

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 599 103**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2005 PCT/US2005/030364**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2006 WO06026408**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2005 E 05791655 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 1781803**

(54) Título: **Producción de anticuerpos anti-beta-amiloide**

(30) Prioridad:

27.08.2004 US 604936 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2017

(73) Titular/es:

**PFIZER IRELAND PHARMACEUTICALS (100.0%)
Operations Support Group, Ringaskiddy
Cork, IE**

(72) Inventor/es:

**DRAPEAU, DENIS;
LUAN, YEN-TUNG;
MERCER, JAMES, R.;
WANG, WENGE y
LASKO, DANIEL R.**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 599 103 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

Producción de anticuerpos anti-beta-amiloide

Antecedentes de la invención

Las proteínas y polipéptidos se han vuelto cada vez más importantes como agentes terapéuticos. En la mayoría de los casos, las proteínas y polipéptidos terapéuticos se producen en cultivos celulares, a partir de células que se han modificado y/o seleccionado para producir niveles extraordinariamente altos de la proteína o polipéptido particular de interés. El control y optimización de las condiciones del cultivo celular es críticamente importante para la producción comercial satisfactoria de proteínas y polipéptidos.

Muchas proteínas y polipéptidos que se producen en cultivos celulares se fabrican en un proceso discontinuo o semi-continuo, en el que las células se cultivan durante un periodo de tiempo, y luego se termina el cultivo y se aísla la proteína o polipéptido que se ha producido. La cantidad y calidad final de la proteína o polipéptido que se produce pueden estar afectadas drásticamente por las condiciones del cultivo celular. Por ejemplo, los procesos de cultivo discontinuo o semi-continuo a menudo dan como resultado la producción de productos metabólicos de desecho que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, viabilidad, y producción o estabilidad de la proteína o el polipéptido de interés. Aunque se han hecho esfuerzos para mejorar la producción de proteínas y polipéptidos en procesos de cultivo discontinuo o semi-continuo, sigue existiendo la necesidad de mejoras adicionales.

Adicionalmente, se ha dedicado un significativo esfuerzo al desarrollo de medios definidos (es decir, medios compuestos por componentes individuales conocidos y que carecen de suero u otros subproductos animales) para su uso en el cultivo de células, particularmente células de mamífero. Las características del crecimiento celular pueden ser muy diferentes en medios definidos en comparación con los derivados de medios con suero. Existe la necesidad particular de desarrollar sistemas mejorados para producir proteínas y polipéptidos mediante cultivo celular en medios definidos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un sistema mejorado para la producción de proteínas y/o polipéptidos a gran escala en un cultivo celular. Por ejemplo, la presente invención proporciona procedimientos de cultivo a escala comercial (por ejemplo, 500 l o más) que utilizan un medio que se caracteriza por uno o más de: i) una cantidad de aminoácidos acumulada por unidad de volumen mayor de aproximadamente 70 mM; ii) una relación molar de glutamina acumulada respecto a asparagina acumulada menor de aproximadamente 2; iii) una relación molar de glutamina acumulada con respecto a los aminoácidos totales acumulados menor de aproximadamente 0,2; iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulados respecto a los aminoácidos totales acumulados entre aproximadamente 0,4 a 1; o v) una concentración por unidad de volumen de la cantidad acumulada de glutamina y asparagina mayor de aproximadamente 16 mM. Un experto en la técnica entenderá que "acumulada", como se ha utilizado anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente o componentes particulares añadidos durante el curso del cultivo celular, que incluye los componentes añadidos al principio del cultivo y los componentes añadidos posteriormente. En ciertas realizaciones preferidas de la invención, es necesario minimizar las "alimentaciones" del cultivo a lo largo del tiempo, ya que es deseable maximizar las cantidades presentes inicialmente. Por supuesto, los componentes del medio se metabolizan durante el cultivo de forma que los cultivos con las mismas cantidades acumuladas de determinados componentes tendrán niveles absolutos diferentes si estos componentes se añaden en diferentes momentos (por ejemplo, si están todos presentes inicialmente frente a si algunos se añaden por alimentaciones).

De acuerdo con la presente invención, el uso de dicho medio permite altos niveles de producción proteica y disminuye la acumulación de ciertos factores indeseables tales como amonio y/o lactato.

