desoxiglucosa. Las células se alimentaron los días 3, 5, 7, 10 y 12 para mantener el nivel de glucosa por encima de aproximadamente 8 g/l. Los cultivos que carecen de 2-desoxiglucosa se cambiaron desde 37 °C a 31 °C el día 4, mientras que los cultivos que contenían 2-desoxiglucosa se cambiaron desde 37 °C a 31 °C el día 5.

Resultados: Las figuras 10, 11, 12, 13 y 14 muestran una densidad diaria de células viables, el título, niveles de lactato y niveles de glucosa y productividad celular específica, respectivamente, para las células α -GDF-8 cultivadas en presencia o ausencia de 2-desoxiglucosa. Como se muestra en la Figura 10, las densidades celulares de los dos cultivos son similares en el principio y al final del cultivo, aunque la densidad celular del cultivo suplementado con 2-desoxiglucosa fue ligeramente superior durante la etapa media del cultivo. La Figura 11 muestra que el título general de α -GDF-8 también es similar entre los dos cultivos, aunque el título de α -GDF-8 del cultivo suplementado con 2-desoxiglucosa es ligeramente superior hacia el día 14. Por tanto, en presencia de niveles altos de glucosa, la disminución del título por célula observada en los ejemplos 3 y 4 parece haber desaparecido. La similitud entre la producción de α -GDF-8 de los cultivos celulares que contienen o que carecen de 2-desoxiglucosa también está indicada en la Figura 14, que muestra la productividad celular específica diaria de α -GDF-8. Consistente con los datos presentados en los tres ejemplos anteriores, la Figura 12 muestra que la acumulación de lactato en los cultivos de células que contienen 2-desoxiglucosa es significativamente menor que en los cultivos de células que carecen de 2-desoxiglucosa. La Figura 13 muestra los niveles de glucosa cada día en el transcurso de los cultivos. Los bruscos

aumentos los días 3, 5, 7, 10 y 12 corresponden a la adición de los medios de alimentación.

