

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 061**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C07K 14/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09733052 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2310523**

54 Título: **Procedimientos de producción mejorada de proteínas morfogenéticas del hueso**

30 Prioridad:

**17.04.2008 US 45643 P**

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

**14.08.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LUAN, YEN-TUNG;  
WANG, WENGE;  
NYBERG, GREGG;  
GOMES, JOSE MANUEL;  
DRAPEAU, DENIS y  
CARDOZA, TERRY**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 543 061 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

Procedimientos de producción mejorada de proteínas morfogenéticas del hueso.

La presente invención se refiere al campo de producción de proteínas recombinantes. En particular, la invención se refiere a procedimientos para producir factores de crecimiento peptídicos, incluyendo proteínas morfogenéticas del hueso (BMP).

Los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) poseen propiedades reguladoras del crecimiento y morfogenéticas fisiológicamente importantes (Kingsley y col., Genes Dev. 8: 133-146 (1994); Hoodless y col., Curr. Topics Microbiol. Immunol. 228: 235-272 (1998)). Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) son miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  de factores de crecimiento y diferenciación (Rosen y col., Principles of Bone Biology 2: 919-928 (2002)). Algunas de las primeras pruebas de la existencia de la BMP fue la capacidad del hueso desmineralizado para inducir nuevo hueso cuando se implanta en el músculo (Urist y col., Science 150: 893-99 (1965)). Las BMP se purificaron de forma bioquímica posteriormente a partir de hueso desmineralizado (Wang y col., PNAS 85: 9484-9488 (1988)) y se clonaron por hibridación de oligonucleótidos radiomarcados diseñados a partir de fragmentos peptídicos de las proteínas purificadas (Wozney y col., Science 242: 1528-1534 (1988)). Las BMP clonadas se han expresado de forma recombinante y conservan su función. Las BMP se producen típicamente de forma recombinante, debido a la dificultad, falta de pureza y bajo rendimiento, asociados con la purificación bioquímica de fuentes naturales tales como, por ejemplo, hueso.

Se sabe que BMP-2 y las proteínas relacionadas BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 (también conocida como OP-1), BMP-8 (también conocida como OP-2), BMP-9 y BMP-10 median en el crecimiento y reparación del tejido óseo y cartilaginoso. BMP-2 se usa clínicamente en la actualidad para tratar fracturas abiertas y sin unión, fusiones espinales (como parte del dispositivo médico INFUSE™), y para indicaciones ortodónticas. La disponibilidad y coste de este importante producto terapéutico dependen, en parte, del título de los cultivos celulares de mamífero usados en su producción. Sin embargo, las condiciones de cultivo que producen títulos celulares adecuados en una "escala de laboratorio" no pueden aumentarse de escala a la gran escala de fabricación necesaria para cumplir la demanda creciente de estas proteínas. En consecuencia, existe la necesidad de procedimientos de producción de proteínas recombinantes, tales como BMP-2, aumentando los títulos celulares durante la producción y en los que los procedimientos sean adecuados para su uso en una escala de fabricación.

La presente invención proporciona procedimientos para producir proteínas recombinantes en una escala de fabricación sosteniendo altos títulos de células huésped, dando como resultado un aumento del rendimiento proteico. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un medio de cultivo definido complementado con metales traza sostiene títulos celulares de recogida mayores de células CHO cultivadas en un sistema de biorreactor por un proceso de realimentación por lotes a una escala de fabricación. Sin el complemento de los metales, el mismo medio sostiene el crecimiento en un biorreactor pequeño (a escala de laboratorio) pero no consiguió "aumentar de escala" a un biorreactor de escala de fabricación. La uniformidad de título se mejoró adicionalmente cuando el piridoxal en el medio se reemplazó con piridoxina.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de expresión de proteínas recombinantes que comprenden las etapas de cultivar una célula huésped adecuada que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de interés en un medio de cultivo definido en el que está presente hierro a una concentración de al menos aproximadamente 2,25  $\mu$ M y si está presente piridoxal, compone menos de aproximadamente el 55 % de la concentración molar de la vitamina B6 en el medio y recuperar la proteína de interés. En algunas realizaciones, el hierro está presente a una concentración de al menos aproximadamente 5  $\mu$ M. El medio puede comprender además cobre a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM y cinc a una concentración de al menos aproximadamente 2  $\mu$ M. En algunas realizaciones, si está presente piridoxal en el medio, este está presente a una concentración de menos de aproximadamente 15  $\mu$ M. En realizaciones particulares, si está presente piridoxal, este está presente a una concentración de menos de aproximadamente 15  $\mu$ M y compone menos de aproximadamente el 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio. En algunas realizaciones, si está presente piridoxal en el medio, este está presente a una concentración de menos de aproximadamente 15  $\mu$ M o compone menos de aproximadamente el 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio.

En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO. En ciertas realizaciones, la proteína de interés es un miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ , por ejemplo, una BMP, por ejemplo, una BMP-2.

En ciertas realizaciones, el medio contiene vitamina B6 a una concentración total de al menos aproximadamente 15  $\mu$ M. En algunas realizaciones, piridoxal, si está presente en el medio de cultivo, compone no más de aproximadamente el 55 % de la concentración molar total de vitamina B6 en el medio. En realizaciones más particulares, la vitamina B6 tiene una relación de piridoxal y piridoxina de menos de aproximadamente 1,2. En realizaciones aún más particulares, el medio no contiene piridoxal.

En una realización particular, la invención proporciona un procedimiento de producción de BMP-2 que incluye las etapas de cultivar una célula huésped adecuada que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína

BMP-2 en un medio de cultivo que comprende hierro a una concentración de al menos aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$  y vitamina B6 a una concentración de al menos aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ , y en el que si está presente piridoxal, este compone menos de aproximadamente el 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio y después recuperar una proteína BMP-2.

5 En algunas realizaciones, el medio también puede contener aminoácidos a una concentración total de al menos aproximadamente 20 mM. El medio puede contener L-cistina a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM. En realizaciones particulares, el medio también contiene ácido L-glutámico a una concentración de no más de aproximadamente 0,3 mM.

10 En ciertas realizaciones, el medio también puede contener un compuesto polianiónico, por ejemplo, dextrán sulfato, a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/l. En algunas realizaciones, el medio puede tener una osmolaridad inicial de entre aproximadamente 260 y 380 mOsm.

15 En ciertas realizaciones, los procedimientos de la invención son adecuados para cultivar células que han crecido en un proceso de realimentación por lotes. En realizaciones particulares, las células se cultivan en un biorreactor de tanque agitado con una capacidad de al menos aproximadamente 3 l. En realizaciones aún más particulares, la temperatura de cultivo se mantiene esencialmente constante. En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención usan medios de cultivo que sostienen una densidad celular de recogida de al menos aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células/ml.

20 En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un proceso o procedimiento para la producción de BMP-2, que incluye las etapas de cultivar una célula CHO que contiene una molécula de ADN que codifica una proteína BMP-2 en un medio de cultivo que comprende hierro a una concentración de al menos aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$ , aminoácidos a una concentración total de al menos aproximadamente 20 mM, L-cistina a una concentración de al menos 0,5 mM, dextrán sulfato a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/l y vitamina B6 a una concentración de al menos aproximadamente 15  $\mu\text{M}$  y en el que si está presente piridoxal, este compone menos de aproximadamente el 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio; y después recuperar una proteína BMP-2. En realizaciones particulares, el medio puede comprender además cobre a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM. En realizaciones aún más particulares, el medio puede comprender además cinc a una concentración de al menos aproximadamente 0,2  $\mu\text{M}$ .

30 En algunas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para producir BMP-2 que incluye la etapa de cultivar una célula huésped adecuada que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína BMP-2 en un medio de cultivo que comprende hierro a una concentración de al menos aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$  y vitamina B6 a una concentración de al menos aproximadamente 15  $\mu\text{M}$ , y en el que si está presente piridoxal, este compone menos de aproximadamente el 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio, y después recuperar una proteína BMP-2.

35 En algunas realizaciones, cualquiera de los procedimientos de la invención puede comprender además la etapa de purificar o aislar la proteína de interés, por ejemplo, BMP-2. En algunas realizaciones, la proteína purificada o aislada puede formularse, por ejemplo, como un producto farmacéutico. En realizaciones particulares, la purificación comprende una o más purificaciones de cromatografía en columna, por ejemplo, una purificación en columna de butil sepharose.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un producto producido por cualquiera de los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones, el producto puede usarse para tratar, o usarse para preparar un medicamento para tratar a un paciente, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que tenga un defecto, lesión, enfermedad o trastorno del tejido óseo, por ejemplo, promoviendo el crecimiento, la generación, la curación o la reparación del hueso.