Un experto en la técnica entenderá que las formulaciones de medios de la presente invención engloban medios definidos y no definidos. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, el medio de cultivo es un medio definido en el que la composición del medio se conoce y está controlada.

En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, los procedimientos de cultivo incluyen el cambio de medio de cultivo con un primer grupo de condiciones de cultivo a un segundo grupo de condiciones de cultivo de forma que se consiga un cambio metabólico de las células. En algunas realizaciones, este cambio se lleva a cabo cuando el cultivo alcanza aproximadamente un 20-80 % de su densidad celular máxima. En algunas realizaciones, el cambio implica un cambio de la temperatura (o intervalo de temperaturas) a la que se mantiene el cultivo. Alternativa o adicionalmente, la presente invención proporciona procedimientos ajustados de manera que, tras alcanzar un pico, los niveles de lactato y/o amonio en el cultivo descienden con el tiempo. En otras realizaciones, el cambio implica el cambio del pH, la osmolaridad o el nivel de inductores químicos, tales como los ácidos alcanoicos o sus sales.

Los cultivos celulares de la presente invención pueden suplementarse opcionalmente con nutrientes y/u otros componentes del medio que incluyen hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o

glucosa u otra fuente de energía. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos tales como hexametileno bis (acetamida) ("HMBA") y butirato sódico ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al principio del cultivo o se pueden añadir en un punto posterior con el fin de reponer nutrientes agotados o por otra razón. En general, es deseable seleccionar la composición inicial del medio para minimizar la suplementación de acuerdo con la presente invención.

5 Se pueden controlar distintas condiciones de cultivo de acuerdo con la presente invención, incluyendo el pH, densidad celular, viabilidad celular, niveles de lactato, niveles de amonio, osmolaridad, o título del polipéptido o proteína que se expresa.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra una comparación del Medio 1 y el Medio 2 en matraces con agitado utilizando células anti-GDF-8.
La Figura 2 muestra el crecimiento celular y viabilidad de las células anti-GDF-8 en el Medio 1.
La Figura 3 muestra el crecimiento celular de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.
- 15 La Figura 4 muestra la viabilidad celular de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.
La Figura 5 muestra los niveles de amonio de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.
La Figura 6 muestra los niveles de lactato de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.
La Figura 7 muestra el título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación de glutamina.
La Figura 8 muestra la densidad celular de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y alimentación con privación de glutamina.
La Figura 9 muestra la viabilidad celular de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y alimentación con privación de glutamina.
La Figura 10 muestra los niveles de amonio de cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y con privación de glutamina.
La Figura 11 muestra los niveles de lactato de los cultivos celulares de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y con privación de glutamina.
La Figura 12 muestra el título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y con privación de glutamina.
La Figura 13 muestra la respuesta a la dosis de hierro de las células anti-GDF-8 en el Medio 1 y el Medio 2.
La Figura 14 muestra la densidad celular de cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina.
La Figura 15 muestra la viabilidad celular de cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina.
La Figura 16 muestra el título de anti-Lewis Y en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina,
La Figura 17 muestra los niveles de lactato en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina.
La Figura 18 muestra los niveles de amonio en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina.
La Figura 19 muestra la osmolaridad de cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina.
La Figura 20 muestra la densidad celular de células anti-Lewis Y. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones.
- 40 La Figura 21 muestra la viabilidad celular de las células anti-Lewis Y. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones.
La Figura 22 muestra el título medio del cultivo de anti-Lewis Y. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones.
La Figura 23 muestra los niveles de amonio de las células anti-Lewis Y. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones.
La Figura 24 muestra un salto impulsor que se utiliza en los cultivos semi-continuos.
La Figura 25 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 26 muestra la viabilidad de células anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 27 muestra el título de anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
- 50 La Figura 28 muestra los niveles de lactato de los cultivos de anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 29 muestra los niveles de amonio de los cultivos de anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 30 muestra el crecimiento celular de las células anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 31 muestra el título de anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 32 muestra los niveles de lactato de los cultivos de anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 33 muestra los niveles de amonio de los cultivos de anti-GDF-8 con distintas condiciones experimentales.
La Figura 34 muestra el crecimiento celular de anti-GDF-8 en el Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.
La Figura 35 muestra la viabilidad celular de las células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.

