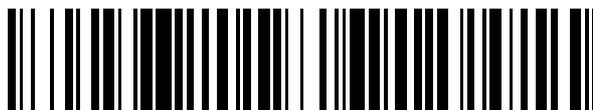


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 741**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2003 E 03716840 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 1497444**

54 Título: **Procedimientos para incrementar la producción de polipéptidos**

30 Prioridad:

27.03.2002 US 368246 P
27.03.2002 US 368248 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.01.2016

73 Titular/es:

IMMUNEX CORPORATION (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

VAN NESS, KIRK P.;
TRENTALANGE, MICHAEL T.;
DELL, BRADLEY D. y
MCGREW, JEFFREY T.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 557 741 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 para incrementar la producción de polipéptidos

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de la producción de polipéptidos, en particular la producción de polipéptidos recombinantes en cultivo celular.

Antecedentes

10 Los polipéptidos son útiles en diversas aplicaciones diagnósticas, terapéuticas, agrícolas, nutricionales y de investigación. Aunque los polipéptidos se pueden aislar de fuentes naturales, el aislamiento de cantidades grandes de un polipéptido específico de fuentes naturales puede ser caro. Asimismo, el polipéptido puede no ser de calidad uniforme debido a la variación en el material fuente. La tecnología de ADN recombinante permite la producción a gran escala uniforme y rentable de polipéptidos específicos.

15 Un objetivo de la producción de polipéptidos recombinantes es la optimización de las condiciones del cultivo para obtener la mayor productividad posible. Los incrementos crecientes de la productividad pueden ser económicamente importantes. Algunos de los procedimientos para aumentar la productividad en cultivo celular incluyen el uso de medio enriquecido, el control de la osmolaridad durante la producción, la disminución de las temperaturas durante fases específicas de un cultivo celular y/o la adición de butirato de sodio (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.705.364). Trevor Paterson y col., (1994; Appl. Microbiol. and Biotechnol. 40: 691) describe la producción aumentada de α 1-antitripsina recombinante en células CHO con la adición de hexametileno bisacetamida (HMBA). Hitto Kaufmann y col., (1999; Biotechnology and Bioengineering 63: 573) describen la influencia de la temperatura baja sobre la productividad de las células CHO para producir proteínas recombinantes.

20 No obstante, a medida que más fármacos basados en polipéptidos muestran eficacia clínica y se necesitan más cantidades comerciales, los centros de cultivo disponibles son escasos. De acuerdo con lo anterior, en la técnica existe la necesidad de mejorar continuamente los rendimientos de polipéptidos recombinantes de cada ciclo de cultivo celular.

Sumario

25 Como muestran los datos experimentales comunicados en el presente documento, los derivados de xantinas y/o compuestos polares híbridos pueden inducir espectacularmente la producción de polipéptidos, especialmente polipéptidos recombinantes, de líneas celulares de mamífero. Además, los derivados de xantinas y/o compuestos polares híbridos se pueden usar en combinación con otros procedimientos de inducción para incrementar aún más la expresión de polipéptidos.

30 Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido, que puede ser un polipéptido recombinante, que comprende cultivar una línea celular de mamífero a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C y añadir hexametileno bisacetamida (HMBA) al medio de cultivo, en el que la línea celular de mamífero se ha modificado genéticamente para producir el polipéptido y en el que la adición de HMBA aumenta la producción del polipéptido.

35 La adición de HMBA, un compuesto polar híbrido, puede aumentar la producción del polipéptido. La línea celular de mamífero puede ser una línea celular que se ha modificado genéticamente para producir el polipéptido o una línea celular de hibridoma que puede producir un anticuerpo. El polipéptido recombinante puede recolectarse del medio y formularse. En algunas realizaciones, la línea celular de mamífero es una línea celular CHO y puede haberse transformado con un vector recombinante que codifica el polipéptido recombinante. Opcionalmente, el vector puede comprender un promotor de citomegalovirus (CMV). Normalmente, la célula no expresa de forma natural el polipéptido o solo expresa de forma natural el polipéptido a niveles muy bajos (en ausencia de modificación genética). El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión recombinante o un anticuerpo humano o humanizado. La fase de producción o inducción se puede producir a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C. La fase de crecimiento se puede producir a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C.

40 Opcionalmente se pueden añadir al menos dos derivados de xantina diferentes. El o los derivados de xantina se pueden seleccionar del grupo que consiste en cafeína, 3-isobutil-1-metilxantina, teofilina, teobromina, pentoxifilina y aminofilina o en una subpoblación de este grupo. Si se añaden dos derivados de xantina diferentes, pueden ser cafeína y 3-isobutil-2-metilxantina. Los derivados de xantina se pueden añadir varias veces durante el cultivo de la línea celular y la línea celular se puede cultivar en presencia del derivado de xantina durante al menos aproximadamente 5 días. La concentración de cada derivado de xantina añadido al cultivo puede ser de aproximadamente 0,001 milimolar a aproximadamente 3 milimolar. El compuesto polar híbrido puede ser a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar. Las células de mamífero pueden cultivarse a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C. Las células de mamífero se pueden cultivar en una fase de crecimiento a una primera

temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C antes de cambiarlas a una fase de producción a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, en la que la segunda temperatura puede ser inferior a la primera temperatura.

5 El cultivo puede comprender medio sin suero y puede comprender no añadir proteínas o puede comprender insulina o IGF-1. Adicionalmente, el cultivo puede comprender dimetilformamida, dimetilsulfóxido o dimetilacetamida. La invención, dado su bajo coste y comodidad, es particularmente útil para el cultivo a gran escala de células CHO. El cultivo puede ser un cultivo a gran escala de al menos 100 litros o incluso al menos 500 litros de tamaño. El cultivo puede comprender una línea celular CHO homogénea.

Las células de mamífero pueden ser células de hibridoma o células CHO.

10 Como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido recombinante que comprende el cultivo de una línea celular de mamífero, en algunas realizaciones una línea celular CHO, a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, opcionalmente a temperaturas entre aproximadamente 29 °C y 35 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C, en un medio que comprende HMBA, un compuesto polar híbrido. El medio puede estar libre de suero. La adición del compuesto polar
15 híbrido puede aumentar la producción del polipéptido recombinante. El compuesto polar híbrido puede estar a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 20 milimolar o de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar. Adicionalmente, el medio puede comprender un ácido alcanoico, tal como una sal de ácido butírico, a una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 0,05 milimolar a aproximadamente 10 milimolar, opcionalmente de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar. Adicionalmente, el
20 medio puede comprender un derivado de xantina, por ejemplo, cafeína, a una concentración de aproximadamente 0,005 milimolar a 10 milimolar, opcionalmente de aproximadamente 0,01 milimolar a 4 milimolar o de aproximadamente 0,1 milimolar a 4 milimolar. Las células de mamífero pueden cultivarse a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C antes de cambiarlas a una segunda temperatura entre aproximadamente 29 °C y 36 °C, y el compuesto polar híbrido puede añadirse después de cambiarlas de la primera
25 temperatura a la segunda temperatura. Las células de mamífero pueden modificarse genéticamente para producir un polipéptido, opcionalmente, un polipéptido secretado que se puede recuperar del medio, incluyendo RANK: Fc, el receptor de tipo II de la interleucina-1, TNFR: Fc, el ligando de CD40, TRAIL, el ligando de ligando flt3, el receptor de la IL-4, G-CSF, eritropoyetina, un anticuerpo, o un polipéptido sustancialmente similar, entre otros. Opcionalmente, el polipéptido puede ser RANK: Fc, el receptor de tipo II de interleucina °, TNFR: Fc, el ligando de CD40, TRAIL, el
30 ligando de ligando flt3, el receptor de IL-4, GM-CSF, eritropoyetina, un anticuerpo, o un polipéptido sustancialmente similar, entre otros.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un procedimiento mejorado para producir un polipéptido mediante el cultivo de células de mamífero que comprende cultivar las células en un medio que comprende HMBA, un compuesto polar híbrido, a temperaturas de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, entre
35 aproximadamente 29 °C y 35 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para obtener un polipéptido, opcionalmente, un polipéptido recombinante, que comprende la recuperación del polipéptido del medio en el que se han cultivado células de mamífero, en el que las células de mamíferos pueden secretar el polipéptido y se cultivan a temperaturas de entre aproximadamente 29 °C y 35 °C, opcionalmente de aproximadamente de aproximadamente 30 °C a
40 aproximadamente 33 °C, en un medio que comprende HMBA (hexametileno bisacetamida). La hexametileno bisacetamida puede estar presente a concentraciones entre aproximadamente 0,1 milimolar y aproximadamente 5 milimolar. Adicionalmente, el medio puede comprender un ácido alcanoico, por ejemplo ácido butírico, opcionalmente a una concentración de aproximadamente 0,05 milimolar a aproximadamente 10 milimolar o de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar. Adicionalmente, el medio puede comprender una
45 xantina, por ejemplo, cafeína, opcionalmente a una concentración de aproximadamente 0,005 milimolar a 10 milimolar o de aproximadamente 0,01 milimolar a 5 milimolar. El polipéptido puede ser RANK: Fc, el receptor de tipo II de interleucina °, TNFR: Fc, el ligando de CD40, TRAIL, el ligando de ligando flt3, el receptor de IL-4, G-CSF, eritropoyetina, un anticuerpo, o un polipéptido sustancialmente similar, entre otros.

Asimismo, la invención comprende un procedimiento para producir un polipéptido recombinante que comprende cultivar células de mamífero en un medio que comprende HMBA, un compuesto polar híbrido y una xantina, en el que las células de mamíferos se han modificado genéticamente para expresar el polipéptido recombinante. El medio puede comprender adicionalmente un ácido alcanoico, tal como, por ejemplo, una sal de ácido butírico, que puede estar a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar. El compuesto polar
50 híbrido puede ser hexametileno bisacetamida, que puede estar a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar y / o la xantina puede ser cafeína, que puede estar a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 4 milimolar. Las células pueden cultivarse a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C. Las células de mamífero pueden cultivarse a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C antes de cambiarlas a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C y el
60 compuesto polar híbrido y la xantina puede añadirse en el momento del cambio desde la primera temperatura y/o antes y/o después del cambio. El medio puede estar libre de suero.

Asimismo, la invención abarca un procedimiento para producir un polipéptido, opcionalmente un polipéptido recombinante que comprende cultivar células de mamífero en un medio que comprende HMBA, un compuesto polar híbrido y un ácido alcanoico en el que las células de mamífero se han modificado genéticamente para expresar el polipéptido recombinante. El compuesto polar híbrido puede ser hexametileno bisacetamida y el compuesto polar híbrido puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,5 milimolar a aproximadamente 10 milimolar o a una concentración entre aproximadamente 0,5 milimolar y 2,5 milimolar. El ácido alcanoico puede ser una sal de ácido butírico y el ácido alcanoico puede estar presente a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar o a una concentración entre aproximadamente 0,1 milimolar y aproximadamente 2,0 milimolar. Las células de mamífero pueden cultivarse a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, y el medio puede carecer de suero. La línea celular de mamífero puede cultivarse a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C antes de cambiarlas a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, y el compuesto polar híbrido el ácido alcanoico puede añadirse después de cambiarlas desde la primera temperatura a la segunda temperatura. El medio puede comprender además un derivado de xantina a una concentración de aproximadamente 0,001 milimolar a aproximadamente 5,0 milimolar. La línea celular de mamífero puede ser una línea celular de hibridoma o una línea celular CHO.

En todavía otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido que comprende el cultivo de una línea celular de mamífero en una fase de producción a una segunda temperatura de aproximadamente 30 °C a 34 °C en un medio que comprende HMBA, un compuesto polar híbrido, en el que la fase de producción sigue una fase de crecimiento a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C. El polipéptido puede ser un polipéptido recombinante o un anticuerpo. El compuesto polar híbrido puede ser a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar. El compuesto polar híbrido puede añadirse después del cambio desde la primera temperatura a la segunda temperatura. El medio puede comprender adicionalmente un ácido alcanoico, que puede ser una sal de ácido butírico, opcionalmente a una concentración de aproximadamente 0,05 milimolar a aproximadamente 10,0 milimolar. El medio puede comprender también un derivado de xantina, opcionalmente a una concentración de aproximadamente 0,001 milimolar a aproximadamente 5,0 milimolar. El medio puede estar libre de suero. La línea celular de mamífero puede ser una línea celular de hibridoma o una línea celular CHO.

La invención también proporciona un procedimiento para producir un polipéptido que comprende el cultivo de una línea celular de mamífero en un medio que comprende HMBA medio a una concentración entre aproximadamente 0,5 milimolar y 2,5 milimolar, un ácido alcanoico a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar y 2,0 milimolar, y un derivado de xantina a una concentración de aproximadamente 0,001 milimolar a aproximadamente 4 milimolar.

En todavía otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido, opcionalmente RANK: Fc, el receptor de tipo II de la interleucina-1, TNFR: Fc, el ligando de CD40, TRAIL, el ligando flt3, el receptor de la IL-4, G-CSF, eritropoyetina, un anticuerpo, o un polipéptido sustancialmente similar, que comprende cultivar células de mamífero, que pueden haberse modificado genéticamente para producir cualquiera de estos polipéptidos, en un medio que comprende entre aproximadamente 0,1 milimolar y aproximadamente 5 milimolar de HMBA, de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar de ácido butírico, y de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 4 milimolar de cafeína a una temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el porcentaje de células totales que son viables en las condiciones indicadas a 31 °C para la línea celular CHO n.º 9 como una función de días en cultivo.

La Figura 2 muestra los microgramos de proteína por mililitro de cultivo celular, es decir el título de proteínas, en las condiciones indicadas a 31 °C para la línea celular CHO n.º 9 como una función de días en cultivo.

La Figura 3 muestra los microgramos de proteína por 10⁶ células al día en las condiciones indicadas a 31 °C para la línea celular CHO n.º 9 como una función de días en cultivo.

La Figura 4 muestra un gráfico que muestra la concentración de un anticuerpo contra el receptor murino de IL-4 recuperado del medio como una función de los días de crecimiento de una línea celular CHO que comprende un vector que codifica el anticuerpo a las temperaturas indicadas en presencia o ausencia de HMBA o butirato de sodio. Las marcas son las siguientes: -A-, no inductor 37 °C; -■-, no inductor 34 °C; --■--, butirato sódico 0,5 milimolar 34 °C; --■--, HMBA 2,0 milimolar 34 °C; -•-, no inductor 31 °C; ---•--, butirato sódico 0,5 milimolar 31 °C; y ---•---, HMBA 2,0 milimolar 31 °C.