45 En otro aspecto, la invención proporciona medio de cultivo celular sustancialmente como se describe en el presente documento. En realizaciones particulares el medio de cultivo celular es sustancialmente similar a los descritos en las Tablas 3 y 4.

### **Breve descripción de los dibujos**

50 La Figura 1 es una representación de la densidad celular a lo largo del tiempo en un proceso de realimentación por lotes en biorreactores de 3 l y 160 l.

La Figura 2 es una representación de la densidad celular a lo largo del tiempo en un proceso de realimentación por lotes en un biorreactor de 160 l para células cultivadas en medio con y sin hierro y cobre complementario.

La Figura 3 es una representación de la densidad de células viables a lo largo del tiempo en un proceso de realimentación por lotes en un biorreactor de 160 l para células cultivadas en medio complementado con hierro y cobre.

55 La Figura 4 es una serie de gráficas de barras que muestran la velocidad de crecimiento de las células cultivadas en matraces con diferentes medios y diferentes concentraciones de metales.

La Figura 5 es una serie de gráficas de barras que muestran la velocidad de crecimiento de células cultivadas en placas de cultivo con diferentes medios y diferentes concentraciones de hierro.

La Figura 6 es una representación de la densidad celular de recogida a lo largo del tiempo en un proceso de realimentación por lotes en biorreactores de 2500 l de células cultivadas de acuerdo con los procedimientos de la invención. La línea discontinua indica densidades de recogida promedio de procesos anteriores.

La Figura 7 es una representación el título de recogida de rhBMP-2 a lo largo del tiempo para los cultivos descritos en la Figura 6. La línea discontinua indica el título de recogida normalizado de rhBMP-2 promedio de procesos anteriores.

### **Realizaciones ejemplares**

- 10 Se ha descubierto que pueden conseguirse cultivos de alta densidad, uniformes, a una escala de fabricación cultivando células que expresan BMP-2 en medio complementado con hierro, cobre y cinc, que también contiene dextrán sulfato, en el que la vitamina B6 está presente en el medio a una concentración de al menos 15  $\mu\text{M}$ , y la relación de piridoxal y piridoxina en la vitamina B6 es menor de 1,2.

### **Medios**

- 15 El medio de cultivo adecuado para su uso en los procedimientos de la invención contendrá típicamente nutrientes necesarios para sostener el crecimiento de las células cultivadas, incluyendo vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos, una fuente de carbono (por ejemplo, dextrosa), y opcionalmente factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, insulina y transferrina, o antibióticos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende un medio basal, tal como, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), F-12 de Ham, un medio de Roswell Park Memorial Institute (RPMI), o combinaciones de los mismos.

- 20 En ciertas realizaciones, el medio de cultivo es un medio definido químicamente, es decir, está sin suero. Debe entenderse que en la presente solicitud, a no ser que se indique de otro modo, una concentración de un componente en el medio es una concentración de partida, es decir, la concentración de ese componente en medio nuevo, antes de aplicarse a las células cultivadas. Como se conoce en la técnica, las concentraciones de componentes particulares cambiarán a medida que las células se sometan a procesos metabólicos o a través de reacciones químicas espontáneas.

- 25 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende hierro a una concentración de al menos aproximadamente 2,25, 5, 5,5, 8, 10, 12, 14, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{M}$ , o más. En realizaciones más particulares, el hierro está presente a una concentración de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ . En realizaciones aún más particulares, el hierro está presente a una concentración de aproximadamente 5,5  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, el hierro está presente a una concentración de entre aproximadamente 5,5 y 15  $\mu\text{M}$ . Debería entenderse que para todos los límites numéricos que describen algún parámetro en la presente solicitud, por ejemplo "al menos", "menos de" o "más de", la descripción también describe necesariamente cualquier intervalo limitado por los valores indicados.

- 30 El medio de cultivo puede contener otros metales incluyendo cobre y cinc. El cobre puede estar presente a una concentración de al menos aproximadamente 5, 10, 12, 15, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250 nM, o más. En realizaciones particulares, el cobre está presente a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM. En realizaciones aún más particulares, el cobre está presente a una concentración de aproximadamente 74  $\mu\text{M}$ . El medio de cultivo también puede contener cinc a una concentración de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 4,2, 4,5, 4,8, 5,0  $\mu\text{M}$ , o más. En realizaciones particulares, el cinc está presente a una concentración de aproximadamente 4,2  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, el medio de cultivo contiene hierro y cobre como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, el hierro está presente a una concentración de al menos aproximadamente 2,25, 5, 5,5, 8, 10, 12, 14, 15, 20, 25, 30  $\mu\text{M}$  y el cobre a una concentración de al menos aproximadamente 5, 10, 12, 15, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250 nM. En ciertas realizaciones, el medio de cultivo contiene hierro, cobre y cinc como se ha descrito anteriormente. En consecuencia, en algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende hierro a una concentración de entre aproximadamente 2,5  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$ , cobre a una concentración de entre aproximadamente 10 nM y 150 nM, y cinc a una concentración de entre aproximadamente 2,1  $\mu\text{M}$  y 8,4  $\mu\text{M}$ . En realizaciones más particulares, el medio de cultivo comprende hierro a una concentración de al menos aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , cobre a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM, y cinc a una concentración de al menos aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ .

- 35 El medio de cultivo para uso en los procedimientos de la invención sostiene una alta densidad celular de recogida uniforme durante, por ejemplo, cultivo de realimentación por lotes. En algunas realizaciones, los medios de cultivo para uso en el procedimiento de la invención sostienen una densidad de recogida de al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2,0 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $3,0 \times 10^6$ ,  $3,5 \times 10^6$ ,  $4,0 \times 10^6$ ,  $4,1 \times 10^6$ ,  $4,2 \times 10^6$ ,  $4,3 \times 10^6$ ,  $4,5 \times 10^6$ ,  $4,8 \times 10^6$ ,  $5,0 \times 10^6$ ,  $5,5 \times 10^6$ ,  $6,0 \times 10^6$ ,  $6,5 \times 10^6$ ,  $7,0 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $8,0 \times 10^6$ ,  $8,5 \times 10^6$ ,  $9,0 \times 10^6$ ,  $9,5 \times 10^6$  células/ml, o más. En realizaciones más particulares, el medio de cultivo sostiene una densidad de recogida de aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  a  $7,0 \times 10^6$  células/ml. En ciertas realizaciones, para conseguir estas densidades de recogida, las células se siembran a una densidad de menos de aproximadamente  $0,037 \times 10^6$ ,  $0,075 \times 10^6$ ,  $0,15 \times 10^6$ ,  $0,3 \times 10^6$ ,  $0,6 \times 10^6$ ,  $1,2 \times 10^6$ , o  $2,4 \times 10^6$

células/ml, o más. En realizaciones particulares, las células se siembran a una densidad de aproximadamente  $0,6 \times 10^6$  células/ml.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo incluye vitamina B6, que se sabe que aparece en varias formas adecuadas para su uso en cultivo celular, incluyendo piridoxina, piridoxal, piridoxamina, piridoxina 5'-fosfato, piridoxal 5'-fosfato, piridoxamina, 5-fosfato y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo contiene al menos una vitamina B6 seleccionada de piridoxina, piridoxamina, piridoxina 5'-fosfato, piridoxamina 5'-fosfato, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, está presente vitamina B6 en el medio de cultivo a una concentración total de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50  $\mu\text{M}$ , o más. En realizaciones particulares, la vitamina B6 está presente a una concentración de al menos aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ . En realizaciones aún más particulares, la vitamina B6 está presente a una concentración de aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ . En ciertas realizaciones, el piridoxal, si está presente, compone no más de aproximadamente 55, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,1 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio de cultivo. En algunas realizaciones, si está presente en el medio de cultivo, el piridoxal está presente a una concentración de menos de aproximadamente 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones el medio de cultivo tiene una relación de piridoxal y piridoxina de entre 0 y 1,2. En realizaciones más particulares, la relación de piridoxal y piridoxina en el medio de cultivo es de menos de 1,2, por ejemplo, menos de aproximadamente 1,1, 1,0, 0,9, 0,7, 0,5, 0,4, 0,3, o 0,1. En realizaciones aún más particulares, el medio esencialmente no contiene piridoxal.