- La Figura 36 muestra los niveles de lactato de los cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.
- 5 La Figura 37 muestra los niveles de amonio de los cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.
- La Figura 38 muestra los niveles de glutamina de los cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.
- 10 La Figura 39 muestra el título de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.
- La Figura 40 muestra la osmolaridad de los cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina.
- 15 La Figura 41 muestra el crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- La Figura 42 muestra los niveles de lactato de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- 20 La Figura 43 muestra los niveles de amonio de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- La Figura 44 muestra los niveles de glutamina en los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- 25 La Figura 45 muestra los niveles de glutamato de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- La Figura 46 muestra el título de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- 30 La Figura 47 muestra la osmolaridad de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína.
- La Figura 48 muestra el crecimiento celular de las células anti-GDF-8 en medios que contienen varios niveles de aminoácidos y vitaminas.
- 35 La Figura 49 muestra los niveles de lactato de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas.
- La Figura 50 muestra los niveles de amonio de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas.
- 40 La Figura 51 muestra los niveles de glutamina de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas.
- La Figura 52 muestra el título de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas.
- 45 La Figura 53 muestra el crecimiento celular de las células anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E, y hierro.
- La Figura 54 muestra los niveles de lactato de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro.
- La Figura 55 muestra los niveles de amonio de los cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro.
- 50 La Figura 56 muestra el título de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro.
- La Figura 57 muestran el crecimiento celular de las células anti-GDF-8 en los Medios 1, 3 y 9.
- La Figura 58 muestra el título de anti-GDF-8 en los Medios 1, 3 y 9.
- 55 La Figura 59 muestra los títulos de anti-GDF-8 extrapolados con distintos niveles de glutamina sola y el total de glutamina y asparagina combinadas.
- La Figura 60 muestra el crecimiento celular de las células anti-ABeta con distintas condiciones de medios ensayadas.
- La Figura 61 muestra la viabilidad celular de las células anti-ABeta con distintas condiciones de medios ensayadas.
- 50 La Figura 62 muestra los niveles de lactato en los cultivos de anti-ABeta con distintas condiciones de medios ensayadas.
- La Figura 63 muestra los niveles de amonio en los cultivos de anti-ABeta con distintas condiciones de medios ensayadas.
- 55 La Figura 64 muestra el título de anti-ABeta con distintas condiciones de medios ensayadas.
- La Figura 65 muestra la osmolaridad de los cultivos de anti-ABeta con distintas condiciones de medios ensayadas.
- 60 La Figura 66 muestra el crecimiento celular de células que expresan TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.
- La Figura 67 muestra la viabilidad de las células que expresan TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.
- La Figura 68 muestra la glucosa residual en cultivos de células que expresan TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.
- 65 La Figura 69 muestra los niveles de glutamina en cultivos de células que expresan TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.
- La Figura 70 muestra la concentración de lactato en cultivos de células que expresan TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.

La Figura 71 muestra los niveles de amonio en cultivos de células que expresan TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.

La Figura 72 muestra el título relativo de TNFR-Ig con distintas condiciones experimentales.

La Figura 73 muestra las densidades celulares de las células anti-GDF-8 cultivadas en biorreactores 6000 l y 1 l.

5 La Figura 74 muestra los títulos de células anti-GDF-8 cultivadas en biorreactores 6000 l y 1 l.

La Figura 75 muestra los niveles de lactato de células anti-GDF-8 cultivadas en biorreactores 6000 L y 1 L.

La Figura 76 muestra los niveles de amonio de las células anti-GDF-8 cultivadas en biorreactores 6000 L y 1 L.

Definiciones

10 “Más o menos”, “Aproximadamente”: Como se utiliza en el presente documento, los términos “más o menos” y “aproximadamente”, cuando se aplica a una o más condiciones particulares de cultivo celular, se refiere a un intervalo de valores que son similares al valor de referencia establecido para esa condición o condiciones de cultivo.

En ciertas realizaciones, el término “aproximadamente” se refiere a un intervalo de valores que se encuentra en un 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 porciento o menos del valor de referencia establecido para esa condición o condiciones de cultivo.

15 “Aminoácido”: El término “aminoácido” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos de origen natural que se utilizan normalmente en la formación de polipéptidos, o a los análogos y derivados de esos aminoácidos. Los aminoácidos de la presente invención se proporcionan en un medio para cultivos celulares. Los aminoácidos proporcionados en el medio se pueden proporcionar como sales o en forma de hidrato.