Descripción detallada de la invención

Un "anticuerpo" es un polipéptido o complejo de polipéptidos, cada uno de los cuales comprende al menos un dominio variable de inmunoglobulina anticuerpo y al menos un dominio constante de inmunoglobulina anticuerpo. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos diméricos, o algún complejo de polipéptidos

de orden mayor que incluye, sin limitaciones, anticuerpos heterodiméricos. Un **"anticuerpo humano"** es un anticuerpo codificado por ácidos nucleicos que son, en última instancia, de origen humano. Dicho anticuerpo puede ser expresado en una célula u organismo no humano. Por ejemplo, se puede introducir ADN que codifica un anticuerpo humano en células de cultivo tisular y se expresa en líneas celulares transformadas. Como alternativa, los anticuerpos humanos se pueden expresar en animales transgénicos tales como, por ejemplo, los ratones transgénicos descritos en Mendez y col., ((1997), *Nature Genetics* 16(4): 146-56). Tales ratones transgénicos se utilizan en la fabricación de los anticuerpos totalmente humanos en la patente de EE.UU. N.º 6.235.883 B1. Los anticuerpos humanos también se pueden expresar en células de hibridoma. Un **"anticuerpo humanizado"** es un anticuerpo quimérico que comprende regiones determinantes de LA complementariedad (CDR1, CDR2, y CDR3) de una fuente no humana y otras regiones que se ajustan a las secuencias en anticuerpos humanos (y pueden ser de origen humano) como se explica en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.558.864 y 5.693.761 y en la solicitud de patente internacional WO 92/11018.

Un **"dominio constante de inmunoglobulina de anticuerpo"** es un dominio de inmunoglobulina que es idéntico o sustancialmente similar a un dominio C_L, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, o C_{H4}, de origen humano o animal. Véase, por ejemplo, Hasemann y Capra, *Immunoglobulins: Structure and Function*, en William E. Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Second Edition, 209,210-218 (1989); Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. of Health and Human Services (1991).

Una **"porción F_c de un anticuerpo"** incluye los dominios C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina humana o animal o los dominios sustancialmente similares a estos. Para una discusión, véase Hasemann y Capra, citado anteriormente en 212-213 y Kabat y col., citado anteriormente.

Las células se han **"modificado mediante ingeniería genética"** para expresar un polipéptido específico cuando las secuencias de ácido nucleico que permiten la expresión del polipéptido se han introducido en las células usando procedimientos de **"modificación mediante ingeniería genética"**, tales como infección viral con un virus recombinante, transfección, transformación o electroporación. Véase, por ejemplo, Kaufman y col., (1990), *Meth. Enzymol.* 185: 487-511; *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel y col., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, y actualizaciones trimestrales). La infección con un virus no alterado de origen natural, tales como, por ejemplo, el virus de la hepatitis B, el virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, etc., no constituye ingeniería genética como se entiende en el presente documento. El término **"ingeniería genética"** se refiere a un procedimiento de ADN o ARN recombinante usado para crear una célula huésped que expresa un gen a niveles elevados o a niveles bajos, o expresa una forma mutante del gen. En otras palabras, la célula se ha transfectado, transformado o transducido con una molécula de polinucleótido recombinante y, por lo tanto, se ha alterado para provocar que se altere la expresión celular de un polipéptido deseado. Para los propósitos de la invención, los anticuerpos producidos por una línea celular de hibridoma resultante de una fusión celular no son "polipéptidos recombinantes." Además, los polipéptidos virales producidos por una célula como resultado de una infección viral tampoco son "polipéptidos recombinantes", como se entiende en el presente documento, a menos que el ácido nucleico viral se haya modificado mediante ingeniería genética antes de la infección de la célula. Los procedimientos de **"ingeniería genética"** también abarcan numerosos procedimientos que incluye, entre otros, amplificación de ácidos nucleicos usando la reacción en cadena de la polimerasa, unión de las moléculas de ADN recombinante mediante su clonación en *Escherichia coli*, digestión de ácidos nucleicos mediante enzimas de restricción, unión de ácidos nucleicos y transferencia de bases a los extremos de ácidos nucleicos, entre otros numerosos procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Los procedimientos y vectores para la modificación por ingeniería genética de células y/o líneas celulares para expresar un polipéptido de interés son bien conocidos en la técnica. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, entre otras, vectores de expresión, recombinación homóloga dirigida y activación génica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.272.071 de Chappel) y transactivación mediante factores de transcripción modificados mediante ingeniería (véase, por ejemplo, Segal y col., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(6):2758-63). Opcionalmente, los polipéptidos se expresan bajo el control de un elemento de control heterólogo tal como, por ejemplo, un promotor que, en la naturaleza, no dirige la producción de dicho polipéptido. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor viral fuerte (por ejemplo, CMV, SV40) que dirige la expresión de un polipéptido de mamífero. La célula huésped puede o no producir normalmente el polipéptido. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula CHO que se ha modificado mediante ingeniería genética para producir un polipéptido humano, lo que significa que el ácido nucleico que codifica el polipéptido humano se ha introducido en la célula CHO. Como alternativa, la célula huésped puede ser una célula humana que se ha modificado mediante ingeniería genética para producir niveles mayores de un polipéptido humano normalmente presente únicamente a niveles muy bajos (por ejemplo, sustituyendo el promotor endógeno con un promotor viral fuerte).

"Fase de crecimiento" significa un periodo durante el cual las células cultivadas se dividen rápidamente y aumentan su número. Durante la fase de crecimiento, las células generalmente se cultivan en un medio y en las condiciones diseñadas para maximizar la proliferación celular.

Un **"compuesto polar híbrido"** es un compuesto que tiene dos grupos polares separados por una cadena de carbono apolar. En la presente invención, el compuesto polar híbrido es hexametileno bisacetamida (HMBA). Otros compuestos polares híbridos se describen en Richon y col., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 3003-07; Marks y col., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10251-54; y las patentes de EE.UU. N.º 5.055.608 y 6.087.367.

La producción de un polipéptido está "**incrementada**" por la adición de un agente inductor, tal como hexametileno bisacetamida (HMBA) o cafeína, si la cantidad del polipéptido producido en un cultivo que contiene el agente inductor es más que la cantidad del polipéptido producido en un cultivo por lo demás idéntico que no contiene el agente inductor. Del mismo modo, la producción de un polipéptido está "**incrementada**" por el crecimiento a una temperatura que no sea 37 °C si la cantidad de polipéptido producido en un cultivo incubado a una temperatura que no sea 37 °C es más que la cantidad del polipéptido producido en un cultivo por lo demás idéntico incubado a 37 °C.

Un "**dominio de multimerización**" es un dominio dentro de una molécula polipeptídica que le confiere una propensión a asociarse con otras moléculas polipeptídicas a través de interacciones covalentes o no covalentes.

Un "**polipéptido de origen natural**" es un polipéptido que se produce en la naturaleza, es decir, un polipéptido que puede ser producido por las células que no se han modificado mediante ingeniería genética. Dicho polipéptido se puede producir también en células modificadas mediante ingeniería genética para producirlo.

"**Polipéptido**" significa una cadena de al menos 6 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Opcionalmente, un polipéptido puede comprender al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60,70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, o 300 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

"**Medio de producción**" significa un medio de cultivo celular diseñado para su uso con células de cultivo durante una fase de producción.

Por "**fase de producción**" se entiende un período durante el cual las células están produciendo cantidades máximas de polipéptido recombinante. Una fase de producción se caracteriza por menos división celular menos que durante una fase de crecimiento y por el uso de medio y condiciones de cultivo diseñados para maximizar la producción de polipéptidos.

Un "**polipéptido de fusión recombinante**" es una fusión de la totalidad o parte de al menos dos polipéptidos, que se realiza mediante los procedimientos de modificación mediante ingeniería genética.

Un "**polipéptido recombinante**" es un polipéptido que resulta del proceso de ingeniería genética. Para los propósitos de la invención, los anticuerpos producidos por una línea celular de hibridoma resultante de una fusión celular no son "polipéptidos recombinantes." Además, las proteínas virales producidas por una célula como resultado de una infección viral con un virus de origen natural tampoco son "polipéptidos recombinantes", como se entiende en el presente documento, a menos que el ácido nucleico viral se haya modificado mediante ingeniería genética antes de la infección de la célula.

Polipéptidos "**sustancialmente similares**" son al menos 80 %, opcionalmente al menos 90 %, idénticas entre sí en la secuencia de aminoácidos y mantienen o alteran de una manera deseable la actividad biológica del polipéptido sin alterar. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras, que es poco probable que afecten a la actividad biológica, incluyen, sin limitaciones, lo siguiente: Ala por Ser, Val para Ile, Asp para Glu, Thr para Ser, Ala para Gly, Ala para Thr, Ser para Asn, Ala para Val, Ser para Gly, Tyr para Phe, Ala para Pro, Lys para Arg, Asp para Asn, Leu para Ile, Leu para Val, Ala para Glu, Asp para Gly, y estos cambios al contrario. Véase, por ejemplo, Neurath y col., *The Proteins*, Academic Press, New York (1979). Además, los intercambios de aminoácidos entre los miembros de los siguientes seis grupos de aminoácidos se consideran sustituciones conservadoras para los propósitos de la invención. Los grupos son: 1) metionina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cisteína, serina, treonina, asparagina, y glutamina; 3) aspartato y glutamato; 4) histidina, lisina y arginina; 5) glicina y prolina; y 6) triptófano, tirosina y fenilalanina. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático, o, más preferiblemente, la comparación se realiza comparando la información de secuencia utilizando un programa de ordenador tal como el programa Genetics Computer Group (GCG; Madison, WI) Wisconsin versión del paquete 10, 'GAP' (Devereux y col., (1984), *Nucl. Acids Res.* 12: 387) u otros programas informáticos comparables. Los parámetros por defecto preferidos para el programa "GAP" incluyen: (1) la matriz de comparación de aminoácidos ponderada de Gribskov y Burgess (1986), *Nucl. Acids Res.* 14: 6745, como describen Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979), u otras matrices de comparación comparables; (2) una penalización de 30 por cada hueco y una penalización adicional de 1 por cada símbolo en cada hueco para las secuencias de aminoácidos; (3) sin penalización para los huecos finales; y (4) sin penalización máxima para los huecos largos. También se pueden usar otros programas utilizados por los expertos la técnica de comparación de secuencias.

"**Fase de transición**" significa un período de cultivo celular entre una "fase de crecimiento" y una "fase de producción." Durante la fase de transición, las condiciones del medio y ambientales normalmente se cambian desde las diseñadas para maximizar la proliferación a las diseñadas para maximizar la producción de polipéptidos.

Un "**dominio variable de inmunoglobulina anticuerpo**" es un dominio de inmunoglobulina que es idéntico o sustancialmente similar a un dominio V_L o V_H, de origen humano o animal.

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para el cultivo de células de mamífero, que pueden haber sido modificados por ingeniería genética para producir un polipéptido particular. En particular, la invención se refiere a procedimientos de cultivo que maximizan la producción de polipéptidos específicos. También se refiere a

procedimientos de producción y obtención de tales polipéptidos a partir de células de mamífero cultivadas. Los polipéptidos son útiles en una gran variedad de aplicaciones diagnósticas, terapéuticas, agrícolas, nutricionales y de investigación.

5 Como muestran los datos experimentales comunicados en el presente documento, se ha descubierto que los derivados de xantina y los compuestos polares híbridos utilizados por separado o juntos pueden inducir de manera espectacular la producción de polipéptido recombinante a partir de líneas celulares CHO. En particular, la adición del derivado de xantina cafeína a la fase de producción de un cultivo celular aumenta la producción de polipéptido recombinante. También se demuestra que el compuesto polar híbrido hexametileno bisacetamida es un inductor eficaz de la producción de polipéptido recombinante. Adicionalmente, otros inductores, tales como, por ejemplo, ácidos alcanóicos, también se pueden añadir a un derivado de xantina, un compuesto polar híbrido, o ambos. También se pueden usar otros procedimientos, tales como, por ejemplo, el cultivo de las células a temperaturas de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, entre aproximadamente 29 °C y 35 °C, y/o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C. Por lo tanto, la invención se refiere a la inducción de un incremento de la producción de un polipéptido recombinante a partir de una célula en crecimiento en cultivo mediante la exposición de la célula a inductores químicos, incluyendo compuestos polares híbridos y / o derivados de xantina.

10 Los procedimientos de la invención incluyen el cultivo de células de mamífero en un medio que comprende un compuesto polar híbrido, hexametileno bisacetamida (HMBA), opcionalmente a temperaturas entre aproximadamente 29 °C y 35 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C. Otras formas de realización de la invención abarcan las condiciones de cultivo a las que un ácido alcanóico y / o una xantina, además del compuesto polar híbrido, se añaden al medio de cultivo. En una realización se usan una xantina y un compuesto polar híbrido y temperaturas de cultivo entre aproximadamente 29 °C y 36 °C. Otra forma de realización comprende la adición de un ácido alcanóico y un compuesto polar híbrido más temperaturas de cultivo entre aproximadamente 29 °C y 36 °C. Otra forma de realización más comprende la adición de una xantina, un ácido alcanóico y un compuesto polar híbrido más temperaturas de cultivo entre aproximadamente 29 °C y 36 °C. Opcionalmente, el cultivo celular utilizando los procedimientos de la invención puede tener lugar durante una fase de producción, tal como se distingue de una fase de crecimiento. Una fase de crecimiento puede distinguirse de una fase de producción en, por ejemplo, un cambio de temperatura y / o un cambio en el medio tal como, por ejemplo, la adición de uno o más inductores.

15 Una célula modificada por ingeniería genética puede ser una célula que ha sido transformada con un vector recombinante que codifica el polipéptido. Además, el polipéptido puede expresarse bajo el control de un promotor heterólogo tal como, por ejemplo, un promotor de CMV. Normalmente, la célula no expresa de forma natural el polipéptido o solo expresa de forma natural el polipéptido a niveles muy bajos (en ausencia de modificación genética).