El medio de cultivo para uso en los procedimientos de la invención típicamente proporcionará aminoácidos para sostener el crecimiento de las células cultivadas y producción de la proteína de interés. En algunas realizaciones, los aminoácidos pueden estar presentes en el medio de cultivo en proporciones definidas, por ejemplo, como se describe en las Tablas 3 o 4. Como se conoce en la técnica, pueden usarse hidrolizados de preparaciones proteicas (por ejemplo, peptona, bactopectona, triptona, hidrolizado de caseína o hidrolizado de soja soytone) como fuentes de aminoácidos. En algunas realizaciones, el medio que contiene proporciones definidas de aminoácidos puede complementarse con hidrolizados proteicos indefinidos. Como alternativa, en algunas realizaciones, los hidrolizados indefinidos actúan como la fuente primaria de aminoácidos. En realizaciones particulares en las que los hidrolizados son la fuente primaria de aminoácidos, el medio puede complementarse con uno o más aminoácidos particulares según sea necesario. En algunas realizaciones, el medio de cultivo tiene una concentración de aminoácidos total de al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40 mM, o más. En realizaciones particulares, el contenido de aminoácidos total del medio es de al menos aproximadamente 20 mM. En realizaciones aún más particulares, la concentración de aminoácidos total es de aproximadamente 30 mM.

Las proporciones de aminoácidos y concentraciones de aminoácidos individuales pueden ajustarse para adecuarse a las necesidades metabólicas de la célula huésped dependiendo de, por ejemplo, la velocidad de crecimiento de las células, el perfil metabólico de las células, las proporciones de los aminoácidos en la proteína recombinante que se produce, o para mejorar la calidad de la proteína recombinante producida. Por ejemplo, las partes de rhBMP-2 producidas en células CHO que están en un dímero dissociable con dímeros de sulfhidrilo cisteinilados o libres se ven afectadas por las concentraciones de L-cistina y L-ácido glutámico en el medio, como se desvela, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.830.761. En consecuencia, en algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende L-cistina a una concentración de al menos aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 mM o más. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el medio comprende L-cistina a una concentración de aproximadamente 0,2-4,0 mM. En realizaciones más particulares, el medio comprende L-cistina a una concentración de aproximadamente 0,5-4,0 mM. En realizaciones aún más particulares, el medio comprende L-cistina a una concentración de aproximadamente 0,7-3,0 mM. En algunas realizaciones, L-ácido glutámico está presente en el medio de cultivo a una concentración de al menos aproximadamente 0,023, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 mM, o más. En realizaciones particulares, el medio de cultivo comprende L-cistina a una concentración de al menos aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,05, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 mM o más y L-ácido glutámico a una concentración de como máximo aproximadamente 0,023, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 mM. En realizaciones más particulares, L-cistina está presente en el medio de cultivo a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mM y L-ácido glutámico está presente en el medio de cultivo a una concentración de como máximo aproximadamente 0,3 mM. En realizaciones aún más particulares, L-cistina está presente en el medio de cultivo a una concentración de aproximadamente 0,7-3,0 mM y L-ácido glutámico está presente en el medio de cultivo a una concentración de como máximo aproximadamente 0,2 mM.

El medio de cultivo puede comprender además un agente polianiónico. Se ha planteado la teoría, aunque no se ha tenido en cuenta, de que los agentes polianiónicos compiten con restos en la superficie celular de células por la unión con dominios de unión de tipo molécula de heparina en proteínas recombinantes secretadas, por ejemplo, el extremo N terminal de un monómero o dímero de hBMP-2 maduro (escindido proteolíticamente). Cuando una proteína secretada está unida a una superficie celular, el rendimiento de la proteína en solución se reduce. Al competir con estos elementos en una superficie celular, los agentes polianiónicos aumentan la concentración de la proteína libre (no asociada a célula) en el medio de cultivo. Los ejemplos de agentes polianiónicos incluyen heparina, heparín sulfato, pentosán sulfato, dextrano, dextrán sulfato, ácido hialurónico, condroitina, condroitín sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato, hexuronal-hexosaminoglucano sulfato, inositol hexasulfato y sacarosa octasulfato. En ciertas realizaciones, el agente polianiónico es capaz de unirse con el extremo N terminal de un

monómero de hBMP-2 maduro con afinidad micromolar o nanomolar. En algunas realizaciones, el agente polianiónico es un polímero natural sulfonado, por ejemplo, glucosaminoglucano (GAG) o derivado del mismo, en el que el polímero está al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 50 %, o más, sulfonado. En algunas realizaciones, el agente polianiónico está presente a una concentración de al menos aproximadamente 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 mg/l, o más.

En realizaciones particulares, el agente polianiónico es dextrán sulfato. En realizaciones más particulares, el dextrán sulfato tiene un peso molecular de entre aproximadamente 5.000 y 500.000 g/mol. En realizaciones aún más particulares, el dextrán sulfato tiene un peso molecular de aproximadamente 7.000 g/mol. En algunas realizaciones, el dextrán sulfato está presente a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/l. En realizaciones más particulares, el dextrán sulfato está presente en una concentración de aproximadamente 400 mg/l. El uso de dextrán sulfato en medio de cultivo para producir rhBMP-2 se describe adicionalmente en las Patentes de Estados Unidos N° 5.318.898 y 5.516.654.

El medio de cultivo puede manipularse para mantener ciertos parámetros de los medios, por ejemplo, pH, O<sub>2</sub> disuelto, u osmolaridad. En algunas realizaciones, el medio de cultivo se mantiene en un intervalo de osmolaridad particular. En otras realizaciones, el medio de cultivo se ajusta a una osmolaridad de partida particular. En realizaciones particulares, las osmolaridad de partida del cultivo está entre aproximadamente 260 y 380 mOsm. En realizaciones más particulares, la osmolaridad de partida están entre aproximadamente 280 y 360 mOsm.

En ciertas realizaciones, el medio de cultivo comprende hierro a una concentración de al menos aproximadamente 2,5 µM, cobre a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM, aminoácidos a una concentración total de al menos aproximadamente 20 mM, dextrán sulfato a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/l y vitamina B6 a una concentración de al menos aproximadamente 15 µM, en el que la vitamina B6 tiene una relación de piridoxal y piridoxina de menos de aproximadamente 1,2. En realizaciones más particulares, el medio de cultivo comprende además cinc a una concentración de al menos aproximadamente 0,2 µM. En realizaciones muy particulares, se describen medios de cultivo para uso en la invención en la Tabla 3 y Tabla 4, es decir, medio A1, A2, B1 o B2. En realizaciones aún más particulares, el medio es B2. En ciertas realizaciones el medio es sustancialmente similar a B2. Por "sustancialmente similar", se entiende que no está presente ningún componente del medio a una concentración mayor de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 o 3,0 veces diferente (es decir, aumento o reducción) que la del medio B2 en la Tabla 4.

En algunas realizaciones, el uso de un componente indefinido puede ser aceptable y el medio puede complementarse con hasta aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 5, 10 % o más suero bovino fetal (FBS). Sin embargo, incluso aunque se usa suero ampliamente para cultivo celular de mamíferos, existen varios problemas asociados con su uso, como se analiza en Freshney Culture of Animal Cells, John Wiley & Sons, Nueva York, 91-99 (1994). Por ejemplo, el suero contiene muchos componentes no identificados y por lo tanto no está químicamente definido. De hecho, la composición del suero varía entre lotes, haciendo la normalización difícil. Adicionalmente, el suero puede contener factores inhibidores del crecimiento, dando como resultado crecimiento subóptimo. Finalmente, el suero puede contener virus u otros patógenos, haciendo tanto la producción como la aprobación reguladora más difíciles. En consecuencia, se prefieren medios sin suero para su uso en los procedimientos de la invención.

### Proteínas

Los procedimientos proporcionados por la invención pueden usarse para producir una diversidad de proteínas. En ciertas realizaciones, la proteína es un factor de crecimiento. En realizaciones particulares el factor de crecimiento es un miembro de la superfamilia de TFG-β. En realizaciones más particulares, el miembro de la familia TGF-β es una proteína morfogenética del hueso (BMP).