Conclusiones: Este ejemplo demuestra que en presencia de altos niveles de glucosa, se elimina la reducción en la cantidad de α -GDF-8 producida por célula en presencia de 2-desoxiglucosa que se observa en los Ejemplos 4 y 5. Adicionalmente, incluso en presencia de altos niveles de glucosa, la reducción beneficiosa de lactato en el medio de cultivo resultante de la presencia de 2-desoxiglucosa persiste. Por lo tanto, las células cultivadas en presencia de 2-desoxiglucosa fueron capaces de cambiar la temperatura un día después, lo que tiene como resultado una densidad global de células viables integrada más alta que las células cultivadas en ausencia de 2-desoxiglucosa.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular que comprende 2-desoxiglucosa y glucosa,
 5 en el que 2-desoxiglucosa está presente a entre 0,25 gramos por litro y 1 gramo por litro, en el que la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa es igual o menor que de 1 a 9, y,
 en el que el medio está definido.
2. El medio de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente glutamina a menos de 13 mM.
3. El medio de la reivindicación 1, en el que el medio comprende adicionalmente glutamina presente a 8 g/l o más.
- 10 4. El medio de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo celular tiene un medio característico seleccionado del grupo que consiste en: (i) una concentración de aminoácido acumulada superior a 70 mM, (ii) un relación molar entre glutamina acumulada y asparagina acumulada de menos de 2, (iii) una relación molar entre la glutamina acumulada y los aminoácidos totales acumulados de menos de 0,2, (iv) una relación molar entre los iones inorgánicos acumulados y los aminoácidos totales acumulados de entre 0,4 y 1, (v) una concentración combinada de glutamina acumulada y asparagina acumulada entre 16 y 36 mM, y combinaciones de los mismos.
- 15 5. El medio de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente manganeso a una concentración entre 10 y 600 nM.
6. Un procedimiento de producción de un polipéptido en un medio de cultivo celular, que comprende las etapas de:
 20 cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, cuyo gen es expresado en condiciones de cultivo celular, en un medio de cultivo celular que comprende 2-desoxiglucosa y glucosa, en el que hay 2-desoxiglucosa presente a entre 0,25 gramos por litro y 1 gramo por litro, y en el que la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa es igual o menor que de 1 a 9; y
 mantener el cultivo en condiciones, y durante un tiempo suficiente, para permitir la expresión del polipéptido, de tal manera que los niveles de lactato del cultivo sean más bajos que los niveles de lactato producidos en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de 2-desoxiglucosa.
- 25 7. Un procedimiento de producción de un polipéptido en un medio de cultivo celular, que comprende las etapas de:
 cultivar células de mamífero que contienen un gen que codifica un polipéptido de interés, cuyo gen es expresado en condiciones de cultivo celular, en un medio de cultivo celular que comprende 2-desoxiglucosa y glucosa, en el que hay 2-desoxiglucosa presente entre 0,25 gramos por litro y 1 gramo por litro, y en el que la relación entre 2-desoxiglucosa y glucosa es igual o menor que de 1 a 9;
 30 mantener el cultivo a un primer intervalo de temperatura durante un primer periodo de tiempo;
 cambiar el cultivo a un segundo intervalo de temperatura, en el que al menos una temperatura del segundo intervalo de temperatura es inferior a la temperatura más baja del primer intervalo de temperaturas; y
 mantener el cultivo durante un segundo periodo de tiempo en condiciones, y durante un tiempo suficiente,
 35 para permitir la expresión del polipéptido, en el que los niveles de lactato del cultivo sean más bajos que los niveles de lactato observados en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de 2-desoxiglucosa.
8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el medio de cultivo celular comprende además glutamina a menos de 13 mM.
9. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el medio de cultivo celular comprende además glucosa, y en
 40 el que el nivel de glucosa se mantiene a 8 g/l o más.
10. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el medio de cultivo celular tiene un medio característico seleccionado del grupo que consiste en: (i) una concentración de aminoácido acumulada superior a 70 mM, (ii) un
 45 relación molar entre glutamina acumulada y asparagina acumulada de menos de 2, (iii) una relación molar entre la glutamina acumulada y los aminoácidos totales acumulados de menos de 0,2, (iv) una relación molar entre los iones inorgánicos acumulados y los aminoácidos totales acumulados de entre 0,4 y 1, (v) una concentración combinada de glutamina acumulada y asparagina acumulada entre 16 y 36 mM, y combinaciones de los mismos.
11. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el medio de cultivo celular comprende además manganeso a una concentración entre 10 y 600 nM.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que el cultivo celular es proporcionado además con componentes suplementarios.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que los componentes suplementarios son proporcionados en un medio de alimentación.
14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que los componentes suplementarios comprenden 2-desoxiglucosa.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que los componentes suplementarios son seleccionados del grupo que consiste en hormonas u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía, y combinaciones de los mismos.
- 10 16. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el primer intervalo de temperatura es de 30 a 42 grados centígrados.
17. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el segundo intervalo de temperatura es de 25 a 41 grados centígrados.
- 15 18. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la etapa de cambiar comprende el cambio cuando la densidad celular viable del cultivo está dentro de un intervalo de 6×10^6 células/ml a 12×10^6 células/ml, de tal manera que las células comenzarán a captar lactato durante el segundo período de tiempo.
19. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la etapa de cambio comprende el cambio cuando la concentración de lactato del cultivo es de menos de 8 gramos por litro, de tal manera que las células comenzarán a captar lactato durante el segundo período de tiempo.
- 20 20. El procedimiento de la reivindicación 7, que incluye una segunda etapa de cambio posterior a la primera etapa de cambio que comprende cambiar el cultivo a una tercera temperatura o intervalo de temperatura, en el que al menos una temperatura del tercer intervalo de temperatura es menor que la temperatura más baja del segundo intervalo de temperaturas.
- 25 21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el tercer intervalo de temperatura es de 25 a 40 grados centígrados.
22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 21, en el que el polipéptido es aislado y purificado.
23. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el polipéptido es seleccionado del grupo que consiste en: una enzima, un receptor, un anticuerpo, una hormona, un factor regulador, un antígeno, un agente de unión, un factor de coagulación, un factor de crecimiento, y combinaciones de los mismos.
- 30 24. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el polipéptido es un anticuerpo.
25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-ABeta.
26. El procedimiento de la reivindicación 24 o 25, en el que el anticuerpo se une a un epítipo con más fuerza, con más especificidad, o ambos, que un anticuerpo producido en condiciones de otro modo idénticas en un medio de otro modo idéntico que carece de la sustancia inhibidora de la glucólisis.