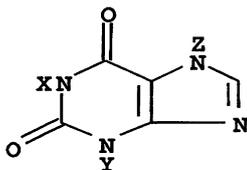
20 Además, los procedimientos y composiciones de la invención pueden usarse en combinación con cualquier otro procedimiento conocido o aún por descubrir de inducción de la producción de polipéptidos recombinantes. Tales técnicas incluyen cambio de temperatura fría, adiciones de ácidos alcanóicos (como se describe en la patente de Estados Unidos número 5.705.364 de Etcheverry y col.), DMF y DMOS, por citar sólo algunos ejemplos, así como cualquier técnica de inducción todavía por describir y / o descubrir técnicas de inducción. Como se usa en el presente documento, "inducir" la producción de polipéptidos o "inducción" se refiere al cultivo de células en un conjunto de condiciones diseñadas para maximizar la cantidad total de un polipéptido deseado hecha por las células. Un "inductor" es un agente que, cuando se añade al medio de cultivo, puede aumentar la producción de un polipéptido deseado en al menos algunas líneas celulares. La combinación de la adición de derivados de xantina con otras técnicas de inducción de proteínas puede tener un efecto sinérgico sobre la inducción de polipéptidos, lo que permite adiciones inferiores de derivados de la xantina y / o adiciones inferiores de otros agentes inductores y / o cambios de temperatura más conservadores. Los otros procedimientos de inducción se llevarán a cabo aproximadamente al mismo tiempo que la adición de la xantina, y / o antes y / o después de la adición de la xantina. Por ejemplo, se puede cambiar la temperatura del cultivo el día 0, y después añadir un derivado de xantina y / o un compuesto polar híbrido, y, opcionalmente, otros inductores químicos, después, por ejemplo, una a varias horas o días después. Un protocolo de este tipo permite un cierto crecimiento adicional de un cultivo sembrado antes de la inducción completa. Adicionalmente se pueden realizar múltiples adiciones de derivados de xantina y / o compuestos polares híbridos se pueden añadir al cultivo durante la fase de producción, separadas por aproximadamente 12, 24, 48, y / o 72 horas o más, con o sin adiciones de otros agentes inductores o cambios en las condiciones de cultivo. Por ejemplo, se puede añadir un inductor el día 0 y de nuevo al día 4. Como alternativa se puede añadir un inductor por primera vez uno, dos, tres, o cuatro días después de un cambio de temperatura.

25 30 35 40 45 50 55 60 En un aspecto, la invención implica la realización de un cambio de temperatura a la baja (cambiar la temperatura del medio desde la temperatura óptima de crecimiento, generalmente de aproximadamente 37 °C, a una temperatura más baja, por lo general de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C y opcionalmente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 34 °C en el momento de, antes de, y / o después de añadir el derivado de xantina o el compuesto polar híbrido. Como alternativa, además, se puede añadir al cultivo un ácido alcanóico o una sal del mismo (por ejemplo, butirato de sodio) aproximadamente al mismo tiempo que se añade el derivado de xantina y / o el compuesto polar híbrido. Se puede añadir ácido alcanóico a las concentraciones normalmente utilizadas para la inducción, o incluso a concentraciones más bajas que las que se usarían normalmente. De este

modo, mediante la manipulación de los controles tanto transcripcionales como postranscripcionales, se pueden alcanzar niveles más altos de productividad.

Existen diferencias individuales entre las líneas celulares en la eficacia de diversos inductores. Por ejemplo, aunque el butirato de sodio es un inductor ampliamente utilizado, puede no tener efecto alguno o un efecto adverso en la producción de polipéptidos en algunas líneas celulares. Véase la Tabla 5. Diferentes inductores o diferentes concentraciones de los mismos inductores pueden ser adecuados para diferentes líneas celulares. Adicionalmente, pueden ser adecuadas diferentes temperaturas para diferentes líneas celulares. A pesar de esta variabilidad, algunos inductores, tales como, por ejemplo, cafeína, hexametileno bisacetamida y butirato de sodio, pueden ser útiles en una amplia variedad, aunque tal vez no todas, las líneas celulares.

En general, los derivados de xantina tienen la estructura que se ilustra a continuación.



X, Y, y Z se pueden seleccionar independientemente de un radical alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un radical alquilino de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbonos (incluyendo un radical propinilo), un radical acilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un radical con la estructura R-acilo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 12 átomos de carbonos, en la que R es un grupo alifático átomos de carbono, un radical hidroxialquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un radical hidroxialenilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbonos, un radical con la estructura -alenil-halógeno de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbonos, un radical ciclohexilo, e hidrógeno. En algunas realizaciones, al menos uno de X, Y y Z es un grupo metilo. En algunas formas de realización, cada uno de X e Y representa independientemente un átomo de hidrógeno, un radical alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene hasta alquilo 5 átomos de carbono, un radical alilo, un radical propinilo o un radical ciclohexilo, con la condición de que X e Y no representan de forma simultánea representan un átomo de hidrógeno, y Z representa un radical hidrógeno, metilo, etilo, hidroximetilo, hidroxietilo o heterociclo. Estas xantinas se pueden obtener utilizando procesos convencionales y/o comprarse. Una serie de diferentes derivados de xantina que se pueden utilizar se describen en Beavo y col., (1970), Molec. Pharm. 6:597-603.

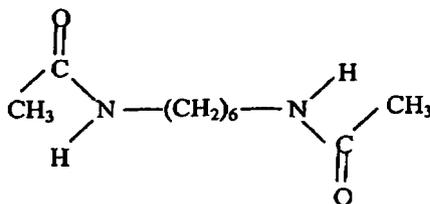
Los ejemplos ilustrativos de derivados de xantina que se pueden utilizar en los procedimientos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teofilina (1,3-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina), 3-isobutil-1-metilxantina, 3-butil-1-metilxantina, 1,3,7-trietilxantina, 3-ciclohexil-1-etilxantina, 3-etil-1-propinilxantina, 3-etil-1-pentilxantina, pentoxifilina, y aminofilina. La aminofilina es un compuesto teofilina con 1,2-etilendiamina (2:1) dihidrato. Generalmente, el derivado de xantina se añade a una concentración en el cultivo de aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 25 milimolar, opcionalmente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 milimolar, de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 5 milimolar, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3 milimolar. La concentración óptima del derivado de xantina variará dependiendo de su actividad y la línea celular, y los expertos en la técnica pueden determinarla usando la guía proporcionada en el presente documento.

El derivado de xantina se puede disolver en cualquier disolvente apropiado. Por ejemplo, 3-isobutil-1-metilxantina (IBX) se puede disolver en agua, pero debe calentarse hasta casi el punto de ebullición. Como alternativa, IBX se puede disolver en los disolventes DMSO (dimetilsulfóxido), DMF (dimetilformamida) o DMA (dimetilacetamida). IBX también se puede disolver fácilmente como una solución madre 100 milimolar en NaOH 0,5 M. Las diluciones de esta solución madre se pueden añadir a los medios de inducción tal como se estén preparando (pre-estériles) y los efectos del NaOH deben ser intrascendentes, y que a menudo se debe añadir una base para elevar el pH del medio a 7,0.

Muchos de los derivados de xantina para su uso en la invención son inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa. Por lo tanto, además de utilizar derivados de xantina que son inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa, se cree que los inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa que no son derivados de la xantina también podrían utilizarse para inducir la producción de polipéptidos en procedimientos alternativos de la invención. Ejemplos de tales inductores incluyen, pero no se limitan a, imidazopirimidina, pirazolopiridina, etazolato, pirazoloquinolina, y triazoloquinazolina (Pflugers Archiv 407: S31, 1986). Otros ejemplos de inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa se pueden encontrar en la Patente de Estados Unidos N.º RE37.234.

Los compuestos polares híbridos tienen dos grupos polares separados por una cadena de carbono no polar, tales como los descritos en Richon y col., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 3003-07, Marks y col., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 10251-54, y las patentes de EE.UU. N.º 5.055.608 y 6.087.367. HMBA, el compuesto polar híbrido de la invención puede tener la propiedad de inducir uno o más cambios característicos.

Específicamente, HMBA tiene la estructura:



Cuando se utiliza HMBA, se puede añadir a concentraciones de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 20 milimolar, opcionalmente entre aproximadamente 0,1 milimolar y aproximadamente 5 milimolar.

5 Los ácidos alcanoicos para su uso en la invención incluyen el ácido seleccionado y / o una sal correspondiente. Los ácidos incluyen ácidos alcanoicos de cadena lineal o ramificada, saturados o insaturados o sales de los mismos. Un ácido alcanoico comprende generalmente de uno a diez átomos de carbono. Ejemplos de ácidos alcanoicos contemplados por la invención son ácido pentanoico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido propiónico, y ácido acético. Las concentraciones de ácidos alcanoicos abarcadas por la invención oscilan desde aproximadamente 0,05 milimolar a aproximadamente 10 milimolar, opcionalmente de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar. Las concentraciones apropiadas de ácidos alcanoicos variarán dependiendo de su actividad y la línea celular y un experto en la técnica puede determinarlas usando procedimientos de rutina y la guía proporcionada en el presente documento. Un ejemplo de sal de ácido butírico es el butirato de sodio. Las sales apropiadas de los ácidos alcanoicos descritos anteriormente incluyen las que comprenden grupos de sodio, potasio o amonio, entre otros.

15 Polipéptidos particularmente preferidos para la expresión son fármacos basados en polipéptidos, también conocidos como productos biológicos. Preferiblemente, los polipéptidos se secretan como productos extracelulares. El polipéptido que se está produciendo puede comprender todo o parte de un polipéptido que es idéntico o sustancialmente similar a un polipéptido de origen natural, y / o puede, o no, ser un polipéptido de fusión recombinante. Opcionalmente, el polipéptido puede ser un polipéptido humano, un fragmento del mismo, o un polipéptido sustancialmente similar que tiene al menos 15 aminoácidos de longitud. Puede comprender un polipéptido no anticuerpo y / o un anticuerpo. Puede producirse intracelularmente o secretarse en el medio de cultivo a partir del cual se puede recuperar. Puede ser, o no, un polipéptido soluble.

20 El polipéptido que se está produciendo puede comprender todo o parte de un polipéptido que es idéntico o sustancialmente similar a un polipéptido de origen natural, y / o puede, o no, ser un polipéptido de fusión recombinante. Puede comprender un polipéptido no anticuerpo y / o un anticuerpo. Puede producirse intracelularmente o secretarse en el medio de cultivo a partir del cual se puede recuperar.

25 La invención se puede utilizar para inducir la producción de casi cualquier polipéptido y es particularmente ventajosa para los polipéptidos cuya expresión está bajo el control de un promotor fuerte, tal como, por ejemplo, un promotor viral y / o polipéptidos viral que están codificados en un mensaje que tiene un elemento líder tripartito adenoviral. Los ejemplos de vectores de expresión útiles que se pueden utilizar para producir proteínas se divulgan en la solicitud internacional WO 01/27299 y en McMahan y col., (1991), EMBO J. 10: 2821, que describe el vector pDC409. Generalmente se entiende que una proteína es un polipéptido de al menos aproximadamente 10 aminoácidos, opcionalmente aproximadamente 25, 75, o 100 aminoácidos.

30 En general, los procedimientos de la invención son útiles para inducir la producción de polipéptidos recombinantes. Algunos polipéptidos que pueden producirse con los procedimientos de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares a todo o parte de uno de los siguientes polipéptidos: un ligando de flt3 (como se describe en la solicitud internacional WO 94/28391, un ligando de CD40 (como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6,087,329), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, leptina, IL-2, angiopoyetina-2 (como describen Maisonpierre y col., (1997), Science 277(5322): 55-60), ligando de Fas, ligando del activador del receptor de NF-kappa B (RANKL, como se describe en la Solicitud Internacional WO 01/36637), el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, como se describe en la Solicitud Internacional WO 97/01633), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, como se describe en la patente australiana N.º 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento y factor de desarrollo de megacariocitos, RANTES, hormona de crecimiento, insulina, insulintropina, factores de crecimiento similares a la insulina, hormona paratiroidea, interferones, incluyendo un interferón α , interferón γ , e interferones de consenso (tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento neural, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a totagmina - sinap- (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas 1 a 18, los factores estimulantes de colonias, linfotoxina p, factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de leucemia, oncostatina-M, y varios ligandos para las moléculas de superficie celular ELK y Hek (tales

como los ligandos para las quinasas relacionadas con eph o LERKS). Las descripciones de polipéptidos que pueden producirse de acuerdo con los procedimientos de la invención se pueden encontrar en, por ejemplo, Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research. Vol. II (Aggarwal y Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay y Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); y The Cytokine Handbook (A. W. Thompson, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1991).

Otros polipéptidos que pueden producirse utilizando los procedimientos de la invención incluyen polipéptidos que comprenden todo o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de los polipéptidos mencionados en lo que antecede, un antagonista de un receptor de este tipo o cualquiera de los polipéptidos mencionados en lo que antecede y / o polipéptidos sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, conocidas como p55 y p75, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.395.760 y la patente de Estados Unidos N.º 5.610.279, receptores de la interleucina-1 (tipos I y II); descritos en la Patente EP N.º 0 460 846, la patente de EE.UU. N.º 4.968.607, y la Patente de Estados Unidos N.º 5.767.064, antagonistas del receptor de IL-1 (como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 6.337.072), antagonistas o inhibidores de IL-1 (tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.981.713, 6.096.728, y 5.075.222), receptores de IL-2, receptores de IL-4 (como los descritos en la patente EP N.º 0 367 566 la patente de Estados Unidos N.º 5.856.296), receptores de IL-15, receptores de IL-17, receptores de IL-18, receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos, receptores de la oncostatina M y factor inhibidor de leucemia, activador del receptor de NF-kappa B (RANK, descrito en el documento WO 01/36637 y en la Patente de Estados Unidos N.º 6.271.349), osteoprotegerina (descrita en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.015.938), receptores de TRAIL (incluyendo los receptores TRAIL 1, 2, 3, y 4), y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como Fas o el receptor inductor de apoptosis (AIR).

Otros polipéptidos que pueden producirse usando el proceso de la invención incluyen polipéptidos que comprenden todo o parte de las secuencias de aminoácidos de antígenos de diferenciación (denominados polipéptidos CD) o sus ligandos o polipéptidos sustancialmente similares a cualquiera de estos. Estos antígenos se divulgan en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani y col., eds., Kobe, Japan, 1996). Polipéptidos CD similares se divulgan en los talleres posteriores. Ejemplos de tales antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos de los mismos (ligando CD27, ligando CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia de receptores del TNF, que también incluye 4 IBB y OX40. Los ligandos son a menudo miembros de la familia del TNF, como lo son el ligando 41BB y el ligando OX40. De acuerdo con lo anterior, los miembros de las familias del TNF y TNFR también se pueden purificar utilizando la presente invención.

Los polipéptidos enzimáticamente activos o sus ligandos también se pueden producir de acuerdo con los procedimientos de la invención. Los ejemplos incluyen polipéptidos que comprenden todo o parte de uno de los siguientes polipéptidos o sus ligandos o un polipéptido sustancialmente similar a uno de estos: miembros de la familia de metaloproteinasas - desintegrinas, varias quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, antitripsina alfa-1, enzima convertidora de TNF-alfa, ligandos de cualquiera de las enzimas mencionadas en lo que antecede, y otras numerosas enzimas y sus ligandos.