Las BMP son una familia altamente homóloga de proteínas, y se separan en subgrupos basándose en niveles de homología aún mayores. Algunos subgrupos importantes incluyen: BMP-2 y BMP-4; BMP-5, BMP-6, y BMP-7; y BMP-12, BMP-13, y MP-52. En particular, las BMP comparten un patrón de identificación de restos de cisteína en la región carboxilo terminal de la proteína, que son necesarios para la actividad de BMP. En ciertas realizaciones, la proteína realizada por los procedimientos de la invención es una BMP seleccionada de BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, BMP-16, BMP-17, BMP-18, y MP-52, incluyendo combinaciones y heterodímeros de las mismas. Típicamente, la BMP se refiere a una molécula dimérica con enlaces disulfuro. En ciertas realizaciones, una BMP puede ser monomérica. En algunas realizaciones, la referencia a una BMP incluye secuencias al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o más idénticas al nivel de aminoácidos a la secuencia de la región madura (que carece de un prodominio) de una BMP conocida y que conserva la actividad biológica (por ejemplo, actividad formadora de tejido de tipo hueso, cartílago o ligamento/tendón). En algunas realizaciones, una BMP puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, o más sustituciones de aminoácidos de una secuencia de BMP conocida. Las BMP se conocen en la técnica y se han identificado a partir de una diversidad de especies incluyendo mamíferos tales como ser humano, gato, pollo, chimpancé, vaca, perro, cabra, caballo, macaco, ratón, cerdo, conejo, rata y oveja. Pueden encontrarse descripciones de BMP, incluyendo, por ejemplo, secuencias de proteínas y ácidos nucleicos y procedimientos de producción, en las siguientes publicaciones: BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6, BMP-6, y BMP-7 (desveladas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.013.649; 5.116.738; 5.106.748; 5.187.076; y

5.141.905), BMP-8 (desvelada en el documento PCT WO 91/18098), BMP-9 (desvelada en el documento PCT WO 93/00432), BMP-10 (desvelada en el documento PCT WO 94/26893), BMP-11 (desvelada en el documento PGT WO 94/26892), BMP-12 y BMP-13 (desveladas en el documento PCT WO 95/16035), BMP-15 (desvelada en la Patente de Estados Unidos N° 5.635.372), BMP-16 (desvelada en la Patente de Estados Unidos N° 6.331.612), MP-52 (desvelada en el documento PCT WO 93/16099), y BMP-17 y BMP-18 (desveladas en la Patente de Estados Unidos N° 6.027.917). Debería entenderse que una referencia de estas proteínas incluye variantes, variantes alélicas, fragmentos de, y BMP mutantes, incluyendo pero sin limitación mutantes de delección, mutantes de inserción y mutantes de sustitución. En particular, debería entenderse que la referencia a cualquier BMP particular incluye fragmentos con truncamiento N terminal en los que al menos 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, o más restos se han retirado del extremo N terminal de la proteína madura.

En realizaciones particulares de invención, la BMP es una BMP-2. En algunas realizaciones, la BMP-2 es BMP-2 humana (hBMP-2). En realizaciones aún más particulares, la hBMP-2 es hBMP-2 madura (es decir, Q283-R396 del número de referencia de NCBI NP\_001191) y posee actividad formadora de hueso y/o cartílago. En realizaciones particulares, la hBMP-2 es al menos aproximadamente 88, 89, 90, 92, 94, 95, 96, 98, 99, 99,9 % idéntica al nivel de aminoácidos a la hBMP-2 madura (Q283-R396 del número de referencia de NCBI NP\_001191). En consecuencia, en algunas realizaciones, la hBMP-2 madura puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, la BMP-2 producida es dimérica. En algunas realizaciones, la BMP-2 producida es monomérica. En ciertas realizaciones, una BMP-2 tiene un truncamiento N terminal de al menos 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13 o más restos del extremo N terminal de al menos una subunidad de la proteína dimérica. Se conocen en la técnica ensayos con respecto a la actividad de BMP-2 y se desvelan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.649.

La BMP-2 se ha identificado en numerosas especies. Véase, por ejemplo, Tabla 1 que enumera el Entrez GeneID del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para BMP-2 de varias especies. Estos GeneID pueden usarse para recuperar secuencias de ARNm o proteínas anotadas públicamente disponibles, por ejemplo, en el portal web del NCBI, que puede encontrarse en el siguiente localizador uniforme de recursos (URL): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>. Como una ilustración, el GeneID para BMP-2 humana puede usarse para recuperar las siguientes secuencias de referencia: NM\_001200.2 (ARNm) y NP\_001191.1 (proteína). De forma similar para ratón, las secuencias de referencia de BMP-2 que pueden recuperarse incluyen NM\_007553.2 (ARNm) y NP\_031579.2 (proteína).

Tabla 1

Especie	GeneID	Especie	GeneID
Ser humano	650	Vaca	615037
Ratón	12156	Cerdo	494462
Pollo	378779	Chimpancé	458090
Rata	29373	Perro	477162
Rana	548717	Macaco	718330
Oveja	443173	Conejo	100009349

Aislamiento y usos

Como se conoce en la técnica, las proteínas morfogenéticas del hueso tales como BMP-2 son útiles como productos terapéuticos basados en proteínas. En consecuencia, los procedimientos de la invención pueden comprender además la etapa de purificación o aislamiento de la proteína recupera del cultivo. La BMP-2 puede purificarse por una diversidad de medios conocidos en la técnica. En realizaciones particulares, la purificación comprende una o más purificaciones por cromatografía en columna, por ejemplo, una purificación de resina de butil sepharose. En realizaciones más particulares, la columna de butil sepharose comprende una resina de butilamina acoplada a sepharose activada por CNBr, por ejemplo, sepharose 4B. En algunas realizaciones, la purificación puede comprender además una etapa de purificación en columna en una resina de tipo heparina, por ejemplo, una resina de sulfato de CELLUFINE™. Por ejemplo, puede aplicarse medio acondicionado de las células cultivadas, que contiene la BMP-2 a una columna que contiene resina de tipo heparina, se obtiene un eluato que contiene la BMP-2 de la columna, y después se aplica a una segunda columna, tal como una columna de butil sepharose. Es posible purificación adicional como se describe, por ejemplo, en la Publicación Internacional N° WO 99/31120, particularmente las páginas 3-7 de la misma.

Una vez purificados, los productos de los procedimientos de la invención pueden formularse adicionalmente, por ejemplo, como productos farmacéuticos. Para una revisión general de vehículos farmacéuticos para BMP, véase,

por ejemplo, Seeherman y Wozney Cytokine Growth Factor Rev. 16(3): 329-45 (2005) o Patente de Estados Unidos N° 5.385.887. Los productos de los procedimientos de la invención pueden usarse para tratar, o usarse para preparar un medicamento para tratar, un defecto, lesión, enfermedad o trastorno del tejido óseo, por ejemplo, promoviendo el crecimiento, la generación, la curación o la reparación del hueso.

5 Células

Puede usarse una amplia diversidad de células para producir una proteína recombinante por los procedimientos proporcionados por la invención. Cualquier célula que pueda transformarse con ADN recombinante para expresar una proteína de interés, por ejemplo, una BMP, puede usarse en los procedimientos de la invención. Las células pueden ser de una diversidad de especies, incluyendo nematodos, gusanos, insectos, anfibios o mamíferos, por ejemplo, de una fuente humana, de primate, ovina, bovina, porcina, equina, felina, canina o de roedor. En realizaciones particulares, las células son de ser humano o roedor. En realizaciones más particulares, las células son de hámster.

Se conocen bien en la técnica y están ampliamente disponibles líneas celulares adecuadas para su uso en los procedimientos de la invención. Pueden obtenerse varias líneas celulares adecuadas de depósitos tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA. Las líneas celulares adecuadas de la invención incluyen una célula COS, una célula CHO, una célula BHK, una célula Balb/c 3T3, una célula FRhL-2, una célula SP2/0, una célula NSO, una célula TM4, una célula CV1, una célula MDCK, una célula BRL, una célula Vero-76, una célula HeLa, una célula MDCK, una célula HepG2, o una célula 293. En realizaciones particulares, la célula es una célula COS, una célula CHO, una célula BHK, una célula Balb/c 3T3, o una célula 293. En realizaciones más particulares, la célula es una célula CHO. La célula CHO puede modificarse para aumentar el título celular y/o el rendimiento proteico. En algunas realizaciones, la célula CHO puede tener expresión reducida o no tener el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR; GeneID de ratón 13361), por ejemplo, la célula CHO puede ser heterocigota u homocigota para un alelo hipomórfico (función reducida), nulo (no funcional), o dominante negativo (nulo e inhibe las formas funcionales de la enzima), de DHFR y la proteína de interés puede cotransfectarse en una construcción que contiene un gen de DHFR funcional.