20 “Anticuerpo”: El término “anticuerpo” como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, tal como un fragmento Fab o F(ab')₂, que contiene uno o más sitios de unión al antígeno que se unen (inmunorreaccionan con) un antígeno. Las expresiones “anticuerpos monoclonales” y “composición de anticuerpos monoclonales”, como se utilizan en el

25 presente documento, se refieren a una población clónica de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular de un antígeno, mientras que las expresiones “anticuerpos policlónicos” y “composición de anticuerpos policlónicos” se refieren a una población de moléculas de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión al antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. La definición de anticuerpos monoclonales incluye moléculas tanto clónicas derivadas por tecnologías tradicionales así como moléculas de secuencia definida derivadas por modificación o mutación de restos específicos, por ejemplo, los anticuerpos humanizados.

30 “Cultivo discontinuo”: La expresión “cultivo discontinuo” como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que todos los componentes que se utilizarán finalmente en el cultivo de las células, que incluyen el medio (véase la definición de “medio” posteriormente) así como las propias células, se proporcionan al principio del proceso de cultivo. Un cultivo discontinuo se detiene típicamente en un punto y las células y/o componentes del medio se recolectan y opcionalmente se purifican.

35 “Biorreactor”: El término “biorreactor” como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier vaso que se utiliza para el crecimiento de una célula de mamífero en un cultivo. El biorreactor puede ser de cualquier tamaño siempre que sea útil para el cultivo de células de mamífero. Típicamente, el biorreactor será al menos de 1 litro y puede ser de 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o de cualquier volumen entre estos. Las condiciones internas del biorreactor, incluyen, pero no se limitan al pH y la temperatura, y típicamente se controlan durante el periodo de cultivo. El biorreactor puede estar compuesto por cualquier material que sea adecuado para mantener cultivos de células de mamífero suspendidas en los medios en condiciones de cultivo de la presente invención, que incluye cristal, plástico o metal. La expresión “biorreactor de producción” como se utiliza en el presente documento se refiere al biorreactor final que se utiliza en la producción del polipéptido o proteína de interés. El volumen del biorreactor de producción del cultivo celular a gran escala es típicamente al menos de 500 litros y puede ser de 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre estos. Un experto en la técnica es consciente y será capaz de escoger biorreactores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención.

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

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

50 “Cultivo”, “Cultivo celular” y “Cultivo de células de mamífero”: Estas expresiones como se utilizan en el presente documento se refieren a una población de células de mamífero que se suspende en un medio (véase la definición de “medio” posteriormente) en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular.

Como estará claro para los expertos habituados en la técnica, estas expresiones como se utilizan en el presente documento se pueden referir a la combinación que comprende la población de células de mamífero y el medio en el que la población está suspendida.

5 "Cultivo semi-continuo": La expresión "cultivo semi-continuo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que se proporcionan al cultivo componentes adicionales en un momento posterior al principio del proceso de cultivo. Un cultivo semi-continuo típicamente se detiene en algún momento y las células y/o componentes del medio se recolectan y opcionalmente se purifican.

10 "Fragmento": El término "fragmento" como se utiliza en el presente documento se refiere a los polipéptidos y se define como cualquier parte separada de un polipéptido determinado que es única o característica de ese polipéptido. El término como se utiliza en el presente documento también se refiere a cualquier porción separada de un determinado polipéptido que mantiene al menos una parte de la actividad del polipéptido de longitud completa. Preferentemente, la parte de actividad que se mantiene es al menos de un 10 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferentemente la parte de actividad que se mantiene es al menos del 20 %, 30 %, 40 %, 15 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferentemente aún, la parte de actividad que se mantiene es al menos del 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferentemente, la parte de actividad que se mantiene es del 100 % de la actividad del polipéptido de longitud completa. El término como se utiliza en el presente documento también se refiere a cualquier parte de un polipéptido determinado que incluye al menos un elemento de secuencia establecido que se encuentra en el polipéptido de longitud completa. Preferentemente, la secuencia de elementos abarca al menos 4-5, más preferentemente al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

20 "Gen": El término "gen" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos, ADN o ARN, al menos alguna parte de los cuales codifica un producto final distinto, típicamente, pero no limitado a, un polipéptido que funciona en algún aspecto del metabolismo o desarrollo celular. El término no quiere decir que se refiera solamente a la secuencia codificante que codifica el polipéptido u otro producto final distinto, sino que también engloba regiones precedentes y siguientes de la secuencia codificante que modulan el nivel basal de expresión (véase la definición de "elemento genético de control" posteriormente), así como las secuencias que intervienen ("intrones") entre los segmentos codificantes individuales ("exones").