Los procedimientos de la invención pueden también usarse para producir anticuerpos o porciones de los mismos y anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen dominios constantes de la inmunoglobulina anticuerpo humana acoplados a uno o más dominios variables de inmunoglobulina anticuerpo murina, fragmentos de los mismos, o proteínas sustancialmente similares. El procedimiento de la invención también se puede utilizar para producir conjugados que comprenden un anticuerpo y una sustancia citotóxica o luminiscente. Tales sustancias incluyen: derivados de maitansina (tales como DM1); enterotoxinas (tales como una enterotoxina de estafilococos); isótopos de yodo (tales como yodo-125); isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m); fluorocromos de cianina (tales como Cy5.5.18); y polipéptidos inactivadores de ribosomas (tales como bouganina, gelonina, o saporina-S6). La invención también se puede utilizar para producir proteínas quiméricas seleccionadas in vitro para unirse a una proteína diana específica y modificar su actividad tales como las descritas en las solicitudes internacionales WO 01/83525 y WO 00/24782. Los ejemplos de anticuerpos, proteínas quiméricas seleccionadas in vitro, o conjugados anticuerpo/citotoxina o anticuerpo/luminóforo que pueden producirse mediante los procedimientos de la invención incluyen aquellos que reconocen uno cualquiera o una combinación de polipéptidos, incluyendo, pero sin limitarse a, las proteínas mencionadas en lo que antecede y / o los siguientes antígenos: subunidades de CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, receptor de IL-18, PDGF- β y análogos de los mismos (como los descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5.272.064 y 5.149.792), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, receptor de EGF (incluyendo los que se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 6.235.883) receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulador de linfocitos b (BlyS, también conocido como BAFF, THANK, TALL-1, y zTNF4; véase Do y Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con el cáncer de pulmón), HER-2, una glicoproteína TAG-72 asociada a tumores, el antígeno SK-1, epítomos asociados a tumores que están presentes en niveles elevados en el suero de pacientes con cáncer de colon y o de páncreas, epítomos o polipéptidos asociados con cáncer expresados en células de cáncer de mama,

de colon, de células escamosas, de próstata, de páncreas, de pulmón, y / o de riñón, y / o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores TRAIL 1, 2, 3, y 4, RANK, ligando de RANK, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glicoproteína de plaquetas gp IIb / IIIa, la cadena pesada de la miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor tisular-factor VIIa), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor de Fc- γ -1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L- selectina, virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

La invención también puede usarse para producir todo o parte de un anticuerpo antiidiotípico o un polipéptido sustancialmente similar, incluyendo anticuerpos antiidiotípicos contra: un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp72; un anticuerpo contra el gangliósido GD3; un anticuerpo contra el gangliósido GD2; o anticuerpos sustancialmente similares a estos.

Los procedimientos de la invención pueden también usarse para producir polipéptidos de fusión recombinantes que comprenden cualquiera de los polipéptidos mencionados en lo que antecede. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos de fusión recombinantes que comprenden uno de los polipéptidos mencionados en lo que antecede, además de un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucina, una hélice en espiral, una porción Fc de un anticuerpo, o una proteína sustancialmente similar usando los procedimientos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento WO94/10308; Lovejoy y col., (1993), Science 259:1288-1293; Miyagishi y col. (1993), Science 262:1401-05; Harbury y col., (1994), Nature 371:80-83; Hakansson y col., (1999), Structure 7:255-64. 371: 80-83; Hakansson y col., (1999), Structure 7: 255-64. Específicamente incluidos entre tales polipéptidos de fusión recombinantes se encuentran los polipéptidos en los que una porción del TNFR o RANK está fusionada con una porción Fc de un anticuerpo (TNFR: Fc o RANK: Fc). TNFR:Fc comprende la porción Fc de un anticuerpo fusionado a un dominio extracelular de TNFR, que incluye secuencias de aminoácidos sustancialmente similares a los aminoácidos 1-163, 1-185, o 1-235 de la Figura 2A de la Patente de Estados Unidos N°. 5.395.760. RANK:Fc se describe en la solicitud internacional WO 01/36637.

Preferentemente, los polipéptidos se expresan bajo el control de un elemento de control heterólogo tal como, por ejemplo, un promotor que, en la naturaleza, no dirige la producción de dicho polipéptido. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor viral fuerte (por ejemplo, CMV, SV40) que dirige la expresión de un polipéptido de mamífero. La célula huésped puede o no producir normalmente el polipéptido. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula CHO que se ha modificado mediante ingeniería genética para producir un polipéptido humano, lo que significa que el ácido nucleico que codifica el polipéptido humano se ha introducido en la célula CHO. Como alternativa, la célula huésped puede ser una célula humana que se ha modificado mediante ingeniería genética para producir niveles mayores de un polipéptido humano normalmente presente únicamente a niveles muy bajos (por ejemplo, sustituyendo el promotor endógeno con un promotor viral fuerte). Para la producción de polipéptidos recombinantes, un vector de expresión que codifica el polipéptido recombinante puede transferirse, por ejemplo, mediante transfección o infección viral, en un cultivo sustancialmente homogéneo de células huésped. El vector de expresión, que puede construirse usando los procedimientos de ingeniería genética, puede incluir ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de interés unido operativamente a secuencias reguladoras adecuadas.

Las secuencias reguladoras normalmente derivan de genes de mamíferos, microbianos, virales y / o de insectos. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores de la transcripción, operadores y potenciadores, un sitio de unión al ribosoma (véase, por ejemplo Kozak (1991), J. Biol. Chem. 266:19867-19870), secuencias adecuadas para controlar la iniciación y terminación de la transcripción y de la traducción, señales de poliadenilación (ver por ejemplo (véase, por ejemplo McLauchlan y col., (1988), Nucleic Acids Res. 16:5323-33), y sitios de unión a la matriz y al armazón (véase Phi-Van y col., (1988), Mol. Cell. Biol. 10:2302-07; Stief y col., (1989), Nature 341:342-35; Bonifer y col., (1990), EMBO J. 9:2843-38). Las secuencias de nucleótidos están unidas operablemente cuando la secuencia reguladora se refiere a la secuencia de codificación del polipéptido. Por tanto, una secuencia nucleotídica promotora está unida operablemente a una secuencia de codificación del polipéptido si la secuencia nucleotídica promotora controla la transcripción de la secuencia de codificación. Generalmente en el vector de expresión se incorpora un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de células recombinantes.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción para vectores de expresión de célula huésped de mamífero se pueden escindir de genomas virales. Las secuencias promotoras y potenciadoras de uso habitual derivan del virus del poliovirus, el adenovirus 2, el virus de simio 40 (SV40) y el citomegalovirus humano (CMV). Por ejemplo, se puede utilizar el promotor / potenciador del CMV humano del gen temprano inmediato 1. Véase, por ejemplo, Patterson y col., (1994), Applied Microbiol. Biotechnol. 40:691-98. Las secuencias de ADN derivadas del genoma del virus SV40, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor temprano y tardío, el potenciador, los sitios de corte y empalme y de poliadenilación pueden usarse para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula huésped de mamífero. Los promotores virales tempranos y tardíos son particularmente útiles porque ambos se obtienen fácilmente de un genoma viral como un fragmento, que también puede contener un origen de replicación viral (Fiers y col., (1978), Nature 273:113; Kaufman (1990), Meth. in Enzymol. 185:487-511). También se pueden usar fragmentos de SV40 menores o mayores, siempre que incluyan la

secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hacia el sitio *Bgl* I localizado en el origen viral SV40 del sitio de replicación.

Además, una secuencia que codifica un péptido señal heterólogo o nativo adecuado (secuencia líder) se puede incorporar en el vector de expresión, para estimular la secreción extracelular del polipéptido recombinante. El péptido señal se escindirá del polipéptido recombinante después de la secreción desde la célula. La elección del péptido señal o secuencia líder depende del tipo de células huésped en las que se va a producir el polipéptido recombinante. Los ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células huésped de mamífero incluyen la secuencia señal para la interleucina-7 (IL-7) descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 4.965.195, la secuencia señal para el receptor de la interleucina-2 descrita en Cosman y col., (1984), *Nature* 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la patente EP N.º 367.566; el péptido señal de la interleucina-1 de tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 4.968.607; y el péptido señal del receptor de la interleucina 1 de tipo II descrito en la Patente EP N.º. 0 460 846.

Se han descrito los procedimientos establecidos para introducir ADN en células de mamíferos. Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69. Se pueden usar protocolos adicionales utilizando reactivos comercialmente disponibles, tales como los reactivos de lípidos catiónicos LIPOFECTAMINE™, LIPOFECTAMINE™-2000 o LIPOFECTAMINE™-PLUS (que se pueden adquirir en Invitrogen), para transfectar células. Felgner y col., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417. Además, se pueden usar electroporación o bombardeo con microproyectiles recubiertos con ácidos nucleicos para transfectar células de mamífero utilizando procedimientos, tales como los de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y Fitzpatrick-McElligott (1992), *Biotechnology (NY)* 10(9):1036-40. La selección de transformantes estables puede realizarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, resistencia a fármacos citotóxicos. Kaufman y col., ((1990), *Meth. in Enzymology* 185:487-511), describe varios esquemas de selección, tales como la resistencia a la dihidrofolato reductasa (DHFR). Una cepa huésped adecuada para la selección de DHFR puede ser la cepa DX-B11 de CHO, que es deficiente en DHFR. Urlaub y Chasin (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220. Un plásmido que expresa el ADNc de DHFR puede introducirse en la cepa DX-B11 y sólo las células que contienen el plásmido pueden crecer en el medio selectivo apropiado. Otros ejemplos de marcadores seleccionables que pueden incorporarse en un vector de expresión incluyen ADNc que confieren resistencia a los antibióticos, tales como G418 e higromicina B. Las células que albergan el vector pueden seleccionarse sobre la base de la resistencia a estos compuestos.

Las secuencias control adicionales que se ha demostrado que mejoran la expresión de genes heterólogos de vectores de expresión de mamíferos incluyen elementos tales como el elemento de secuencia de aumento de la expresión (EASE) derivado de células CHO (Morris y col., en *Animal Cell Technology*, pp. 529-534 (1997); las patentes de Estados Unidos N.º 6.312.951 B1, 6.027.915, y 6.309.841 B1) y los ARN del líder tripartito (TPL) y del gen VA del Adenovirus 2 (Gingeras y col., (1982), *J. Biol. Chem.* 257:13475-13491). Las secuencias del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de origen viral permite traducir con eficiencia ARNm dicistrónicos (Oh y Sarnow (1993), *Current Opinion in Genetics and Development* 3:295-300; Ramesh y col., (1996), *Nucleic Acids Research* 24:2697-2700). Se ha demostrado que la expresión de un ADNc heterólogo como parte de un ARNm dicistrónico seguido por el gen para un marcador seleccionable (por ejemplo, DHFR) mejora la capacidad de transfección del huésped y la expresión del ADNc heterólogo (Kaufman y col., (1990), *Methods in Enzymol.* 185:487-511). Los ejemplos de vectores de expresión que emplean ARNm dicistrónicos son pTR-DC / GFP descrito por Mosser y col., *Biotechniques* 22:150-161 (1997) y p2A5I descrito por Morris y col., en *Animal Cell Technology*, pp. 529-534 (1997).

Mosley y col., ((1989), *Cell* 59:335-348) han descrito un vector de expresión alto útil, pCAVNOT. Otros vectores de expresión para su uso en células huésped de mamífero se pueden construir como describen Okayama y Berg ((1983), *Mol. Cell. Biol.* 3:280). Un sistema útil para la expresión estable de alto nivel de ADNc de mamífero en células epiteliales mamarias murinas C127 puede construirse sustancialmente como se describe en Cosman y col., ((1986), *Mol. Immunol.* 23:935). Un vector útil de alta expresión, PMLSV N1 / N4, descrito por Cosman y col., ((1984), *Nature* 312:768), se ha depositado en la ATCC 39890. Vectores de expresión de mamífero útiles adicionales se describen en la patente EP N.º A-0 367 566 y el documento WO 01/27299 A1. Los vectores pueden derivar de retrovirus. En lugar de la secuencia señal nativa, se puede añadir una secuencia señal heteróloga, tal como una de las siguientes secuencias: la secuencia señal para la IL-7 descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 4.965.195; la secuencia señal para el receptor del IL-2 descrito en Cosman y col., (1984), *Nature* 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la patente EP N.º 367.566; el péptido señal de la interleucina-1 de tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 4.968.607; y el péptido señal del receptor de la interleucina 1 de tipo II descrito en la Patente EP N.º. 0 460 846.

Los polipéptidos se pueden producir de forma recombinante en células eucariotas y preferiblemente son secretadas por células huésped adaptadas para crecer en cultivo celular. Opcionalmente, las células huésped para su uso en la invención son, preferiblemente, células de mamífero. Las células pueden también modificarse mediante ingeniería genética para que expresen un gen de interés, pueden ser células de producción de mamífero adaptadas para crecer en cultivo celular, y / o pueden ser líneas celulares homogéneas. Los ejemplos de tales células de uso habitual en la industria son VERO, BHK, HeLa, CVL (incluyendo Cos), MDCK, 293, 3T3, líneas celulares de mieloma (por ejemplo, NSO, NS1), PC12, células WI38, y células de ovario de hámster chino (CHO), que son ampliamente utilizadas para la producción de varios polipéptidos recombinantes complejos, por ejemplo, citocinas, factores de

coagulación y anticuerpos (Brasel y col., (1996), Blood 88:2004-2012; Kaufman y col., (1988), J. Biol. Chem 263:6352-6362; McKinnon y col., (1991), J. Mol. Endocrinol 6:231-239; Wood y col., (1990), J. Immunol. 145:3011-3016). Las líneas celulares mutantes deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub y col., (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 y DG-44, son líneas de células huésped de CHO deseables porque el sistema de DHFR de expresión génica seleccionable y amplificable eficiente permite la expresión del polipéptido recombinante de alto nivel e estas células (Kaufman R.J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o de suspensión y exhiben una estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y los polipéptidos recombinantes expresados en ellas se han caracterizado ampliamente y han sido aprobadas para su uso en la fabricación comercial clínica por las agencias reguladoras. Los procedimientos de la invención también se pueden poner en práctica utilizando líneas celulares de hibridoma que producen un anticuerpo. Los procedimientos para preparar líneas de hibridoma son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Berzofsky y col., en Paul, ed., Fundamental Immunology, Segunda edición, pp.315-356, a 347-350, Raven Press Ltd., New York (1989). Las líneas celulares derivadas de las líneas mencionadas anteriormente son también adecuadas para la práctica de la invención.