Biorreactor y condiciones

Las células para uso en los procedimientos de la invención pueden cultivarse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, como se analiza en Warnock y Al-Rubei Biotech. Appl. Biochem. 45: 1-12 (2006). Típicamente, las células se cultivan en un biorreactor. Los biorreactores pueden ser de cualquier tamaño. En algunas realizaciones, el biorreactor es de al menos aproximadamente 1 l; 3 l; 20 l; 40 l; 80 l; 100 l; 160 l; 1.900 l; 2.500 l; 12.000 l; 20.000 l; 40.000 l, o más. Un biorreactor puede sostener el crecimiento de células en suspensión (es decir, crecimiento independiente de anclaje) o anclarse en un sustrato. El crecimiento dependiente de anclaje puede incluir el uso de microvehículos para, por ejemplo, proporcionar una gran relación de área de superficie con respecto a volumen.

En realizaciones particulares de la invención, las células se cultivan en suspensión; es decir, sin una superficie de anclaje. Se conocen bien en la técnica modalidades de cultivo independiente de anclaje e incluyen cultivo en, por ejemplo, biorreactores de tanque agitado y biorreactores de transporte aéreo. En realizaciones particulares, el biorreactor es un biorreactor de tanque agitado. Las células cultivadas en un biorreactor particular, a su vez, pueden cultivarse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo procedimientos de cultivo de realimentación por lotes (descrita adicionalmente posteriormente, véase también Drapeau y col., Cytotechnology 15(1-3): 103-9 (1994)), semicontinuos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.672.502; 6.924.124; o 7.332.303), o perfusión (empleando un dispositivo de retención de células de modo que los residuos puedan retirarse del biorreactor cuando se añade medio nuevo, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.814.278 o 6.607.910). En algunas realizaciones particulares, las células se cultivan por un proceso de realimentación por lotes. En realizaciones más particulares las células se cultivan a una temperatura esencialmente constante. En algunas realizaciones, una temperatura de cultivo adecuada puede seleccionarse de aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 °C. En algunas realizaciones, la temperatura esencialmente constante puede ser un intervalo de temperaturas estrecho, tal como 35-39 °C o 36-38 °C. En realizaciones más particulares, las células se cultivan a una temperatura constante de aproximadamente 37 °C.

Los biorreactores pueden mantener diversos parámetros fisiológicos del medio de cultivo incluyendo, por ejemplo, oxigenación (O<sub>2</sub> disuelto), pH, osmolaridad, temperatura, luz y la concentración de nutrientes particulares (por ejemplo, glucosa o aminoácidos). En ciertas realizaciones, el biorreactor controla y mantiene la temperatura, pH y contenido de O<sub>2</sub> disuelto. En algunas realizaciones, la glucosa se suministra en lotes. Por ejemplo, las células se cultivan en un biorreactor por realimentación por lotes. En realizaciones particulares, una parte del cultivo total (es decir, células y medio) se retira periódicamente (por ejemplo, se recoge) y se reemplaza con medio nuevo. En algunas realizaciones, se retiran al menos aproximadamente 10, 25, 50, 75, 80, 85, 90, 95, 99 %, o más del cultivo total y se reemplaza con medio nuevo. En realizaciones más particulares, se retira y se reemplaza al menos aproximadamente el 75 % del cultivo total. En realizaciones particulares, una parte del medio de cultivo celular se retira cada aproximadamente 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, o 48 horas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más días. En realizaciones más particulares, una parte del medio de cultivo se retira y se reemplaza cada 3 días. En otras

realizaciones, una parte del cultivo total se retira y se reemplaza aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más ciclos de división celular. Por "ciclo de división celular", se entiende que el tiempo de duplicación promedio de células cultivadas durante el crecimiento exponencial, es decir, en medio de cultivo rico, en ausencia de, por ejemplo, inhibición de contacto.

- 5 En ciertas realizaciones, el título celular y/o rendimiento proteico pueden potenciarse limitando o controlando la producción de lactato por las células. La producción de lactato puede controlarse limitando el suministro de glucosa a las células cultivadas de una manera restringida, por ejemplo, como se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0070013, publicada el 31 de marzo de 2005 (véase también Patente de Estados Unidos N° 7.429.491). Cuando exista cualquier conflicto entre un documento al que se hace referencia y la presente solicitud, la presente solicitud tendrá preferencia.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: problema de aumento de escala durante la producción de rhBMP-2

15 Durante el desarrollo de un proceso de producción de BMP-2, se observó un problema de aumento de escala con cultivos de alta densidad celular de células CHO que coexpresan rhBMP-2 y dihidrofolato reductasa (DHFR) (conocidas en el presente documento como células EMC-G5) en un biorreactor de 1.900 litros. Se inocularon cultivos de alta densidad celular a  $0,60 \times 10^6$  células/ml para un lote de 3 días, o  $0,30 \times 10^6$  células/ml para un lote de 4 días. Durante el primer pase del proceso de realimentación por lotes, la densidad celular final alcanzó habitualmente  $3,0 \times 10^6$  células/ml, pero la densidad celular final de los siguientes pases se redujo progresivamente. Por ejemplo, tres pases darían como resultado densidades celulares de recogida de  $3,0 \times 10^6$ ,  $1,6 \times 10^6$  y  $1,0 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. Dichas velocidades de crecimiento decrecientes dieron como resultado cantidades menores de proteína BMP-2 en el medio de cultivo y la productividad global era menor de lo deseado. Las velocidades de crecimiento decrecientes no eran reproducibles a la escala de 3 litros. Se usó un biorreactor de 160 litros como un modelo para investigar este problema. La densidad celular de recogida decreciente se vio en el biorreactor de 160 l, como se muestra en la Figura 1.

25 Experimentos adicionales mostraron la misma dificultad. En un ensayo, el primer pase de alta densidad alcanzó una densidad celular final de  $2,99 \times 10^6$ , mientras que el segundo pase alcanzó solamente  $2,28 \times 10^6$  células/ml. El reactor se inoculó de nuevo en condiciones de control con un prepase, después el primer y segundo pases de alta densidad alcanzaron densidades celulares finales de  $2,65 \times 10^6$  y  $1,49 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. Ambos experimentos de control demostraron el problema de aumento de escala en el que el primer pase de suministro alto alcanza una densidad final alta pero la velocidad de crecimiento del siguiente pase se reduce significativamente. Los datos de título de BMP-2 y productividad específica mostraron tendencias similares.

35 La adición de elementos traza D ("traza D") al medio de crecimiento eliminó los problemas de aumento de escala en el medio de cultivo. La traza D consiste en hierro  $3 \mu\text{M}$ , cinc  $3 \mu\text{M}$  y cobre  $0,03 \mu\text{M}$ . Con Traza D, los lotes de alto suministro (3 días y 4 días) alcanzaron uniformemente densidades de recogida de  $3,0 \times 10^6$  células/ml o superiores. La velocidad de crecimiento y productividad específica permaneció también alta. Esto indica que las trazas D afectaron positivamente a las características de cultivo celular. Los resultados de un experimento en el que las células se cultivaron en medios con y sin hierro y cobre complementarios se muestran en la Figura 2.

40 Al intentar descubrir qué componente de los traza D es más importantes, se ensayó medio complementado solamente con cobre (no mostrado). Después de que el primer lote de alto suministro alcanzó más de  $3,0 \times 10^6$  células/ml, los siguientes dos lotes mostraron velocidades de crecimiento decrecientes, similares al comportamiento de los lotes de control (sin traza D). Las velocidades de crecimiento decrecientes de los tres pases de alto suministro muestran que el cobre solo no fue eficaz en la mejora del problema de aumento de escala.

#### Ejemplo 2: el dextrán sulfato elimina la anomalía del cromatograma

45 Durante estas evaluaciones de metales traza, se observó un saliente anómalo en el segundo pico del segundo cromatograma de exclusión por tamaño (CEX) de rhBMP-2 producido en cultivos de alta densidad previos. Se descubrió que un bajo nivel de descarga de sulfato en el medio (10 mg/l en lugar de 200 mg/l) dará como resultado un porcentaje mucho mayor de pico saliente después de incubación con fosfato (aproximadamente 12 %, frente a aproximadamente 4 %, respectivamente). Un experimento de respuesta a dosis de dextrán sulfato mostró que niveles mayores de dextrán sulfato en el medio de cultivo celular redujeron la cantidad de pico saliente observado de una manera dependiente de dosis. Se ha mostrado previamente que el dextrán sulfato aumenta el rendimiento proteico durante la producción de BMP-2. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.318.898 y 5.516.654.