30 "Elemento genético de control": La expresión "elemento genético de control" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier elemento de secuencia que modula la expresión de un gen al que está unido operativamente. Los elementos genéticos de control pueden funcionar aumentando o disminuyendo los niveles de expresión y se pueden localizar, antes, en, o después de la secuencia codificante. Los elementos genéticos de control pueden actuar en cualquier estadio de la expresión genética regulando, por ejemplo, el inicio, elongación o terminación de la transcripción, el corte y empalme del ARNm, la edición del ARNm, la estabilidad del ARNm, la 35 localización del ARNm en la célula, el inicio, elongación o terminación de la traducción, o cualquier otro estadio de la expresión genética. Los elementos genéticos de control pueden funcionar individualmente o en combinación con otros.

40 "Hibridoma": El término "hibridoma" como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula creada por la fusión de una célula inmortalizada derivada de un origen inmunológico y una célula productora de anticuerpos. El hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales que se utilizan para crear el hibridoma pueden ser de cualquier origen mamífero, incluyendo pero sin limitarse a rata, cerdo, conejo, oveja, cerdo, cabra y ser humano. El término engloba también líneas celulares de trioma, que resultan cuando se fusiona la progenie de un mieloma heterohíbrido, que son el producto de una fusión entre células de ser humano y una línea celular de mieloma murino, y posteriormente se fusionan con una célula plasmática. Además, el término, 45 significa que incluye cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produzca anticuerpos tal como, por ejemplo, cuadromas (véase, por ejemplo, Milstein y col., Nature, 537:3053 (1983)).

50 "Densidad integrada de células viables": La expresión "densidad integrada celular viable" como se utiliza en el presente documento se refiere a la densidad media de células viables durante el curso del cultivo multiplicada por la cantidad de tiempo que dura el cultivo. Asumiendo que la cantidad de polipéptido y/o proteína que se produce es proporcional al número de células viables presentes durante el curso del cultivo, la densidad integrada de células viables es una herramienta útil para estimar la cantidad de polipéptido y/o proteína que se producen durante el curso del cultivo.

55 "Medio", "Medio de cultivo celular", "Medio de cultivo": Estas expresiones como se utilizan en el presente documento se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren las células de mamífero en crecimiento. Típicamente, estas soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y elementos traza necesarios para el crecimiento mínimo y/o la supervivencia de la célula. La solución puede contener también componentes para aumentar el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen hormonas y factores de crecimiento. La solución se formula preferentemente con un pH y concentración de sales óptimos para la supervivencia y proliferación celular. El medio puede ser también un "medio definido" –un medio libre de suero que no contiene proteínas, hidrolizados o componentes de composición desconocida. Los medios definidos

están libres de componentes derivados de animales y todos los componentes tienen una estructura química conocida.

“Producto metabólico de desecho”: La expresión “producto metabólico de desecho” como se utiliza en el presente documento se refiere a compuestos producidos por el cultivo celular como resultado de los procesos metabólicos normales o no normales que son de alguna manera perjudiciales para el cultivo celular, particularmente en relación con la expresión o actividad de un polipéptido o proteína recombinante que se desean. Por ejemplo, los productos metabólicos de desecho pueden ser perjudiciales para el crecimiento o la viabilidad del cultivo celular, puede disminuir la cantidad de polipéptido o proteína producidos, puede alterar el plegamiento, estabilidad, glicosilación u otra modificación post-traduccional del polipéptido o proteína que se expresa, o puede ser perjudicial para las células y/o la expresión o actividad del polipéptido o proteína recombinantes de cualquier otra manera. Los productos metabólicos de desecho ejemplares incluyen lactato, que se produce como resultado del metabolismo de la glucosa, y amonio, que se produce como resultado del metabolismo de glutamina. Un objetivo de la presente invención es ralentizar la producción de, reducir o incluso eliminar los productos metabólicos de desecho en cultivos de células de mamífero.