De acuerdo con la presente invención, una célula huésped de mamífero se cultiva en condiciones que promueven la producción del polipéptido de interés, que puede ser un anticuerpo o un polipéptido recombinante. Las formulaciones del medio de cultivo de células basales son bien conocidas en la técnica. A estas formulaciones de medio de cultivo basal, el experto en la técnica añadirá componentes tales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, tampones, antibióticos, lípidos, oligoelementos y similares, dependiendo de los requisitos de las células huésped que se van a cultivar. El medio de cultivo puede o no contener suero y / o proteína. Varios medios de cultivo de tejidos, incluidos los medios de cultivo libres de suero y / o definidos, están disponibles comercialmente para el cultivo celular. El medio de cultivo tisular se define, para los propósitos de la invención, como un medio adecuado para el crecimiento de células animales, preferiblemente células de mamífero, en cultivo celular *in vitro*. Típicamente, los medios de cultivo de tejidos contienen un tampón, sales, fuente de energía, aminoácidos, vitaminas y oligoelementos esenciales. Se puede usar cualquier medio capaz de soportar el crecimiento de la célula eucariota apropiada en cultivo; la invención es ampliamente aplicable a células eucariotas en cultivo, particularmente células de mamífero, y la elección de los medios no es crucial para la invención. Los medios de cultivo tisular adecuados para su uso en la invención están disponibles comercialmente de, por ejemplo, el ATCC (Manassas, VA). Por ejemplo, se puede usar uno cualquiera o una combinación de los siguientes medios: Medio RPMI-1640, medio RPMI-1641, medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial Eagle, medio F-12K, medio de Ham F12, medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio McCoy 5A, medio Leibovitz L-15 y medios sin suero, tales como la serie EX-CELL™ 300 (disponible en JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.), entre otros, que se puede obtener de la Colección Americana de Cultivos Tipo o JRH Biosciences, así como de otros proveedores. Cuando se usa medio definido que está libre de suero y / o libre de peptona, el medio normalmente está altamente enriquecido en aminoácidos y oligoelementos. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.122.469 de Mather y col., y 5.633.162 de Keen y col.,

En los procedimientos y composiciones de la invención, las células pueden cultivarse en medios libres de suero, libres de proteínas, libres de factor de crecimiento y / o libres de peptona. La expresión "libre de suero", como se aplica a los medios, incluye cualquier medio de cultivo de células de mamífero que no contiene suero, tal como suero bovino fetal. La expresión "libre de insulina", como se aplica a los medios, incluye cualquier medio al que no se ha añadido nada de insulina exógena. Por exógena se entiende, en este contexto, otra distinta a la producida por el cultivo de las propias células. La expresión "libre de IGF-1" como se aplica a los medios, incluye cualquier medio al que no se ha añadido factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) o un análogo (tal como, por ejemplo, LongR3, [Ala31], o [Leu24] [Ala31] exógenos, análogos de IGF-1 disponibles de GroPep Ltd. de Thebarton, Australia del Sur). La expresión "libre de factor de crecimiento", como se aplica a los medios, incluye cualquier medio al que no se ha añadido factor de crecimiento exógeno (por ejemplo, insulina, IGF-1). La expresión "libre de proteínas", tal como se aplica a los medios, incluye medios libres de proteína añadida exógenamente, tal como, por ejemplo, transferrina y los factores de crecimiento de proteínas IGF-1 e insulina. Los medios libres de proteínas pueden o no tener peptonas. La expresión "libre de peptona", como se aplica a los medios, incluye cualquier medio al que no se han añadido hidrolizados de proteínas exógenas, tales como, por ejemplo, hidrolizados de proteínas animales y/o vegetales. La eliminación de peptona de los medios tiene las ventajas de reducir la variabilidad lote a lote y mejorar el procesamiento, tal como filtración. Los medios químicamente definidos son los medios en los que se define y obtiene cada componente a partir de una fuente pura, preferiblemente una fuente no animal.

El experto en la materia también puede optar por utilizar una de las muchas formulaciones de medios individualizadas que se han desarrollado para maximizar el crecimiento celular, la viabilidad celular y / o la producción de polipéptido recombinante en una célula huésped cultivada particular. Los procedimientos de acuerdo con la presente invención se pueden usar en combinación con medios de cultivo celular disponibles comercialmente o con un medio de cultivo celular que se ha formulado individualmente para su uso con una línea celular particular. Por ejemplo, un medio enriquecido que podría apoyar el aumento de la producción de polipéptido puede comprender una mezcla de dos o más medios comerciales, tales como, por ejemplo, DMEM y de medio de Ham F12 combinados en proporciones tales como, por ejemplo, 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6, 1: 7, 1: 8, o incluso hasta a 1:15 o superior. Como alternativa o adicionalmente, un medio se puede enriquecer mediante la adición de nutrientes, tales como aminoácidos o peptona, y / o se puede utilizar un medio (o la mayoría de sus componentes con las excepciones

indicadas a continuación) a una concentración mayor que la habitual recomendada, por ejemplo a 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, o a concentraciones aún más altas. Como se usa en el presente documento, "1X" significa la concentración estándar, "2X" significa dos veces la concentración estándar, etc. En cualquiera de estas realizaciones, los componentes del medio que pueden afectar sustancialmente a la osmolaridad, tales como sales, no se puede aumentar en la concentración de manera que la osmolaridad del medio cae fuera de un intervalo aceptable. Por tanto, un medio puede, por ejemplo, ser 8X con respecto a todos los componentes excepto las sales, que pueden estar presentes solo a 1X. Un medio enriquecido puede estar libre de suero y / o libre de proteínas. Adicionalmente, un medio se puede complementar periódicamente durante el tiempo que un cultivo se mantiene para reponer los componentes del medio que pueden llegar a agotarse, tales como, por ejemplo, vitaminas, aminoácidos, y precursores metabólicos. Como se conoce en la técnica, medios y temperaturas diferentes pueden tener efectos algo diferentes sobre diferentes líneas celulares, y el mismo medio y temperatura pueden no ser adecuados para todas las líneas celulares.

Las condiciones de cultivo adecuadas para células de mamífero se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, el Animal cell culture: A Practical Approach, D. Rickwood, ed., Oxford university press, New York (1992). Las células de mamífero se pueden cultivar en suspensión o mientras están unidas a un sustrato sólido. Adicionalmente, las células de mamífero pueden cultivarse, por ejemplo, en biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, botellas de rodillo, frascos de agitación, o biorreactores de tanque agitado, con o sin microportadores, y operados en modo discontinuo, de alimentación continua, semicontinua o de perfusión.

Los procedimientos de acuerdo con la presente invención pueden usarse para mejorar la producción de polipéptidos recombinantes en procesos de cultivo monofásicos o de múltiples fases. En un proceso de una sola fase, las células se inoculan en un ambiente de cultivo y los procedimientos divulgados se emplean durante la fase de producción individual. En un proceso de múltiples etapas, las células se cultivan en dos o más fases distintas. Por ejemplo, las células se pueden cultivar primero en una fase de crecimiento, en condiciones ambientales que maximizan la proliferación y la viabilidad celular, después se transfieren a una fase de producción, en condiciones que maximizan la producción de polipéptidos. Las fases de crecimiento y producción pueden estar precedidas por, o separadas por, uno o más fases de transición. En los procesos de múltiples fases, los procedimientos de acuerdo con la presente invención se emplean al menos durante la fase de producción. Una fase de crecimiento se puede producir a una temperatura más alta que una fase de producción. Por ejemplo, una fase de crecimiento puede producirse a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C, y una fase de producción puede producirse a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, opcionalmente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C. Los inductores químicos de la producción de polipéptidos, tales como, por ejemplo, cafeína, butirato y HMBA, se pueden añadir al mismo tiempo, con anterioridad, y / o después de un cambio de temperatura. Si los inductores se añaden después de un cambio de temperatura, pueden añadirse desde una hora hasta cinco días después del cambio de temperatura, opcionalmente de uno a dos días después del cambio de temperatura.

Después de la inducción usando los procedimientos de la invención, el polipéptido expresado resultante puede entonces recogerse. Además, el polipéptido puede purificarse, o parcialmente purificarse, a partir de tal cultivo o componente (por ejemplo, a partir del medio de cultivo o extractos celulares o fluido corporal) usando procedimientos conocidos. "Parcialmente purificado" significa que se han llevado a cabo algún procedimiento de fraccionamiento, o procedimientos, pero que hay presentes más especies de polipéptido (al menos 10 %) que el polipéptido deseado. Por "purificado" se entiende que el polipéptido es esencialmente homogéneo, es decir, hay presente menos del 1 % de polipéptidos contaminantes. Los procedimientos de fraccionamiento pueden incluir, pero no se limitan a, una o más etapas de filtración, centrifugación, precipitación, separación de fases, purificación por afinidad, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (CIH; utilizando resinas tales como éter de fenilo, éter de butilo o éter de propilo), HPLC, o alguna combinación de los anteriores.

Por ejemplo, la purificación del polipéptido puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que se unirán al polipéptido; una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad como concanavalina A-agarosa, heparina-TOYOPEARL® (Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Japón) o Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE® (Pharmacia Fine Chemicals, Inc., New York); una o más etapas que implican elución; y / o cromatografía de inmunoafinidad. El polipéptido se puede expresar en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, se puede expresar como un polipéptido de fusión, tales como los del polipéptido de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), o tiorredoxina (TRX). Los kits para la expresión y purificación de tales polipéptidos de fusión están disponibles comercialmente en New England Biolab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.) e InVitrogen, respectivamente. El polipéptido puede marcarse con un epítipo y purificarse después mediante el uso de un anticuerpo específico dirigido a tal epítipo. Uno de estos epítipos (FLAG®) está disponible comercialmente de Kodak (New Haven, Conn.). También es posible utilizar una columna de afinidad que comprende una proteína de unión al polipéptido, tal como un anticuerpo monoclonal frente al polipéptido recombinante, para purificar por afinidad los polipéptidos expresados. Otros tipos de etapas de purificación por afinidad puede ser una columna de proteína A o de proteína G, en las que los agentes de afinidad se unen a proteínas que contienen dominios Fc. Los polipéptidos se pueden extraer de una columna de afinidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, en un tampón de elución rico en sal y luego se dializaron en un tampón pobre en sal para su uso o cambiando el pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada, o se pueden extraer competitivamente utilizando el sustrato de origen natural del resto de afinidad.

- El grado deseado de pureza final depende del uso previsto del polipéptido. Se desea un grado relativamente alto de pureza cuando el polipéptido se va a administrar in vivo, por ejemplo. En tal caso, los polipéptidos se purifican de tal manera que no hay bandas de polipéptido correspondientes a otros polipéptidos detectables tras el análisis mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Un experto en el campo pertinente reconocerá que se pueden visualizar múltiples bandas correspondientes al polipéptido mediante SDS-PAGE, debido a glicosilación diferencial, procesamiento postraducciona diferencial, y similares. Opcionalmente, el polipéptido de la invención se purifica hasta una homogeneidad sustancial, como indica una única banda de polipéptido tras análisis por SDS-PAGE. La banda de polipéptido puede visualizarse mediante tinción con plata, tinción con azul de Coomassie, o (si el polipéptido está radiomarcado) mediante autorradiografía.
- La invención también abarca opcionalmente la formulación adicional de los polipéptidos. Por el término "formular" se entiende que los polipéptidos pueden intercambiarse con tampón, esterilizarse, envasarse a granel, y / o envasarse para un usuario final. Para los propósitos de la invención, la expresión "forma de masa estéril" significa que una formulación está libre, o esencialmente libre, de contaminación microbiana (a un grado tal que es aceptable para fines de alimentación y / o de fármacos), y tiene una composición y concentración definidas. El término "forma de dosis unitaria estéril" significa una forma que es adecuada para el cliente y / o la administración o el consumo por el paciente. Tales composiciones pueden comprender una cantidad eficaz del polipéptido, en combinación con otros componentes tales como un diluyente, vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. La expresión "fisiológicamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o los ingredientes activos.
- Formulaciones adecuadas para la administración incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre que se pretenda; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los polipéptidos pueden formularse de acuerdo con procedimientos conocidos utilizados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Pueden combinarse en mezcla, ya sea como el único material activo o con otros materiales activos conocidos adecuados para una indicación dada, con diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, soluciones tamponadas con solución salina, Tris-HCl, acetato y fosfato), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y / o vehículos. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. Además, tales composiciones pueden formar complejos con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, o incorporarse en compuestos poliméricos tales como ácido poliácético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextrano, etc., o incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoblastos. Los lípidos adecuados para formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de tales formulaciones liposomales está dentro del nivel de habilidad en la técnica, como se divulga en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 4.737.323. Tales composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo, y la velocidad de eliminación in vivo, y, por lo tanto, se eligen según la aplicación prevista, de modo que las características del vehículo dependerán de la vía de administración seleccionada. Las formas de liberación sostenida adecuadas para su uso incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que están encapsulados en un polímero biocompatible de disolución lenta (tales como las micropartículas de alginato descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 6.036.978), mezcladas con un polímero de este tipo (incluyendo hidrogeles aplicados tópicamente) y o encerrados en un implante semipermeable biocompatible.

Habiéndose descrito la invención se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración, y no de limitación.

Ejemplo 1

45 Comparación de la actividad inductora de la cafeína y el butirato a 31 °C

En este experimento, la cafeína (a concentraciones de 0,5 a 2,0 mM) se comparó con el butirato de sodio por su capacidad para inducir la expresión de un polipéptido recombinante. Se usó una línea de producción de células CHO modificada mediante ingeniería genética para que expresara TNFR: Fc (línea celular n.º 5) para probar la eficacia de la cafeína como agente inductor. Las células CHO se cultivaron en matraces de agitación a 37 °C utilizando medio de crecimiento libre de suero que contiene metotrexato. Cuando se obtuvo la masa celular apropiada, las células se colocaron en condiciones de inducción mediante una centrifugación de cinco minutos a 1.000 x g, seguido de la sustitución del medio de crecimiento con medio libre de suero sin metotrexato. Las células, a las densidades celulares iniciales de 2×10^6 células / ml en 20 ml, se introdujeron en matraces Erlenmeyer de 125 ml de plástico con tapas de sellado blandas y se colocaron en plataformas de agitación en incubadores fijados a las temperaturas apropiadas. La viabilidad y el número de las células se controlaron mediante recuento en hemocitómetro utilizando colorante azul tripán. Los títulos del polipéptido recombinante se evaluaron mediante ensayos basados en ELISA.

Para esta línea celular, se sabía que 0,2 mM era la concentración óptima de butirato de sodio para la inducción. De acuerdo con lo anterior se comparó el butirato de sodio 0,2 mM contra los efectos inductores de la cafeína a 0,5, 1,0,

y 2,0 mM. También se incluyó un matraz que no contenía ningún compuesto inductor. Los matraces de agitación se incubaron en esta fase de inducción durante 5 días a 31 °C en los incubadores sin control de dióxido de carbono.

Después de 5 días de cultivo, las viabilidades celulares para todas las condiciones analizadas fueron muy similares y oscilaron entre el 75 y el 85 %. El título relativo más elevado de proteína (en ng/ml), que fue de aproximadamente 1,15 veces el título del cultivo control sin inductores y la productividad relativa (en μg de proteína / 10^6 células / día), que fue aproximadamente 1,3 veces la productividad del cultivo control, lo exhibió las células que fueron inducidos con cafeína 1 mM. Las células inducidas con butirato 0,2 mM produjeron aproximadamente 1,11 veces la proteína total (en μg / ml), producida por el cultivo control a una velocidad (en μg de proteína/ 10^6 células / día), que fue de aproximadamente 1,07 veces la velocidad de los cultivos control. Se observaron títulos de proteínas similares en las células inducidas con cafeína 0,5 mM, aunque estos cultivos tenían velocidades de producción ligeramente más altas. A concentraciones de cafeína de 2 mM, el título de proteínas fue similar al observado sin agente inductor, aunque la tasa de productividad por célula fue mayor.