Figura 1. La Figura 1 muestra el crecimiento celular de células a-GDF-8 en presencia de 2-desoxiglucosa en placas.

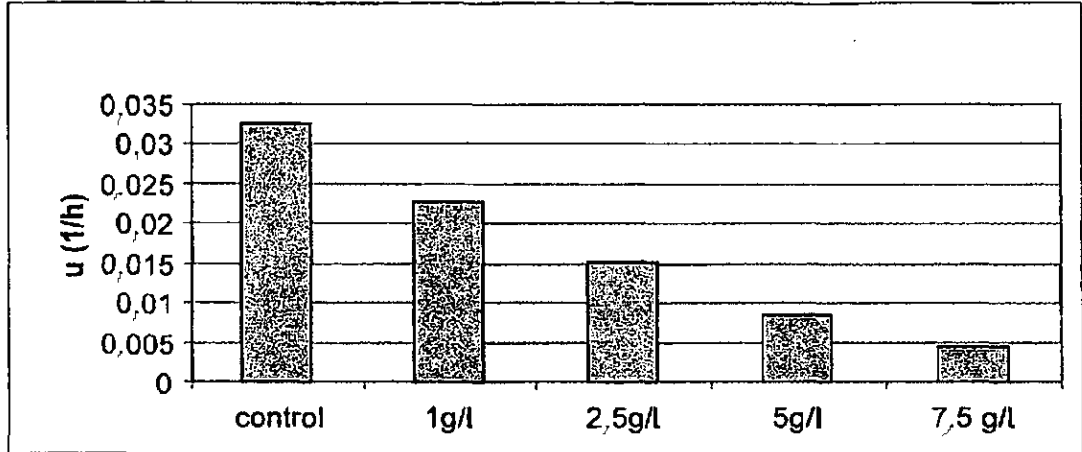


Figura 2. Crecimiento celular de células a-GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

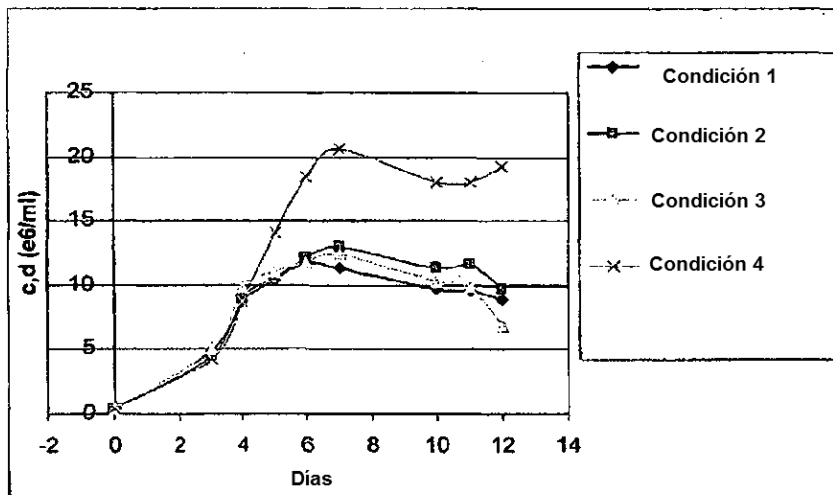


Figura 3. Viabilidad de las células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