“Osmolaridad” y “Osmolalidad”: “Osmolaridad” es una medida de la presión osmótica de las partículas de soluto disueltas en una solución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas activas osmóticamente (es decir, osmoles) disueltos en 1 kg de solución (1 mOsm/kg de H₂O a 38 °C es equivalente a una presión osmótica de 19 mm de Hg). “Osmolaridad”, por el contrario, se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de solución. Cuando se utiliza en el presente documento, la abreviatura “mOsm” significa “miliosmoles/kg de solución”.

“Cultivo de perfusión”: El término “cultivo de perfusión” como se utiliza en el presente documento se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que se proporcionan componentes adicionales continua o semi-continuamente al cultivo posteriormente al inicio del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados comprenden típicamente suplementos nutricionales para las células, que se han agotado durante el proceso de cultivo. Una parte de las células y/o los componentes del medio se recolectan típicamente con una base continua o semi-continua y opcionalmente se purifican.

“Polipéptido”: El término “polipéptido” como se utiliza en el presente documento se refiere a una cadena secuencial de aminoácidos que se unen entre ellos mediante enlaces peptídicos. El término se utiliza para referirse a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, pero un experto habituado en la técnica entenderá que el término no se limita a cadenas largas y puede referirse a una mínima cadena que comprende dos aminoácidos unidos entre ellos mediante un enlace peptídico.

“Proteína”: El término “proteína” como se utiliza en el presente documento se refiere a uno o más polipéptidos que funcionan como una unidad independiente. Si un único polipéptido es la unidad de funcionamiento independiente y no necesita la asociación física permanente con otros polipéptidos para formar la unidad de funcionamiento independiente, los términos “polipéptido” y “proteína” que se utilizan en el presente documento se utilizan de manera intercambiable. Si la unidad funcional independiente está compuesta por más de un polipéptido asociados físicamente entre ellos, el término “proteína” que se utiliza en el presente documento se refiere a los múltiples polipéptidos que se acoplan físicamente y funcionan juntos como la unidad independiente.

“Polipéptido expresado recombinantemente” y “Polipéptido recombinante”: Estas expresiones como se utilizan en el presente documento se refieren a un polipéptido que se expresa a partir de una célula de mamífero huésped que se ha modificado genéticamente para que exprese el polipéptido. El polipéptido expresado recombinantemente puede ser idéntico o similar a polipéptidos que se expresan normalmente en la célula de mamífero huésped. El polipéptido expresado recombinantemente también puede ser ajeno a la célula huésped, es decir, heterólogo con respecto a los péptidos que se expresan normalmente en la célula de mamífero huésped. De manera alternativa, el polipéptido expresado recombinantemente puede ser quimérico en el que unas partes del polipéptido contienen secuencias de aminoácidos que son idénticas o similares a los polipéptidos que se expresan normalmente en la célula de mamífero huésped, mientras que otras partes son ajenas a la célula huésped.

“Sembrar”: El término “sembrar” como se utiliza en el presente documento se refiere al proceso de proporcionar un cultivo celular a un biorreactor u otro vaso. Las células pueden haber sido propagadas previamente en otro biorreactor o vaso. De manera alternativa, las células pueden haberse congelado y descongelarse inmediatamente antes de proporcionarlas al biorreactor o el vaso. El término se refiere a cualquier cantidad de células, incluyendo una única célula.

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

Descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas

La presente invención proporciona sistemas mejorados para la producción de proteínas y/o polipéptidos por cultivo

celular. En particular, la invención proporciona sistemas que minimizan la producción de uno o más productos metabólicos perjudiciales para el crecimiento, viabilidad celular, y/o producción o calidad de proteínas. En una realización preferida de la presente invención, el cultivo celular es un cultivo discontinuo o semi-continuo. Otras ciertas realizaciones preferidas se tratan en detalle posteriormente. Los expertos habituados en la técnica entenderán, sin embargo, que las distintas modificaciones en estas realizaciones preferidas están dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Son las reivindicaciones y equivalentes de las mismas las que definen el ámbito de la presente invención, que no está ni debería estar limitada a o por la presente descripción de ciertas realizaciones preferidas.