Estos resultados indican que se puede usar cafeína como agente inductor y puede inducir títulos de producto iguales o superiores a aquellos observados utilizando butirato de sodio como agente inductor. Además, se obtuvieron más datos experimentales que indicaban que el polipéptido recombinante producido usando la cafeína fue igual en lo que respecta a la calidad del producto (por ejemplo, glicosilación, plegamiento y composición de aminoácidos) al producido utilizando butirato de sodio.

Ejemplo 2

Inducción de la expresión del polipéptido recombinante en la línea celular n.º 9

En este experimento, el efecto de la cafeína (a concentraciones de 0 a 1,4 mM) sobre la inducción de la expresión de un polipéptido recombinante diferente, se examinó una forma soluble del receptor de la IL-1 de tipo II, en una segunda línea celular CHO (línea celular n.º 9).

Las células CHO se cultivaron en matraces de agitación a 37 °C utilizando medio de crecimiento libre de suero que contiene metotrexato. Cuando se obtuvo la masa celular adecuada, se retiró el medio gastado mediante una centrifugación de cinco minutos a $1.000 \times g$ y se reemplazó con medio de producción sin metotrexato. Las células, con densidades celulares iniciales de 2×10^6 células / ml en 20 ml, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml de plástico con tapas de sellado blandas. Se analizaron las siguientes concentraciones de cafeína: cafeína 0, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 y 1,4 mM. Los matraces se incubaron después en esta fase de inducción durante 5 días a 31 °C en los incubadores sin control de dióxido de carbono. La viabilidad y el número de las células se controlaron mediante recuento en hemocitómetro utilizando colorante azul tripán. Los títulos del polipéptido recombinante se evaluaron mediante ensayos basados en ELISA. Cada experimento evaluación de la inducción se llevó a cabo durante 5 días.

Después de 5 días en cultivo, la viabilidad celular para la mayoría de las condiciones analizadas fue similar y de un promedio de aproximadamente 85 %. Figura 1. Para el matraz inducido con la cafeína 1,4 mM, se observó una viabilidad celular del 67 % después de 5 días. Se observaron títulos de proteínas similares usando cafeína 0,6 mM, 0,8 mM, y 1,0 mM, es decir, de aproximadamente 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que es igual al título observado para butirato 0,5 mM. Figura 2. Dado que 0,6 mM es la concentración de cafeína más baja analizada, estos datos no excluyen la posibilidad de que incluso concentraciones más bajas de cafeína podrían dar resultados iguales o mejores. La mayor productividad (en μg de proteína / 10^6 células / día) observada para un cultivo inducido con cafeína estaba en el cultivo de cafeína 0,8 mM. Figura 3. A los niveles más altos de cafeína, es decir, 1,2 y 1,4 mM, los títulos de proteína fueron comparables con el control negativo (sin agente inductor), aunque la productividad por célula fue algo mayor. Figuras 2 y 3.

Ejemplo 3

Inducción de la expresión del polipéptido recombinante en la línea celular n.º 60

En este experimento, se analizó el uso de la cafeína para inducir la producción recombinante a partir de una tercera línea celular de CHO (línea celular n.º 60) que expresa un tercer producto recombinante, un anticuerpo humano que reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Para esta línea celular se analizaron los efectos inductores de cafeína 0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 mM y el experimento se realizó como en el experimento anterior, excepto que la fase de inducción se realizó a 36 °C.

Al día 5, el matraz de células sin inductor y el matraz de células inducidas con cafeína 0,5 mM exhibieron las viabilidades celulares más altas (aproximadamente 76 %) de todas las condiciones. Las viabilidades de cultivos que contienen cafeína 1,0 mM y 1,5 mM fueron aproximadamente 68 % y 60 %, respectivamente. Los cultivos que contienen butirato 0,75 mM o cafeína 2,0 mM tuvieron una viabilidad de aproximadamente 51 %. Por lo tanto, la viabilidad, en general, fue menor que la observada en la línea celular n.º 9 a los 5 días, un efecto que podría atribuirse a diversos factores, incluyendo la diferencia de temperatura y / o las diferencias en la línea celular. Se observó una respuesta a la dosis clara con concentraciones de cafeína superiores que conducen a viabilidades celulares menores.

- 5 El título de proteínas a 5 días más alto se observó en las células inducidas con cafeína 0,5 mM (305 µg / ml), que fue de aproximadamente 111 % del título del cultivo control sin inductor. En general, el título del polipéptido recombinante fue menor a medida que las concentraciones de cafeína aumentaban por encima de 0,5 mM. La productividad (en µg de proteína / 10⁶ células / día) parecía estar ligado a la concentración de cafeína, con la mayor productividad obtenida a partir de células inducidas con cafeína 2,0 mM y un nivel más bajo de productividad obtenido a partir de las células inducidas con concentraciones de cafeína menores. Puesto que un 0,5 mM fue la concentración de cafeína más baja analizada, así como la concentración más eficaz analizada para la inducción de la producción de proteínas, estos datos no excluyen la posibilidad de que una menor concentración de cafeína podría ser igual o más eficaz que un inductor de la línea celular n.º 60 incubada a 36 °C.
- 10 Este experimento, junto con los descritos en los Ejemplos 1 y 2, demuestra que la capacidad de la cafeína para inducir la expresión del polipéptido recombinante no es específica de la línea celular y la viabilidad celular favorable que se mantiene en presencia de cafeína. Además, la cafeína se puede usar en una fase de inducción o de producción implementada a temperaturas de 31 °C a 36 °C. Sin embargo, estos datos también indican diferencias entre líneas celulares en cómo la cafeína induce la síntesis de una proteína recombinante. Por ejemplo, la inducción de la línea celular n.º 9 con cafeína es más eficaz que la inducción de la línea celular n.º 60. Compárese el Ejemplo 2 y la Figura 2 con el Ejemplo 3.

Ejemplo 4

Optimización de la inducción para la línea celular n.º 60

- 20 El propósito de este experimento era analizar los intervalos de temperatura y de concentraciones de cafeína en matraces de agitación con el fin de optimizar las condiciones de inducción para la línea celular n.º 60.

Materiales y procedimientos. Doce matraces de agitación se establecieron en las condiciones descritas en la Tabla 1.

TABLA 1: Concentraciones de cafeína y temperaturas de las muestras

| Número de matraz | Temperatura (°C) | Cafeína (mM) |
|------------------|------------------|--------------|
| 1 | 36 | 0 |
| 2 | 36 | 0,5 |
| 3 | 36 | 1,0 |
| 4 | 36 | 1,5 |
| 5 | 36 | 2,0 |
| 6 | 36 | 2,5 |
| 7 | 37 | 0 |
| 8 | 37 | 0,5 |
| 9 | 37 | 1,0 |
| 10 | 37 | 1,5 |
| 11 | 37 | 2,0 |
| 12 | 37 | 2,5 |

- 25 Las células se recogieron mediante centrifugación a partir de un cultivo giratorio de la línea celular n.º 60 (26,85 x 10⁵ células / ml, 95,2 % viables) y se inocularon en un matraz de agitación de 575 ml a 2 x 10⁶ células / ml en medio de producción libre de suero. Después, el cultivo se dividió en alícuotas en doce matraces de agitación. Se añadió cafeína según el plan experimental descrito en la Tabla 1. Los matraces de agitación se incubaron a las temperaturas designadas durante 7 días. Se tomaron muestras los días 3, 5 y 7. La densidad y la viabilidad celular se midieron usando un sistema automatizado de recuento de células que emplea tinción con azul tripán para determinar la viabilidad (la sistema de análisis de la densidad celular o Cedex, desarrollado por innovatis GmbH, Bielefeld, Alemania). Se realizaron mediciones de glucosa y lactato con Yellow Springs Instruments 2700 Select (disponible en Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, EE.UU.). Se añadió glucosa a demanda para mantener una concentración de > 2 g / l. El CO₂ y pH externo se midieron utilizando el analizador de gas en sangre Ciba-Corning 248 (disponible en Bayer Diagnostics, Tarryton, New York, EE.UU.). Los títulos de proteína se determinaron a través de un prepurificación del anticuerpo sobre una columna de proteína A seguida de una

medición de la absorbancia de la proteína unida y eluida de la columna a 280 nanómetros. Las densidades de células viables acumuladas (CVCD) se calcularon de la siguiente manera: la CVCD para el día 1 es el número de células viables por mililitro de cultivo medido el día 1; la CVCD para el día 2 es el número de células viables por mililitro de cultivo tal como se mide el día 2 más el número de células viables por mililitro de cultivo tal como se mide el día 1; la CVCD para el día 3 es el número de células viables por mililitro de cultivo tal como se mide el día 3 más el número de células viables por mililitro de cultivo medido los días 1 y 2; y las CVCD para los días posteriores se calculan de manera similar.

Resultados. Se alcanzaron CVCD en presencia de poca o nada de cafeína. La temperatura más baja, es decir, 36 °C en lugar de 37 °C, y niveles más bajos de cafeína dieron como resultado una viabilidad final más alta. La cafeína a 2,5 mM dio lugar a la muerte celular y la terminación de los cultivos. Para el resto del intervalo de concentración analizado, niveles de cafeína más altos dieron como resultado una mayor productividad específica acumulada (Cum Qp), siendo el nivel más alto de casi 30 µg / 10⁶ células / día. Los cultivos que contienen los niveles más altos de cafeína que tiene como resultado cultivos viables (2 mm), al tiempo que tienen un Cum Qp alto, tenían una CVCD baja, lo que indica que la cafeína 2 mM disminuyó la viabilidad celular, pero aumentó la productividad de las restantes células viables. Sin embargo, los títulos de proteína de los cultivos inducidos con cafeína 2 mM fueron menores que para los cultivos no inducidos a los 7 días a ambas temperaturas.

Los títulos más altos de proteína dan como resultado a niveles bajos o intermedios de cafeína para ambas temperaturas. El título del día 7 más alto se observó en el cultivo que ha crecido a 36 °C en presencia de cafeína 0,5 mM, y su título fue aproximadamente 124 % del título observado en un cultivo control que ha crecido a 36 °C durante 7 días sin inductores. Los títulos del día 7 de cultivos sembrados a 36 °C en presencia de 1,0 mM y cafeína 1,5 mM fueron aproximadamente 116 % y 111 % de los niveles control, respectivamente. Los títulos del día 7 de los cultivos sembrados a 37 °C en presencia de cafeína 0,5 mM, 1,0 mM y 1,5 mM fue de aproximadamente 110 %, 112 % y 109 %, respectivamente, del cultivo control sin inductor a 37 °C. En conjunto, estos datos indican que la inducción de la línea celular n.º 60 fue más eficaz a 36 °C de lo que era a 37 °C. Los títulos del día 7 de los cultivos control sin inductores cultivados a 36 °C y 37 °C fueron comparables. Por lo tanto, como en el Ejemplo 3, la concentración más baja de cafeína analizada condujo a los títulos más altos de proteína a 36 °C, lo que sugiere la posibilidad de que las concentraciones aún más bajas podrían producir títulos iguales o superiores.

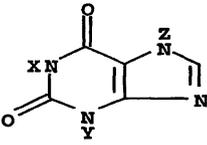
En resumen, la inducción con cafeína aumenta la productividad específica y el título tanto a 36 °C como a 37 °C. Los títulos fueron modestamente superiores a 36 °C que a 37 °C, a pesar de valores Cum Qp más bajos debido a las CVCD y la viabilidad mayores a la temperatura más baja. Basado en el rendimiento y la productividad celular, la cafeína puede usarse para inducir la producción de esta línea celular.

Ejemplo 5

Efectos de inducción para compuestos relacionados con la cafeína en la línea celular n.º 9

Dado que los experimentos anteriores mostraron que la cafeína como agente inductor aumentó los títulos de polipéptido recombinante entre aproximadamente 9 % y aproximadamente 67 %, se realizaron experimentos adicionales con otros derivados de xantina para analizar su capacidad de inducción. Sobre la base de la estructura de la xantina, se modelaron diversos compuestos y elegido para el análisis. Estos incluyen 3-isobutil-1-metilxantina, teofilina, teobromina, pentoxifilina, y aminofilina, cuyas estructuras se ilustran a continuación.

TABLA 2: Derivados de xantina

| Compuesto |  | | |
|---------------------------------|---|-----------|-----------|
| | X | Y | Z |
| Cafeína | metilo | metilo | metilo |
| 3-isobutil-1-metilxantina (IBX) | metilo | isobutilo | hidrógeno |
| teofilina | metilo | metilo | hidrógeno |
| teobromina | hidrógeno | metilo | metilo |
| pentoxifilina | 5-oxihexilo | metilo | metilo |

La aminofilina es un compuesto teofilina con 1,2-etilendiamina (2: 1) dihidrato.

Estos derivados de xantina, incluyendo algunas combinaciones, se analizaron en la línea celular n.º 9 en un formato de frasco de agitación (20 ml en matraces de agitación de 125 ml) como se ha descrito anteriormente para los Ejemplos 1 y 2. Para disolver 3-isobutil-l-metilxantina (IBX), se solubiliza en agua calentada a casi el punto de ebullición, y rápidamente se añadió a los matraces antes de que precipitara. Como alternativa, IBX se disolvió en DMF. La fase de inducción del cultivo celular se llevó a cabo durante 6 días a 31 °C, y se retiraron muestras para análisis a los puntos de tiempo de 3 días y 6 días. Los títulos de proteínas de cada matraz de agitación se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3: Título del polipéptido recombinante en varias condiciones de inducción

| Condición | Título (µg/ml) Día 3 | Título (µg/ml) Día 6 |
|---|----------------------|----------------------|
| Cafeína 0,6 mM + butirato 0,5 mM | 120 | 280 |
| Teobromina 0,1 mM | 90 | 270 |
| Teobromina 0,5 mM | 100 | 260 |
| Teobromina 1 mM | 100 | 260 |
| Aminofilina 0,1 mM | 110 | 260 |
| Aminofilina 0,5 mM | 120 | 250 |
| Aminofilina 1 mM | 100 | 200 |
| Pentoxifilina 0,1 mM | 110 | 320 |
| Pentoxifilina 0,5 mM | 130 | 380 |
| Pentoxifilina 1 mM | 130 | 400 |
| 0,3 % de DMF + IBX 0,5 mM | no determinado | 340 |
| 0,3 % de DMF | 120 | 330 |
| IBX 0,5 mM | 150 | 420 |
| IBX 0,5 mM + cafeína 0,6 mM | 130 | 370 |
| IBX 0,1 mM + cafeína 0,6 mM | 140 | 390 |
| IBX 0,1 mM + cafeína 0,6 mM + butirato 0,5 mM | 130 | 280 |
| IBX 0,1 mM + cafeína 0,6 mM + 0,3 % de DMF | 150 | 390 |
| Cafeína 0,2 mM | 150 | 400 |
| Cafeína 0,6 mM | 120 | 320 |
| Butirato 0,5 mM | 100 | 220 |
| SIN INDUCTOR | 100 | 290 |

10 Varias conclusiones se pueden extraer de estos datos. La producción del matraz inducida con IBX 0,5 mM fue incluso mejor que la cafeína, y los 3 matraces que contienen pentoxifilina también dieron resultados prometedores. Los títulos de los cultivos inducidos con pentoxifilina se incrementaron al aumentar la dosis y fueron más altos que el título del cultivo control sin inductor. Adicionalmente, algunas combinaciones de diferentes derivados de xantina, así como diferentes derivados de xantina con otros agentes inductores (por ejemplo, butirato y / o DMF) produjeron

15 títulos de proteínas por encima de los niveles de control. La teobromina y la aminofilina no indujeron títulos de proteínas superiores a los observados en el cultivo control sin inductor. Los títulos de proteínas más altos obtenidos cuando se usó cafeína como inductor se obtuvieron a la concentración más baja analizada, es decir, cafeína 0,2 mM. Como se ha explicado anteriormente, dicho resultado deja abierta la posibilidad de que incluso concentraciones más bajas de cafeína pueden ser eficaces. Por último, a diferencia de en el Ejemplo 2 (Figura 2), el butirato no induce

20 aumento del título de proteínas sobre el que se observa en un cultivo sin inductor.