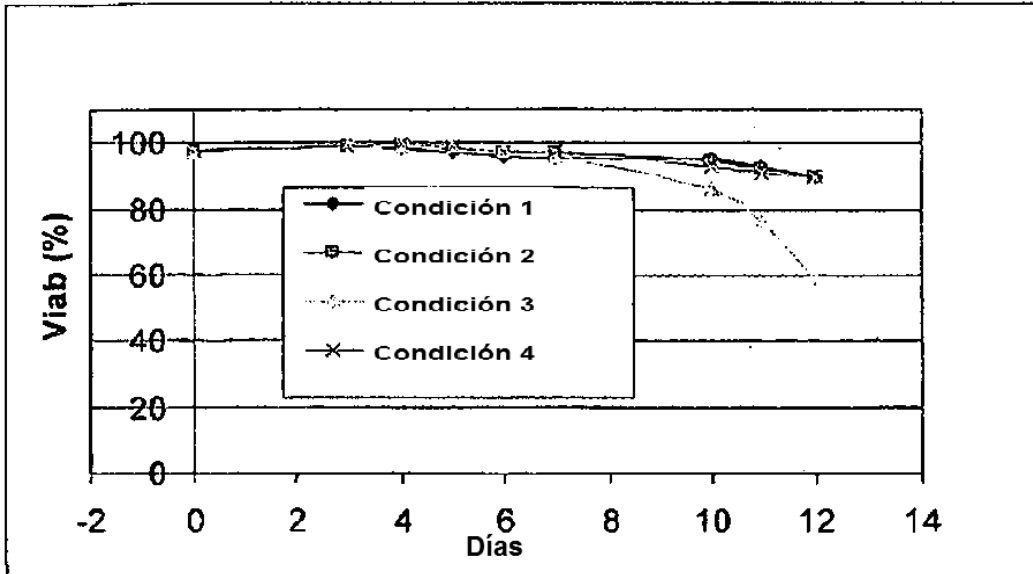


Figura 4. Acumulación de lactato de las células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

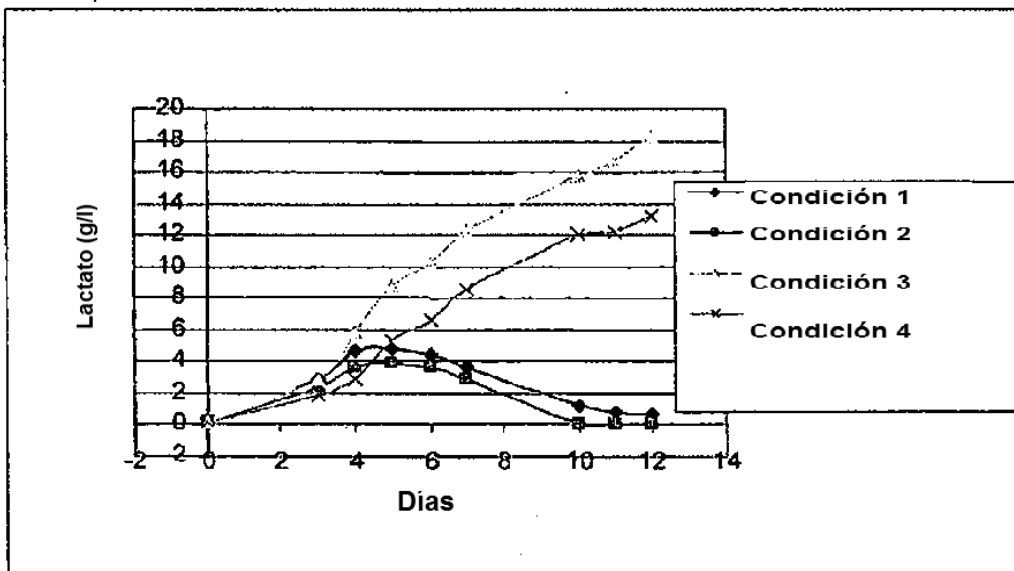


Figura 5. Título de las células a-GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