#### Ejemplo 3.1: título celular decreciente en medios complementados con metales

55 Cuando se enriquecieron las concentraciones de hierro y cobre en el medio de cultivo, se observó ocasionalmente que el crecimiento celular no era estable, incluso en biorreactores a escala de laboratorio. Véase Figura 3. Se planteó la hipótesis de que los metales adicionales pueden interactuar con otro componente u otros componentes del medio y dará como resultado crecimiento de cultivo inestable.

En experimentos preliminares en matraces de cultivo tisular (Figura 4), se sembraron células a una densidad de  $0,08 \times 10^6$  células/ml y se cultivaron durante cuatro días. El medio A1 (140) complementado con cobre o cinc solamente sostuvo tasas de crecimiento comparables al medio no complementado, mientras que la complementación con traza D (hierro, cobre y cinc adicionales) dio como resultado menores velocidades de crecimiento. Las células también mostraron una reducción dependiente de dosis de la velocidad de crecimiento cuando el medio A1 se complementó con hierro solamente. Las células cultivadas en medio B1 (248) mostraron velocidades de crecimiento reducidas similares a las células cultivadas en medio A1 complementado con hierro.

### Ejemplo 3.2: la interacción de piridoxal-hierro da como resultado velocidad de crecimiento reducida

En un estudio adicional, el medio A1, que indujo el defecto en la velocidad de crecimiento se comparó con el medio A2, que no inducía el defecto en la velocidad de crecimiento. Se observó que el medio A1 contiene principalmente piridoxal, mientras que el medio A2 contiene solamente piridoxina. Se cultivaron células BMP-2 EMC G5 en medio A1 y medio A2 a diferentes concentraciones de hierro y con y sin piridoxal. El contenido de hierro y vitamina B6 de los medios A1 y A2 se resume en la Tabla 2.

Tabla 2

Medios	Hierro ( $\mu\text{M}$ )	Piridoxal ( $\mu\text{M}$ )	Piridoxina ( $\mu\text{M}$ )
Medio A1, Fe 3 $\mu\text{M}$	3	10	0,15
Medio A1, Fe 12 $\mu\text{M}$	12	10	0,15
Medio A2, Fe 3 $\mu\text{M}$	3	0	10
Medio A2, Fe 12 $\mu\text{M}$	12	0	10
Medio A2, Fe 3 $\mu\text{M}$ , Piridoxal 2,5 mg/l	3	12	10
Medio A2, Fe 12 $\mu\text{M}$ , Piridoxal 2,5 mg/l	12	12	10

Las células se cultivaron en placas de cultivo tisular en un incubador mantenido a 37 °C con CO<sub>2</sub> 7 % durante 3 días. Las células se sembraron a  $0,15 \times 10^6$  células/ml y se recogieron al final de 3 días. Las células del día 3 se contaron en un contador CASY para obtener la densidad celular final (en unidades de  $10^6$  células/ml). La velocidad del crecimiento se calculó después por la siguiente ecuación: velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) =  $\ln(\text{densidad celular final}/\text{densidad celular inicial})/\text{tiempo de cultivo (horas)}$ . Los resultados se muestran en la Figura 5.

Se descubrió que el piridoxal, pero no la piridoxina, eran el componente que interactuaba con el hierro y provocaba rendimiento de cultivo irregular. La piridoxina es el precursor del piridoxal. Son intercambiables como vitamina B6 en medio de cultivo y actúan como cofactores para transaminación, descarboxilación y desaminación. Para la mayoría de los procesos de cultivo celular, no supone ninguna diferencia si el medio contiene piridoxina, piridoxal, o ambos. Sin embargo, el piridoxal a ciertas concentraciones interactúa con la cantidad aumentada de hierro y afecta negativamente al proceso de producción de rhBMP-2. Como se muestra en la Figura 5, el medio A1 induce un defecto de tasa de crecimiento en relación con el medio A2, que puede empeorarse por hierro adicional. Cuando se complementa con piridoxal, el medio A2 induce un defecto de velocidad de crecimiento de una manera dependiente de dosis de hierro. Por lo tanto, la combinación de mayor concentración de hierro y mayores concentraciones o proporciones de piridoxal en el medio de cultivo da como resultado crecimiento de cultivo inestable y subóptimo.

### Ejemplo 4: aumento robusto en la densidad celular y título proteico

Después de una modificación adicional del medio (que da como resultado medio B2), que eliminó el piridoxal del medio, el crecimiento celular y la productividad de BMP-2 fueron uniformes, y mostraron un aumento doble en la productividad en biorreactores a pequeña escala así como en biorreactores a escala comercial en relación con procesos anteriores. Véase Figura 6 y Figura 7. Por lo tanto, las modificaciones al medio de cultivo descrito en la presente solicitud eliminan los defectos del crecimiento que aparecieron durante el aumento de escala de la producción de proteína recombinante hasta una escala comercial, dando como resultado aumentos sustanciales en el rendimiento de proteína recombinante de alta calidad.

La línea celular usada para producir proteína morfogenética del hueso humana recombinante 2 (rhBMP-2) en la fabricación fue una línea de Ovario de Hámster Chino (CHO) que coexpresa BMP-2 y DHFR, denominada en el presente documento EMC-G5. Las células se cultivaron en biorreactores de volumen de trabajo de 2.500 litros inoculadas a densidades celulares diana de  $0,6 \times 10^6$  células/ml. Las células se cultivaron en Medio B2 (véase Tabla 4). La temperatura de los cultivos se mantuvo a 37 °C. Se permitió que el pH del cultivo se redujera durante las primeras horas de un pase hacia abajo hasta un punto establecido de 7,10 y se mantuvo ahí mediante la adición de

5 agente de valoración. El pH inicial del medio B2 fue de ~7,30. Los cultivos se pasaron en serie a cada densidad celular de inóculo para dos pases de 3 días y dos pases de 4 días. Las sondas de pH se calibraron en línea de acuerdo con mediciones de un analizador de gas sanguíneo (BGA). Las densidades y viabilidades celulares se determinaron por el recuento manual usando microscopio, usando la exclusión con azul de tripano para determinar la viabilidad. Se recogió medio acondicionado de todos los cultivos después de cada pase por centrifugación y después se filtró.

Las Tablas 3 y 4 muestran las formulaciones de medios usados en estos estudios.

Tabla 3

	Componente	Medio A1	Medio A2
Aminoácidos		mM	mM
	Ala	0,200	0,100
	Arginina	2,520	0,550
	Asparagina	0,800	0,450
	Ácido aspártico	0,200	0,250
	Cys HCl, H <sub>2</sub> O	0,400	0,400
	Cistina 2HCl	1,400	1,400
	Ácido glutámico	0,200	0,100
	Glutamina	8,000	8,000
	Glicina	0,400	0,100
	His HCl H <sub>2</sub> O	0,220	0,175
	isoleucina	0,800	0,450
	leucina	0,800	0,650
	Lisina HCl	0,800	0,500
	Metionina	0,200	0,200
	Fenilalanina	0,400	0,250
	prolina	0,600	0,300
	serina	2,000	2,000
	treonina	0,800	0,400
	triptófano	0,080	0,080
	tirosina 2Na	0,400	0,200
	L-valina	0,800	0,400
Vitaminas		μM	μM
	Biotina	0,830	0,850
	D-pantotenato cálcico	4,700	4,700
	cloruro de colina	64,600	64,500
	ácido fólico	6,000	6,000
	I-inositol	70,000	70,000

ES 2 543 061 T3

(Continuación)