EJEMPLO 6**Inducción de la línea celular n.º 60 por varios agentes inductores a 37 °C**

Este experimento se realizó en matraces Erlenmeyer de agitación como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2, excepto que los matraces se incubaron durante 5 días a 37 °C, en lugar de a 31 °C, y se usó la línea celular n.º 60. Como control, un frasco sin inductores se cultivó a 31 °C. El título de polipéptido recombinante en el medio se analizó después de 5 días. Los derivados de xantina analizados incluyeron cafeína (a 0,5 mM), teobromina (a 0,1 mM, 0,5 mM, y 1,0 mM), 3-isobutil-1-metilxantina (IBX, a 0,05 mM, 0,1 mM, y 0,15 mM), y pentoxifilina (a 0,1 mM, 0,5 mM, y 1,0 mM). Además, se analizaron butirato, algunas combinaciones de inductores, y el compuesto no xantina papaverina.

El cultivo control a 31 °C produjo títulos bajos de proteínas en comparación con el cultivo control a 37 °C, probablemente debido a la preferencia de la línea celular n.º 60 para temperaturas más altas. La teobromina a una concentración de 0,1 mM aumentó el título de proteínas sobre el observado en el cultivo de control a 37 °C, pero fue contraproducente a concentraciones más elevadas (0,5 mM y 1,0 mM). Ni cafeína, IBX o pentoxifilina aumentaron los títulos de proteínas por encima de los observados en un cultivo de control sin inductores. El título de proteínas fue inversamente proporcional a las concentraciones de teobromina, IBX y pentoxifilina en los intervalos analizados. Curiosamente, la línea celular n.º 9 (Tabla 3, Ejemplo 5) mostró un aumento de los títulos de proteínas con concentraciones crecientes de pentoxifilina dentro de este mismo intervalo, lo que destaca la variabilidad en las respuestas de diferentes líneas celulares incubadas a diferentes temperaturas a agentes inductores. Como en otros experimentos (véase el Ejemplo 3), la cafeína 0,5 mM parece ser un mejor inductor que el butirato 0,5 mM para la línea celular n.º 60, aunque ambos fallaron en lo que respecta al título de proteínas sobre el observado en el cultivo control sin agente inductor en este experimento. En un experimento anterior, la cafeína había inducido una producción de proteínas ligeramente mayor a la observada en un cultivo control a 37 °C el día 7 (aproximadamente el 110 % del título observado en el cultivo de control), aunque se observó una mayor inducción a 36 °C. El fracaso de la cafeína para inducir un aumento de la producción de proteínas en este experimento se puede explicar por diversos factores tales como la variabilidad experimental, el pequeño tamaño del efecto positivo a 37 °C en la línea celular n.º 60, y / o la posibilidad de que 0,5 mM no puede no ser una concentración de cafeína óptima para la inducción de la línea celular n.º 60 a 37 °C.

Ejemplo 7**Producción de RANK:Fc en presencia de cantidades variables de HMBA**

Se introdujeron en células CHO ácidos nucleicos que codifican RANK:Fc insertado en un vector adecuado (como se describe en la solicitud internacional WO 01/36637). Aproximadamente 2 millones de células de una línea transformada de forma estable propagada a 37 °C se inocularon en 20 mililitros de medio a 31 °C, ya sea sin HMBA o en presencia de concentraciones variables de HMBA, como se indica en la Tabla 4. Las células se cultivaron durante un total de 5 días en matraces agitadores. Después se recolectó todo el medio. El número de células presentes en el cultivo se determinó mediante tinción con azul tripán y contando las células en un hemocitómetro. El título de RANK:Fc por mililitro de medio recolectado se determinó mediante purificación de RANK:Fc mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de proteína A y la medición posterior de la absorbancia a 280 nanómetros. Un número medio de células en el cultivo se calculó promediando el número inicial y final de células. La productividad específica se determinó a partir del número total de microgramos de RANK:Fc producido, un número promedio de células (calculado como se ha descrito anteriormente) y el número de días de crecimiento. Los datos de este experimento se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4: Efectos de concentraciones variables de HMBA sobre el título de proteínas y productividad específica

| Concentración de HMBA (mM) | Productividad específica ($\mu\text{g}/10^6$ células/día) | Título de RANK:Fc ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|----------------------------|--|---|
| 0 | 17,1 | 272 |
| 0,1 | 19,1 | 243 |
| 0,5 | 19,5 | 347 |
| 2,0 | 23,9 | 444 |

Estos datos indican que la adición de HMBA a concentraciones de 0,5 o 2,0 mM tuvo efectos positivos en la producción de polipéptidos y la productividad específica.

Ejemplo 8

Producción de RANK:Fc en presencia de HMBA, cafeína y/o ácido butírico

5 Se introdujeron en células CHO ácidos nucleicos que codifican RANK:Fc insertado en un vector adecuado (como se describe en la solicitud internacional WO 01/36637). Aproximadamente 2 millones de células de una línea transformada de forma estable propagada a 37 °C se inocularon en 20 mililitros de medio sin suero a 31 °C, sin inductores o en presencia de HMBA y/o cafeína y/o ácido butírico, como se indica en la Tabla 5. Las células se cultivaron durante un total de 5 días en matraces agitadores. Después se recolectó todo el medio. El número de
10 células presentes en el cultivo, el título de RANK:Fc por mililitro de medio recolectado y la productividad específica se determinaron como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 7. Los datos de este experimento se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5: Efectos de la cafeína, HMBA y ácido butírico por separado y en combinación sobre el título de proteínas y la productividad específica

| Inductor | Productividad específica (µg/10 ⁵ células/día) | Título de RANK:Fc (µg/ml) |
|--|---|---------------------------|
| Ninguna | 14,8 | 261 |
| HMBA (2 mM) | 22,8 | 410 |
| Cafeína (1 mM) | 23,6 | 362 |
| Ácido butírico (0,5 mM) | 31,6 | 476 |
| HMBA (2 mM)+ Cafeína (1 mM)+ ácido butírico (0,5 mM) | 46,7 | 553 |

15 Estos datos indican que la adición de cafeína (a 1 mM), ácido butírico (a 0,5 mM) o HMBA (a 2 mM) tuvo efectos positivos sobre la producción de polipéptidos y productividad específica y que la combinación de ácido butírico, la cafeína y HMBA (a las concentraciones mencionadas anteriormente) tuvieron mayores efectos positivos que cualquiera de estos compuestos solos.

Ejemplo 9

Producción del receptor de IL-1 de tipo II en presencia de HMBA en un biorreactor

20 Los ácidos nucleicos que codifican un receptor de IL-1 de tipo II insertados en un vector adecuado se introdujeron en células CHO. Aproximadamente 500 mil células de una línea transformada de forma estable se inocularon en un litro de medio libre de suero en un biorreactor. Las células se cultivaron durante dos días a 37 °C. Después, las células se cambiaron a 31 °C, ya sea sin HMBA o en presencia de HMBA 2 mM, y se cultivaron durante 12 días más. Después se recolectó todo el medio. El receptor de IL-1 de tipo II por mililitro de medio recogido se determinó
25 mediante purificación por HPLC de fase inversa, seguido de la medición de la absorbancia a 280 nanómetros. Los datos de este experimento se muestran en la Tabla 6 como un porcentaje del promedio de los títulos de proteínas obtenidos a partir de las dos muestras sin HMBA redondeado al número entero más cercano.

TABLA 6: Efectos de HMBA 2 mM sobre el título de proteínas

| Inductor | Título relativo del receptor de IL-1 de tipo II (porcentaje del promedio de las muestras sin HMBA) |
|-------------|--|
| Ninguno | 99 % |
| Ninguno | 101 % |
| HMBA (2 mM) | 120 % |
| HMBA (2 mM) | 125 % |

Estos datos muestran que los cultivos de biorreactor cambiaron a 31 °C después de una fase de crecimiento inicial a 37 °C produjeron más receptor de IL-1 de tipo II si el HMBA se añadió en el momento del cambio de temperatura que si no. Estos datos sugieren además que la invención puede ser útil para producir diversos polipéptidos en varias líneas celulares y que la mecánica de cómo se cultivan las células, por ejemplo, en un matraz de agitador de frente en un biorreactor, no son críticos.

Ejemplo 10

Producción de un anticuerpo contra el receptor de IL-4 murino en células CHO

El experimento descrito a continuación analiza los efectos de usar butirato de sodio o HMBA como un inductor en todavía otra línea celular a varias temperaturas.

Los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo contra un receptor de IL-4 murino insertados en un vector adecuado se introdujeron en células CHO. Aproximadamente dos millones de células de una línea transformada de forma estable propagada a 37 °C se inocularon en 20 mililitros de medio a las temperaturas indicadas en la Figura 4 y en presencia o ausencia de HMBA (2 mM) o butirato de sodio (0,5 mM), como se indica en la Figura 4. Las células se cultivaron durante un máximo de 14 días en un matraz agitador. Se extrajeron alícuotas en los tiempos indicados en la Figura 4, y el título del anticuerpo (en microgramos por mililitro de medio cosechado) se determinó mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un procedimiento bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo Reen (1994), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), en Basic Protein and Peptide Protocols, Methods Mol. Biol. 32:461-466. Los resultados se muestran en la Figura 4. Estos datos indican que el crecimiento a 31 °C dio como resultado la producción de más anticuerpos durante un tiempo más largo que el crecimiento a 34 °C o 37 °C cuando se cosechó medio a los 7 días o más tarde. Estos datos también indican que tanto el HMBA como el butirato de sodio, de forma individual, aumentó la producción del anticuerpo y que el HMBA lo hizo en mayor medida de lo que lo hizo el butirato de sodio a 31 °C.

Ejemplo 11

Producción de TNFR:Fc en células CHO

Se introdujeron ácidos nucleicos que codifican TNFR: Fc humano en un vector adecuado en células CHO. Aproximadamente $3 \pm 0,5 \times 10^6$ células de una línea celular transformada de forma estable propagada a 37 °C se introdujeron en cada uno de tres biorreactores 1 litro y se cultivaron a 32,5 °C en un medio enriquecido libre de suero. Se añadió butirato de sodio (0,5 mM) a los tres cultivos y se añadió HMBA (2 mM) a dos de los cultivos ("día 1 + HMBA") un día después el cambio a 32,5 °C. Las células se incubaron durante un total de 11 días a 32,5 °C. Se recolectó el medio y el título de proteínas se determinó midiendo la densidad óptica a 280 nanómetros tras una purificación previa usando cromatografía de perfusión con proteína A POROS® (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Estos resultados se muestran en la Tabla 7 como un porcentaje del título obtenido de la muestra sin HMBA ("día 1") redondeados al número entero más cercano.

TABLA 7: Efectos del momento de la adición de inductores

| | Título relativo de TNFR:Fc (porcentaje del título el día 0) |
|--------------|---|
| Día 1 | 100 % |
| Día 1 + HMBA | 131 % |
| Día 1 + HMBA | 110 % |

Estos datos indican que la adición de HMBA aumentó el título de TNFR:Fc producido por estos cultivos cuando se añade un día después de un cambio de temperatura a 32,5 °C. Estos datos, junto con los datos en los ejemplos anteriores, indican que la adición de HMBA puede aumentar el título de proteínas cuando se añade en el momento de o después de un cambio a una temperatura más baja.

La fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son para el propósito de descripción y no de limitación.