Anticuerpos

- 10 Debido al gran número de anticuerpos que se utilizan actualmente o están bajo investigación como agentes farmacéuticos u otros agentes comerciales, la producción de anticuerpos tiene un interés particular de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Cualquier anticuerpo que pueda expresarse en una célula huésped se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, el anticuerpo que se va a expresar es un anticuerpo monoclonal.
- 15 En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que se derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un ratón, rata, u otra especie, con regiones constantes humanas. Se ha descrito una variedad de estrategias para producir anticuerpos químéricos. Véase, por ejemplo, Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851 (1985); Takeda y col., Nature 314, 452 (1985), Cabilly y col., Patente de EE. UU. N° 4.816.567; Boss y col., Patente de EE. UU. N° 4.816.397; Tanaguchi y col., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B.
- 20 En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal es un derivado de anticuerpo humano, por ejemplo, por medio del uso de bibliotecas de ribosomas de presentación o fagos de presentación (véase, por ejemplo, Winter y col., Patente de EE. UU. N° 6.291.159 y Kawasaki, Patente de EE. UU. N° 5.658.754) o el uso de un especie de xenoinjerto en la que los genes del anticuerpo nativo estén inactivados y sustituidos funcionalmente con genes de anticuerpo humano, mientras que se dejan intactos los otros componentes del sistema inmunitario nativo (véase, por ejemplo, Kucherlapati y col., Patente de EE. UU. N° 6.657.103).
- 25 En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico en el que la gran mayoría de los restos de aminoácido se derivan de anticuerpos humanos, minimizando de esta manera cualquier reacción inmunitaria potencial cuando se suministre a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los restos de aminoácido de las regiones determinantes de complementariedad se sustituyen, al menos en parte, con restos de una especie no humana que confiere una especificidad o afinidad deseada por el antígeno. Tales moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden producir por una de las distintas técnicas que se conocen en la técnica, (por ejemplo, Teng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor y col., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson y col., Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)), y preferentemente se hacen de acuerdo con las enseñanzas de la Publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400, las cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Los anticuerpos humanizados se pueden producir comercialmente, por ejemplo, por Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña. Como referencias adicionales, véase Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992), las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.
- 30 En otra realización preferida, los anticuerpos monoclonales, químéricos, o humanizados que se han descrito anteriormente pueden contener restos de aminoácidos que no existen naturalmente en ningún anticuerpo en ninguna especie en la naturaleza. Estos restos ajenos se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir una especificidad, afinidad, o función efectora nueva o modificada al anticuerpo monoclonal, químérico o humanizado. En otra realización preferida, los anticuerpos que se han descrito anteriormente se pueden conjugar con fármacos para farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de la respuesta biológica, y radionúclidos (véase, por ejemplo, Kunz y col., Calicheamicin derivative-carrier conjugates, documento US20040082764 A1).
- 35 En la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente al fragmento A β de la proteína precursora de amiloide u otros componentes de una placa de amiloide, y es útil para combatir la acumulación de placas de amiloide en el cerebro lo que caracteriza la enfermedad de Alzheimer (Véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de EE. UU. 60/636,684).
- 40 En general, los que practiquen la presente invención seleccionarán su polipéptido de interés, y sabrán su secuencia de aminoácidos precisa. Las técnicas de la presente invención se han aplicado satisfactoriamente para la producción de distintos polipéptidos incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano dirigido al factor de crecimiento y diferenciación 8 (Ejemplos, 1, 3, 4, 7-14), el anticuerpo humanizado anti-Lewis Y (Ejemplos 5 y 6), anti-ABeta (Ejemplo 15) y una proteína de fusión dimérica Fc-receptor del factor de necrosis tumoral (Ejemplo 16), indicando

que la presente invención será útil para la expresión de una variedad de polipéptidos y proteínas diferentes. Cualquier proteína determinada que se vaya a expresar de acuerdo con la presente invención tendrá sus propias características idiosincráticas y puede tener influencia sobre la densidad o viabilidad celular de las células cultivadas, y puede expresarse a niveles menores que otro polipéptido o proteína que se cultiva en condiciones de cultivo idénticas. Un experto habituado en la técnica será capaz de modificar apropiadamente las etapas y composiciones de la presente invención con el fin de optimizar el crecimiento celular y/o la producción de cualquier polipéptido o proteína determinados que se expresen.