	Componente	Medio A1	Medio A2
	nicotinamida	16,500	16,500
	piridoxina HCl	0,150	10,000
	piridoxal HCl	10,000	0,000
	riboflavina	0,530	0,550
	tiamina HCl	6,500	6,500
	vitamina B12	0,500	0,500
Otros componentes		μM	μM
	D-Glucosa	7,7 g/l	7,2 g/l
	Piruvato sódico	500,000	500,000
	ácido linoleico	0,150	0,075
	ácido tióctico	0,500	0,250
	putrescina 2HCl	12,900	12,900
Sales inorgánicas		mM	mM
	NaCl	94,860	94,860
	KCl	4,200	4,200
	CaCl <sub>2</sub>	1,050	1,050
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,500	0,500
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,450	0,450
	MgCl <sub>2</sub>	0,300	0,300
	MgSO <sub>4</sub>	0,400	0,400
		μM	μM
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	0,002
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,250	2,250
	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	0,125	
	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,500	0,400
Otras adiciones			
	PVA	2,4 g/l	2,4 g/l
	Insulina	10 mg/l	10 mg/l
	Hidrocortisona	72 mg/l	72 mg/l
	NaHCO <sub>3</sub>	2,44 g/l	2,44 g/l
	Dextrán Sulfato	200 mg/l	200 mg/l

ES 2 543 061 T3

(continuación)

	Componente	Medio A1	Medio A2
	Selenita Sódica	0,029 mM	0,029 mM

Tabla 4

	Componente	Medio B1	Medio B2
Aminoácidos		mM	mM
	Ala	0,28	0,30
	Arginina	2,44	2,99
	Asparagina H <sub>2</sub> O	1,16	1,35
	Ácido aspártico	0,40	0,50
	Cys HCl, H <sub>2</sub> O	0,40	0,40
	Cistina 2HCl	1,40	1,40
	Ácido glutámico	0,28	0,20
	Glutamina	8,00	8,00
	glicina	0,48	0,30
	His HCl H <sub>2</sub> O	0,36	0,53
	isoleucina	1,16	1,35
	leucina	1,32	1,95
	Lisina HCl	1,20	1,50
	Metionina	0,36	0,60
	Fenilalanina	0,60	0,75
	prolina	0,84	0,90
	serina	2,60	3,35
	treonina	1,12	1,20
	triptófano	0,14	0,24
	tirosina 2Na 2H <sub>2</sub> O	0,56	0,40
	L-valina	1,12	1,20
Vitaminas		μM	μM
	Biotina	1,51	2,55
	D-pantotenato cálcico	8,46	14,10

ES 2 543 061 T3

(continuación)

	Componente	Medio B1	Medio B2
	cloruro de colina	116,20	193,50
	ácido fólico	10,80	12,00
	1-inositol	126,00	210,00
	nicotinamida	29,70	49,50
	piridoxina HCl	8,15	30,00
	piridoxal HCl	10,00	0,00
	riboflavina	0,97	1,65
	tiamina HCl	11,70	19,50
	vitamina B12	0,90	1,50
Otros componentes		μM	μM
	D-Glucosa	11,1 g/l	11,1 g/l
	Piruvato sódico	500,00	0,00
	ácido linoleico	0,21	0,15
	ácido tióctico	0,70	0,50
	putrescina 2HCl	15,40	15,00
Sales inorgánicas		mM	mM
	NaCl	3,7 g/L	3,6 g/L
	KCl	4,20	4,20
	CaCl <sub>2</sub>	1,05	1,05
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	0,50
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,88	0,88
	MgCl <sub>2</sub>	0,30	0,30
	MgSO <sub>4</sub>	0,44	0,44
		μM	μM
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	36 nM	74 nM
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5,50	5,50
	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0,13	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,80	4,20
Otras adiciones	PVA	2,4 g/l	2,4 g/l
	Insulina	14 mg/l	14 mg/l
	Hidrocortisona	86,4 mg/l	86,4 mg/l
	NaHCO <sub>3</sub>	2,44 g/l	2,44 g/l

(continuación)

	Componente	Medio B1	Medio B2
	Dextrán Sulfato	200 mg/l	400 mg/l
	Selenita Sódica	0,04 mM	0,0805 mM
Compuestos traza		μM	μM
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O		0,02
	CrCl <sub>3</sub>		0,01
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O		0,02
	KI		0,02
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O		0,1
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0,02
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0,02
	NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O		0,002
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>		0,002
	AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O		0,0004
	KBr		0,0004
	NaF		0,0004
	GeO <sub>2</sub>		0,0004
	LiCl		0,0004
	RbCl		0,0004
	SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O		0,0004

Otras realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria descriptiva y práctica de la invención desvelada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y ejemplos se consideren solamente ejemplares.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de BMP-2 que comprende las etapas de:
  - i) cultivar una célula huésped adecuada que comprende una molécula de ADN que codifica una BMP-2 en un medio de cultivo que comprende hierro a una concentración de al menos 2,25  $\mu\text{M}$ , un compuesto polianiónico, y si está presente piridoxal, representa menos del 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio de cultivo; y
  - ii) recuperar la proteína de interés,

en el que la célula huésped se cultiva en un biorreactor que tiene una capacidad de al menos 160 l, en el que el medio de cultivo comprende además cobre a una concentración de al menos 10 nM; y

en el que la célula huésped adecuada es una célula CHO.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el hierro está en una concentración de al menos 5  $\mu\text{M}$ .
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de cultivo comprende además al menos una vitamina B6 seleccionada del grupo que consiste en piridoxina, piridoxamina, piridoxina 5'-fosfato, piridoxamina 5'-fosfato.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el medio de cultivo tiene una concentración de vitamina B6 total de al menos 15  $\mu\text{M}$ .
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el medio de cultivo tiene una relación de piridoxal con respecto a piridoxina de menos de 1,2.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de cultivo comprende además cinc en una concentración de al menos 0,2  $\mu\text{M}$ .
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto polianiónico es dextrán sulfato.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el dextrán sulfato está presente a una concentración de al menos 10 mg/l.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el dextrán sulfato tiene un peso molecular de entre 5.000 y 500.000 g/mol.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el medio de cultivo comprende además aminoácidos a una concentración total de al menos 20 mM.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el medio de cultivo comprende L-cistina a una concentración de al menos 0,5 mM.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el medio de cultivo comprende L-ácido glutámico a una concentración de como máximo 0,3 mM.
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el medio de cultivo tiene una osmolaridad inicial de entre 260 y 360 mOsm.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la BMP-2 es BMP-2 humana recombinante (rhBMP-2).
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la célula huésped se cultiva por realimentación por lotes.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la célula huésped se cultiva a una temperatura de 36-38 °C.
17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende además la etapa de purificar la BMP-2 en una resina de butil sepharose.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que la purificación comprende además las etapas de aplicar un medio de cultivo acondicionado que contiene la BMP-2 a una resina de tipo heparina, obtener un eluato que contiene la BMP-2, y aplicar el eluato a la resina de butil sepharose.
19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
  - i) cultivar una célula CHO que comprende una molécula de ADN que codifica una proteína BMP-2 en un proceso de realimentación por lotes en medio de cultivo que comprende hierro a una concentración de al menos 2,5  $\mu\text{M}$ ,

cobre a una concentración de al menos 10 nM, aminoácidos a una concentración total de al menos 20 mM, L-cistina a una concentración de al menos 0,5 mM, dextrán sulfato a una concentración de al menos 10 mg/l y vitamina B6 a una concentración de al menos 15  $\mu$ M, y si está presente piridoxal, representa menos del 55 % de la concentración molar de vitamina B6 en el medio de cultivo; y

- 5 ii) recuperar una proteína BMP-2,
- en el que la célula huésped se cultiva en un biorreactor que tiene una capacidad de al menos 160 l.
20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el medio de cultivo comprende menos de 5  $\mu$ M de piridoxal.
- 10 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el medio de cultivo comprende menos de 1  $\mu$ M de piridoxal.
22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que el medio de cultivo no comprende piridoxal.