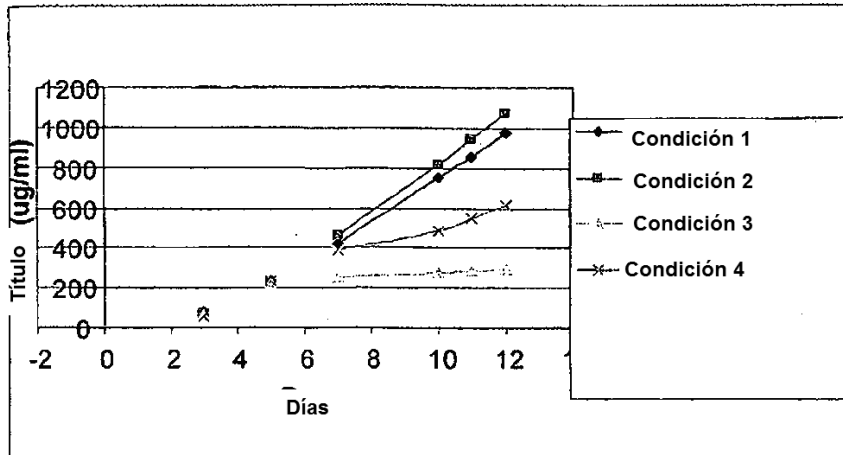


Figura 6. Crecimiento celular de las células a-GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

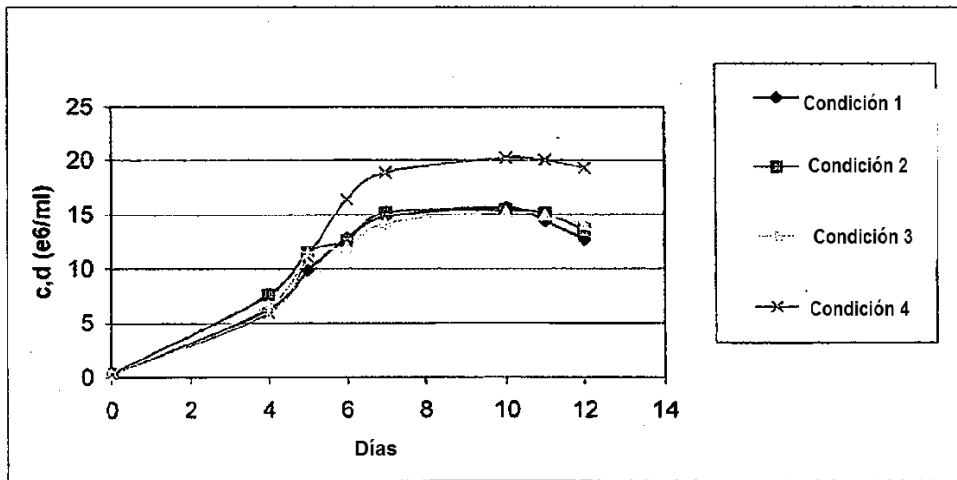


Figura 7. Acumulación de lactato de células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