REIVINDICACIONES

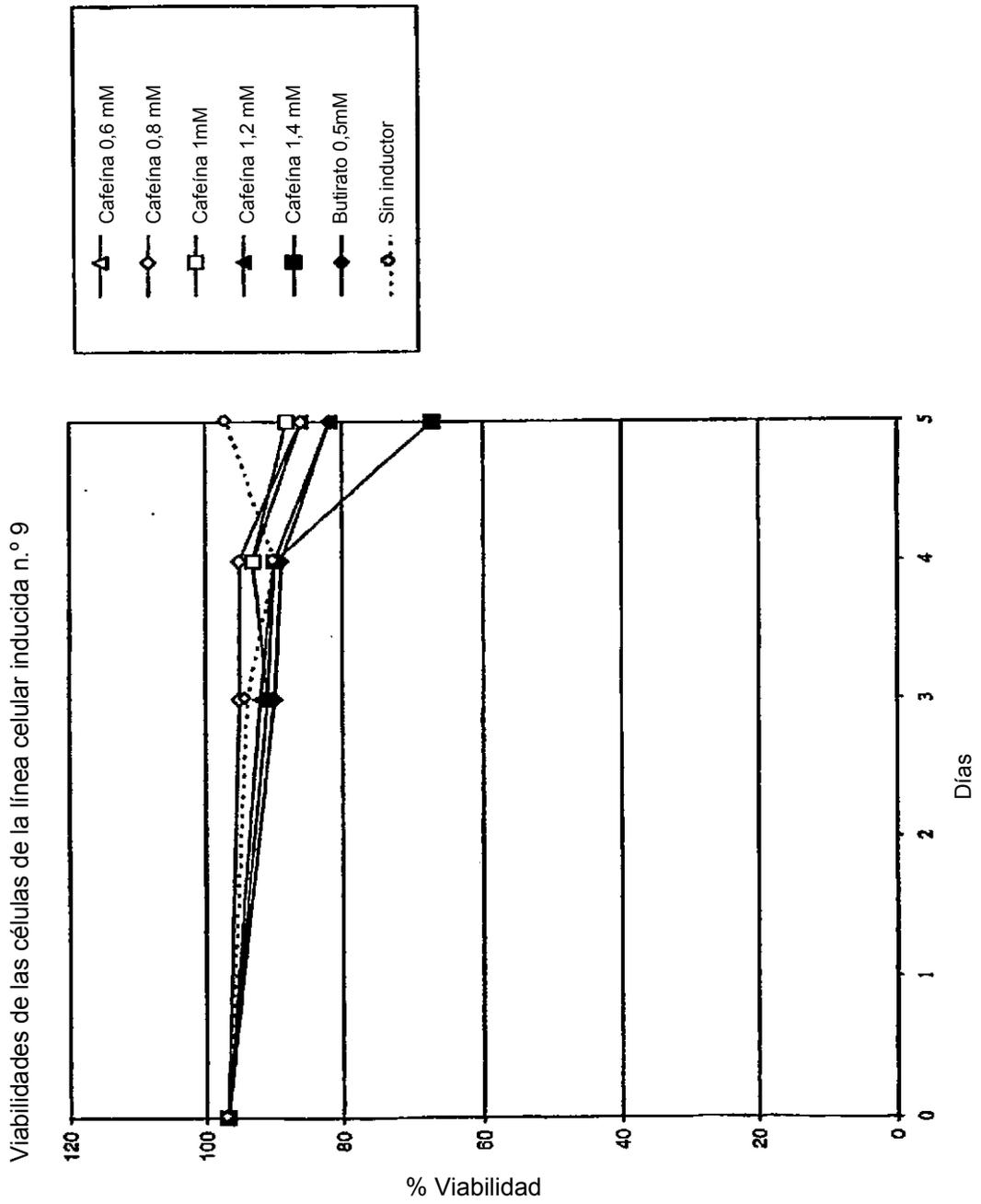
- 5 1. Un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende el cultivo de una línea celular de mamífero a una temperatura de 29 °C a 36 °C en un medio que comprende hexametileno bisacetamida (HMBA), en el que la línea celular de mamífero se ha modificado mediante ingeniería genética para producir el polipéptido y en el que la presencia de hexametileno bisacetamida (HMBA) aumenta la producción del polipéptido.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un polipéptido recombinante o un anticuerpo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el HMBA está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 20 milimolar.
- 10 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el HMBA en el medio está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende al menos una de las siguientes etapas:
 - 15 (a) cultivar la línea celular de mamífero a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C antes de cambiarla a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 36 °C, en el que el HMBA se añade después del cambio de la primera temperatura a la segunda temperatura; o
 - (b) cultivar la línea celular de mamífero a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 33 °C; en el que la línea celular de mamífero es una línea celular CHO.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio comprende al menos uno de:
 - (a) un ácido alcanoico a una concentración de aproximadamente 0,05 milimolar a aproximadamente 10 milimolar; o
 - (b) un derivado de xantina,
 en el que el medio está libre de suero.
- 25 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido recombinante es un polipéptido secretado.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el medio comprende al menos:
 - 30 (a) una sal de ácido butírico a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar; o
 - (b) HMBA a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio comprende al menos uno de:
 - (a) cafeína; o
 - (b) una sal de ácido butírico.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la cafeína está presente en una concentración de aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 3 milimolar y la sal de ácido butírico está presente a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además la recuperación del polipéptido recombinante del medio.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la línea celular de mamífero se cultiva a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C, y después se cultiva a una segunda temperatura entre aproximadamente 29 °C y 36 °C.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el HMBA se añade después del cambio de la primera temperatura a la segunda temperatura.
- 45 14. El procedimiento de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el medio comprende uno o más de:
 - (a) un ácido alcanoico; o

(b) un derivado de xantina a una concentración de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5,0 milimolar y un ácido alcanoico a una concentración de aproximadamente 0,05 milimolar a aproximadamente 10,0 milimolar y el HMBA a una concentración de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 5 milimolar;

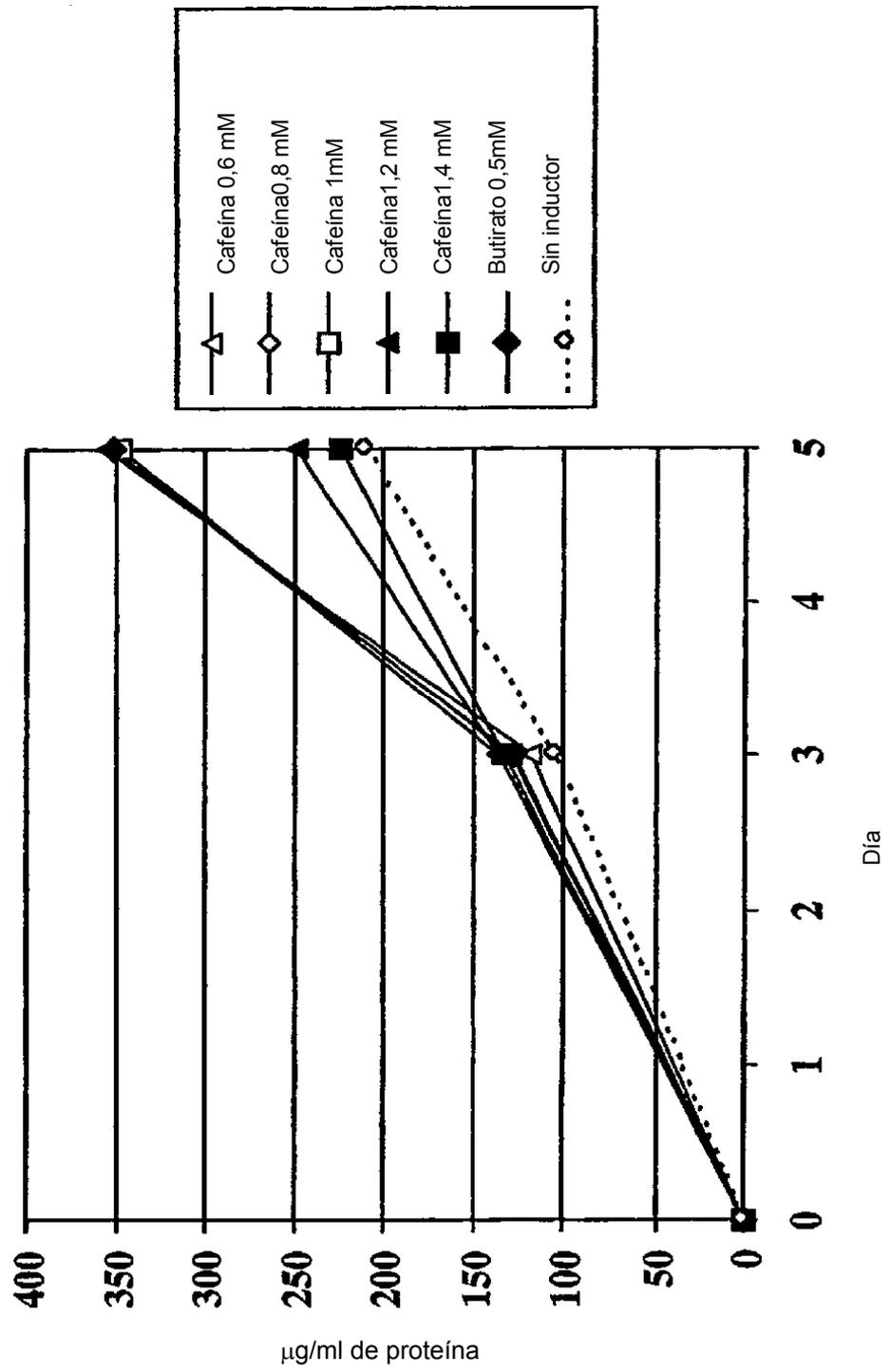
en el que el medio está libre de suero.

- 5 **15.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la línea celular de mamífero es una línea celular de hibridoma o una línea celular CHO.
- 16.** El procedimiento de la reivindicación 14 (a), en el que el ácido alcanoico es una sal de ácido butírico.
- 10 **17.** El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el medio de cultivo comprende HMBA entre aproximadamente 0,1 milimolar y aproximadamente 5 milimolar, ácido butírico de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 2 milimolar y cafeína de aproximadamente 0,1 milimolar a aproximadamente 4 milimolar.
- 18.** El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en RANK: Fc, receptor de la interleucina-1 de tipo II, TNFR: Fc, ligando CD40, TRAIL, ligando flt3, receptor de IL-4, G-CSF , eritropoyetina, un anticuerpo, y polipéptidos sustancialmente similares.

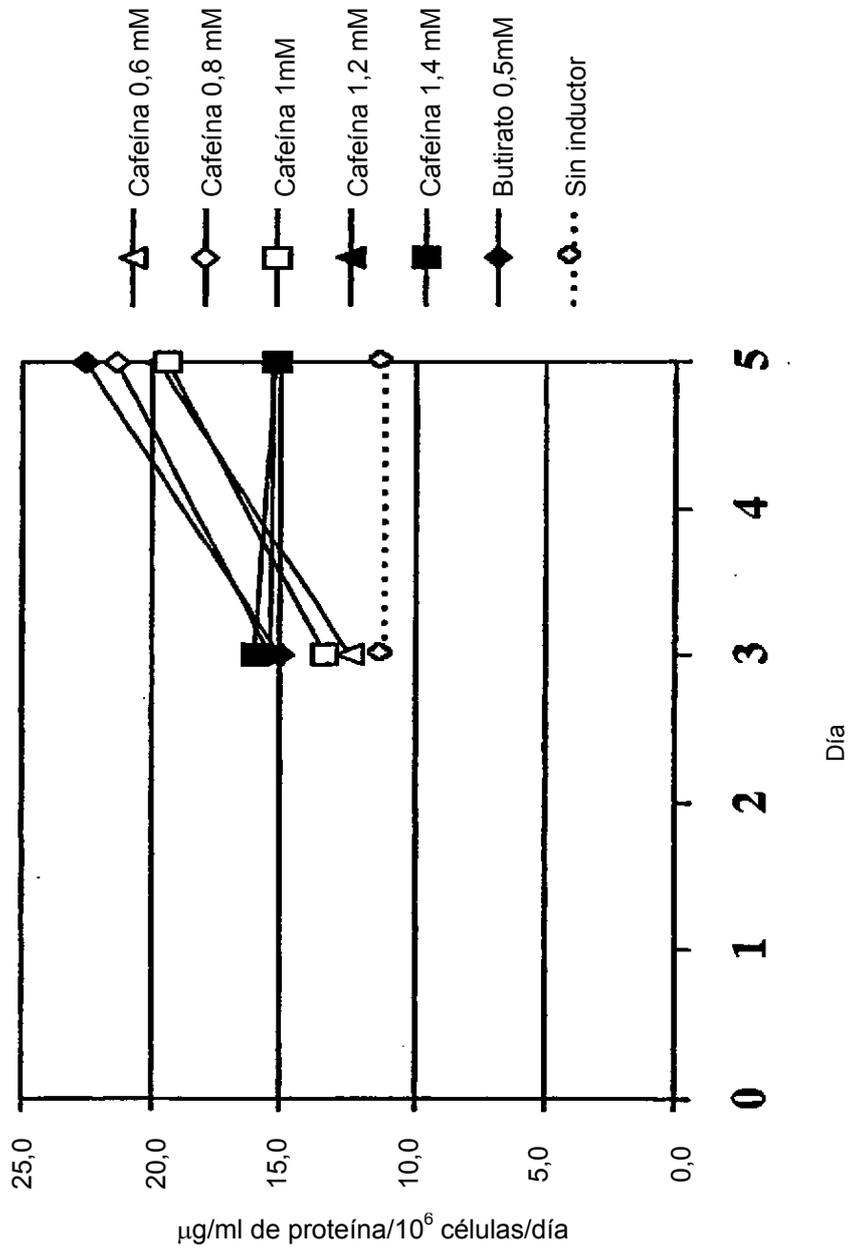
15

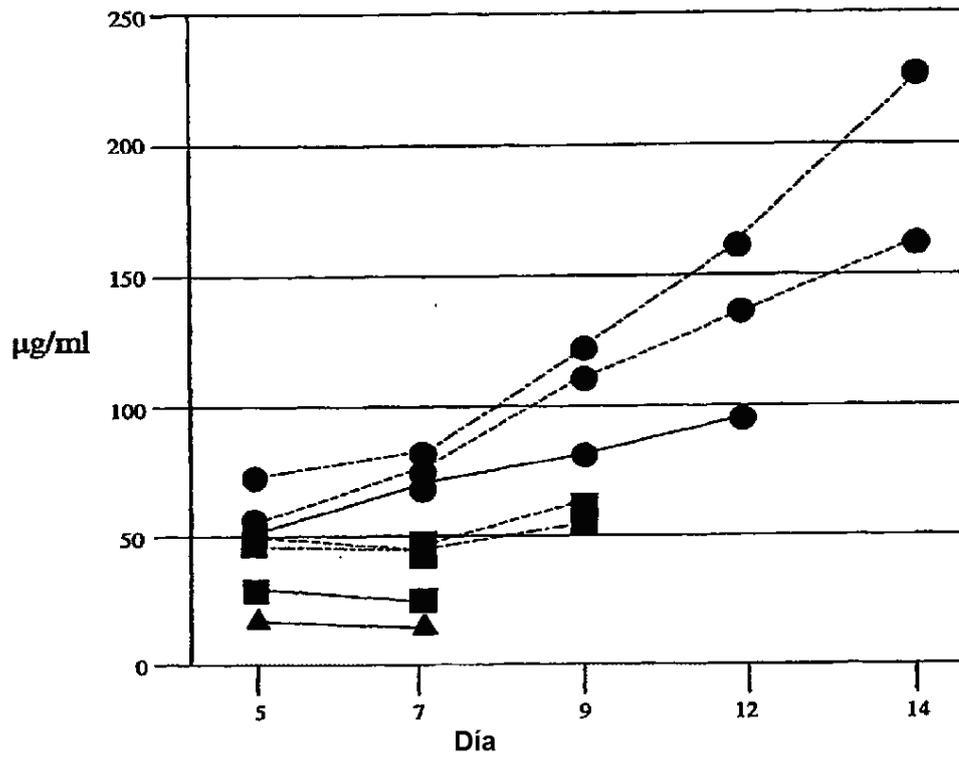


Título de las células de la línea celular inducida nº. 9



Productividad de las células de la línea celular inducida nº. 9





- ▲— 37°C
- 34°C
- - ■ - - 34°C butirato de sodio (0,5 mM)
- - ■ - - 34°C HMBA (2,0 mM)
- 31°C
- - ● - - 31°C butirato de sodio (0,5 mM)
- - ● - - 31°C HMBA (2,0 mM)