Figura 1

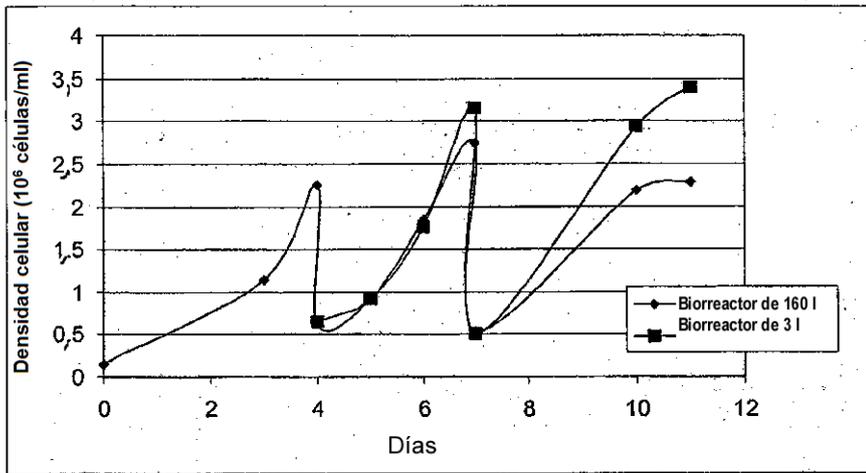


Figura 2

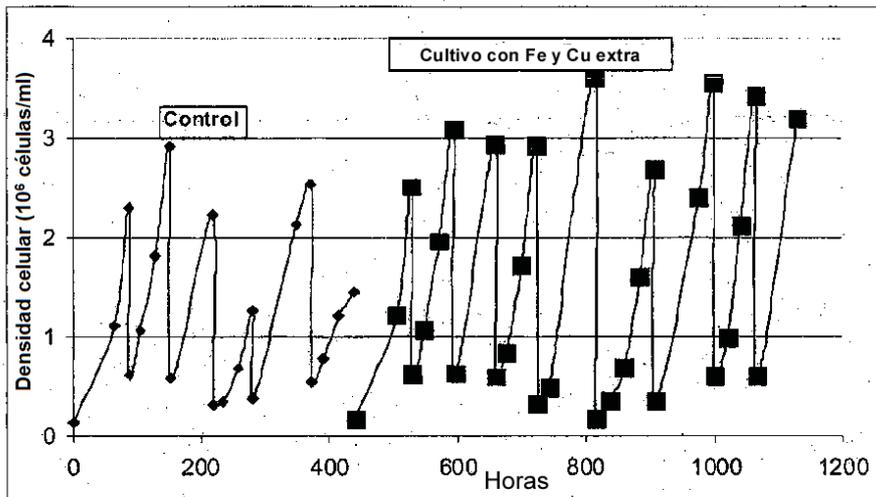


Figura 3

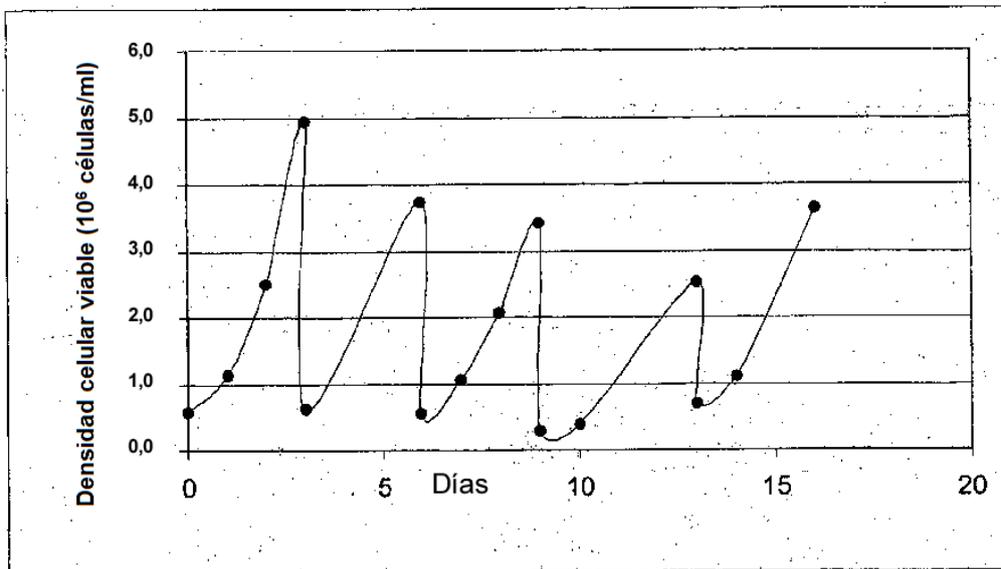


Figura 4

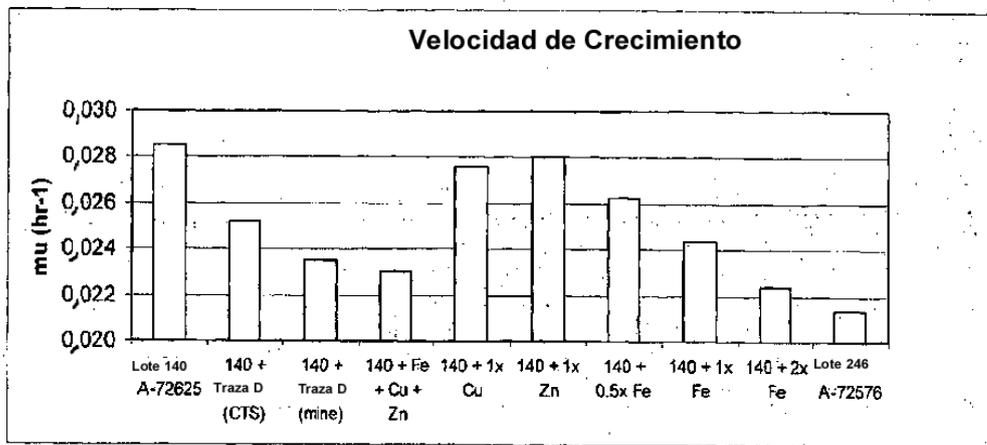


Figura 5

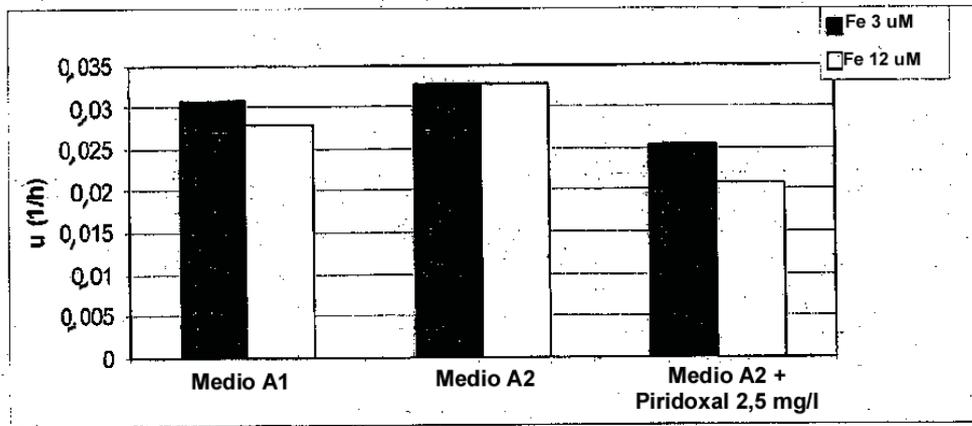


Figura 6

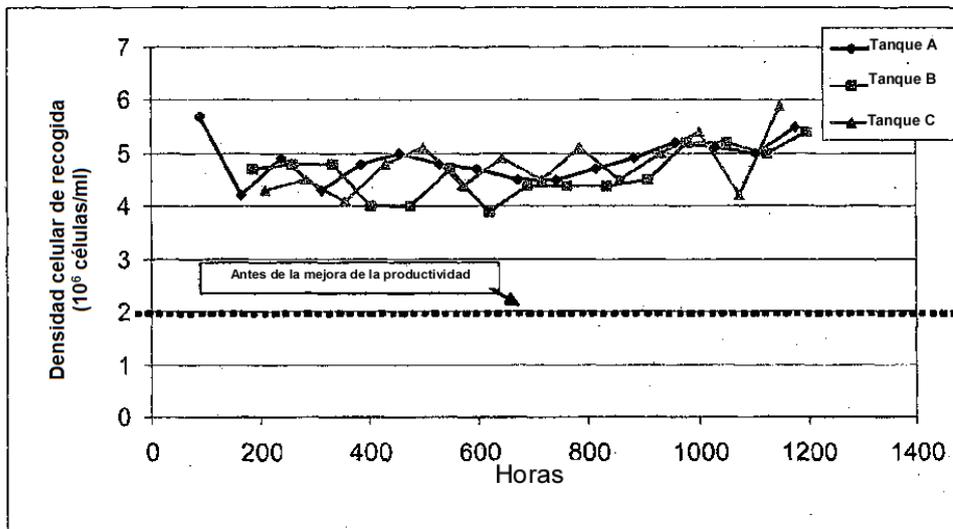


Figura 7