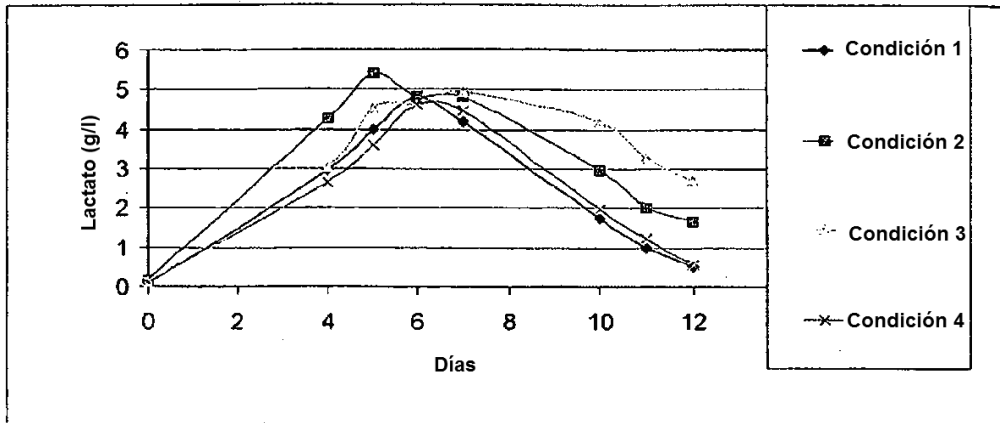


Figura 8. Título de células α -GDF-8 n biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

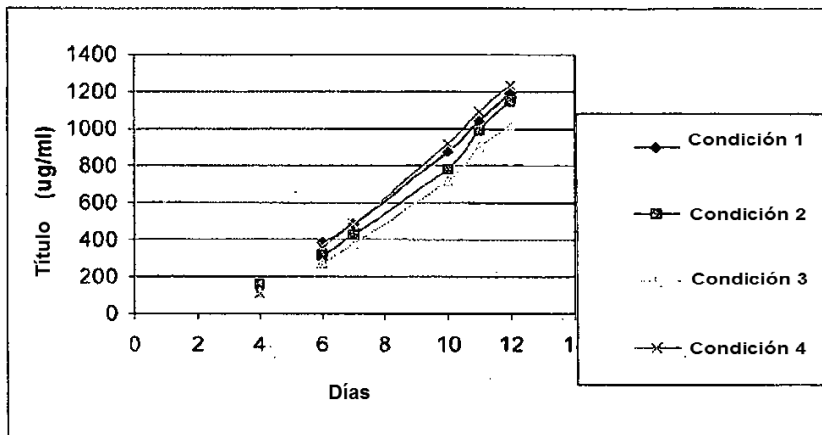


Figura 9. Captación de glucosa de las células α -GDF-8 en biorreactores de 1 l con y sin 2-desoxiglucosa

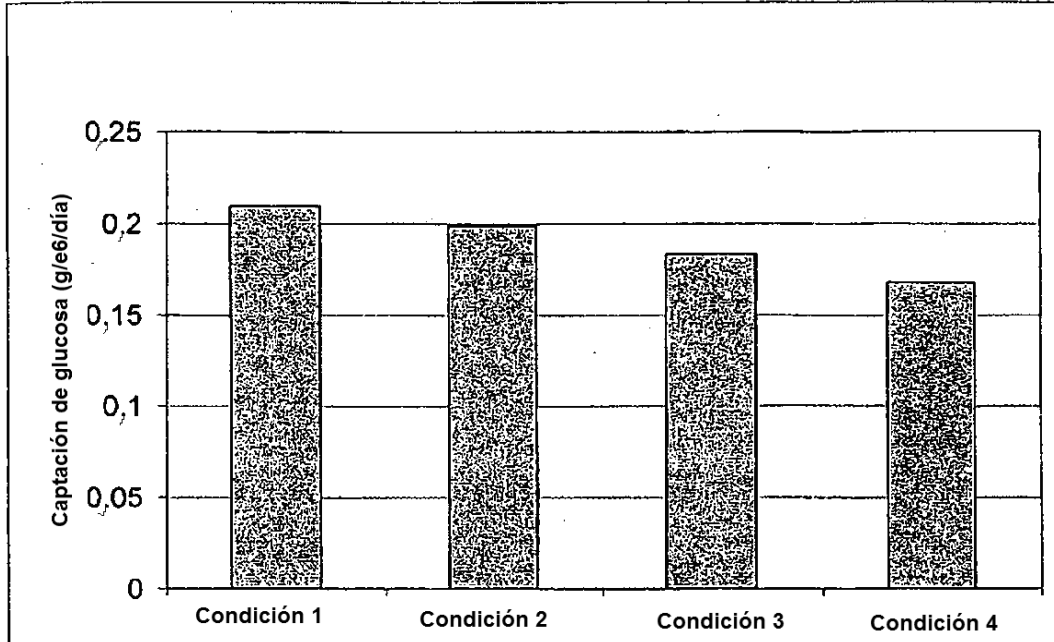


Figura 10. Densidad de células viables diarias de células α -GDF-8 en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa

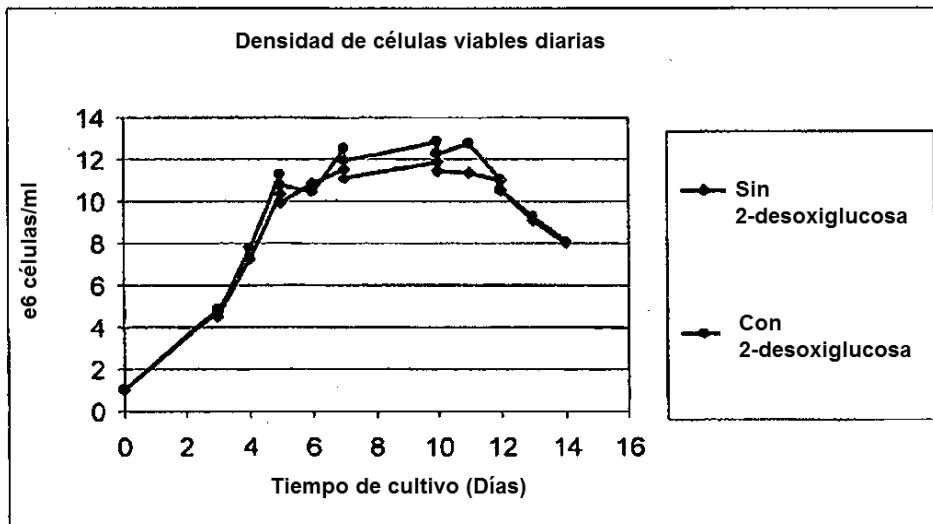


Figura 11. Título diario de células a-GDF-8 en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa

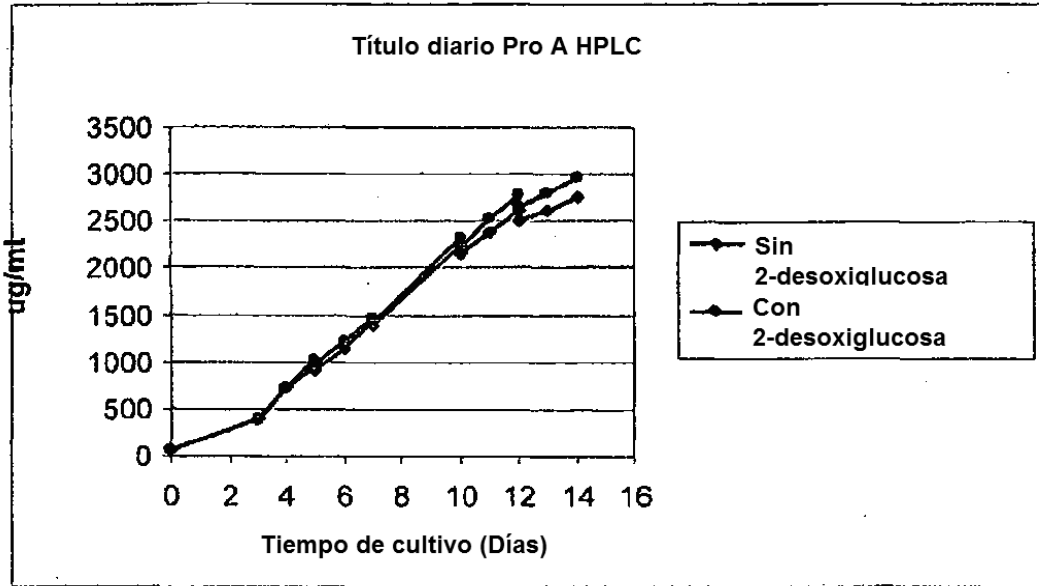


Figura 12. Niveles diarios de lactato de células a-GDF-8 en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa

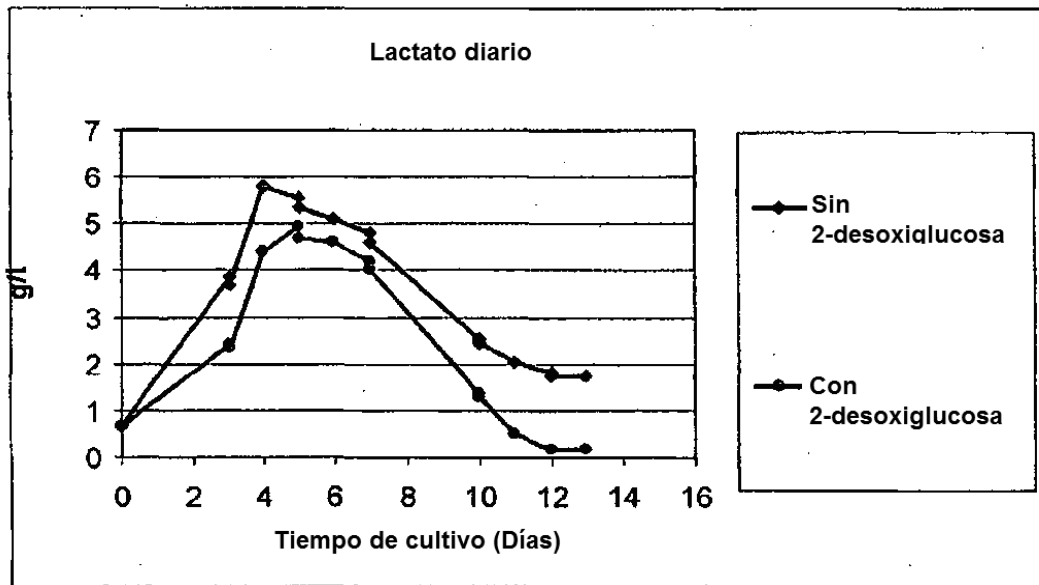


Figura 13. Niveles diarios de glucosa de células a-GDF-8 en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa

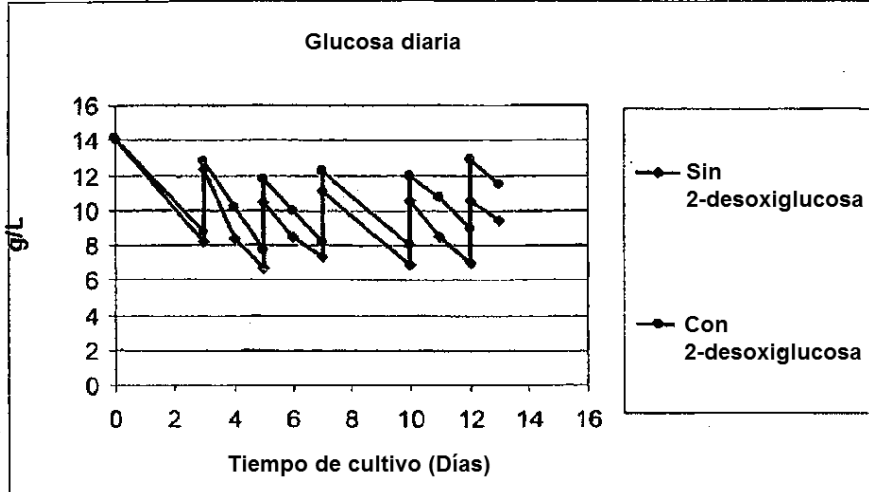


Figura 14. Productividad específica diaria e células a-GDF-8 en presencia y ausencia de 2-desoxiglucosa