Elementos genéticos de control

Como estará claro para los expertos habituados en la técnica, se pueden emplear elementos genéticos de control para regular la expresión genética del polipéptido o proteína. Dichos elementos genéticos de control se deberían seleccionar para que sean activos en la célula huésped relevante. Los elementos de control pueden ser activos constitutivamente o pueden ser inducibles en circunstancias definidas. Los elementos de control inducibles son particularmente útiles cuando la proteína que se expresa es tóxica o por otra parte tiene efectos perjudiciales para el crecimiento y/o viabilidad celular. En dichos ejemplos, la regulación de la expresión del polipéptido o proteína por medio de elementos de control inducibles puede mejorar la viabilidad celular, densidad celular y/o el rendimiento total del polipéptido o proteína expresados. Se conoce un gran número de elementos de control útiles en la práctica de la presente invención y están disponibles en la técnica.

Los promotores constitutivos mamíferos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el promotor hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), el promotor adenosina desaminasa, el promotor piruvato cinasa, el promotor beta-actina así como otros promotores constitutivos conocidos por los expertos habituados en la técnica. Adicionalmente, los promotores víricos que han demostrado que dirigen la expresión constitutiva de secuencias codificantes en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores víricos de simios, promotores del virus del herpes simple, promotores del virus del papiloma, promotores adenovíricos, promotores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), promotores del virus del sarcoma de Rous, promotores de citomegalovirus (CMV), las repeticiones del extremo largo (LTR) del virus de la leucemia murina de Moloney y otros retrovirus, el promotor timidina cinasa del virus del herpes simple, así como otros promotores víricos conocidos por los expertos habituados en la técnica.

Los promotores inducibles dirigen la expresión de secuencias codificantes unidas operativamente en presencia de un agente inductor y también se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, en células de mamífero, el promotor metalotioneína induce la transcripción de secuencias codificantes corriente abajo en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles serán reconocidos por y/o conocidos por los expertos en la técnica.

En general, la secuencia de expresión genética también incluirá secuencias 5' no de transcripción y 5' no de traducción implicadas con el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tal como un TATA box, una secuencia de sellado, una secuencia CAAT, y similares. Se pueden utilizar opcionalmente elementos amplificadores para aumentar los niveles de expresión de los polipéptidos o proteínas que se van a expresar. Ejemplos de elementos amplificadores que han demostrado que funcionan en células de mamífero incluyen el amplificador genético temprano SV40, como se describe en Dijkema y col., EMBO J. (1985) 4: 761 y el derivado amplificador/promotor de la repetición del extremo largo (LTR) del virus del sarcoma de Rous (VSR), como se describe en Gorman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79:6777 y el citomegalovirus humano, como se describe en Boshart y col., Cell (1985) 41:521.

Los sistemas para unir los elementos de control a las secuencias codificantes se conocen bien en la técnica (las técnicas generales biológicas moleculares y de ADN recombinante se describen en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, el cual se incorpora en el presente documento por referencia). Los vectores comerciales adecuados para insertar la secuencia codificante preferida para la expresión en distintas células de mamífero en una variedad de condiciones de cultivo e inducción también son bien conocidos en la técnica.

Introducción de secuencias codificantes y elementos de control relacionados en células huésped

Los procedimientos adecuados para la introducción en los ácidos nucleicos de las células huésped de mamífero suficientes para conseguir la expresión de los polipéptidos o proteínas de interés se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Gething y col., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281:40-46 (1979); Levinson y col.; el documento EP 117,060; y el documento EP 117,058, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Para las células de mamífero, los procedimientos preferidos de transformación incluyen el procedimiento de precipitación en fosfato cálcico de Graham y van der Erb, Virology, 52:456-457 (1978) o la Lipofectamina™ (Gibco BRL) Procedimiento de Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1193). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema de células huésped de mamífero se han descrito por Axel en la Patente de EE. UU. N° 4.399.216 expedida el 16 de Ago., 1983. Para varias técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown y col., Methods in

Enzymology (1989), Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990), y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988). Ejemplos representativos no limitantes de vectores adecuados para la expresión de polipéptidos o proteínas en células de mamífero incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, y col. (1985) Mol. Cell Biol. 5:1136-1142; pMCIneo Poli-A, véase Thomas, y col. (1987) Cell 51:503-512; y un vector baculovírico tal como pAC 373 o pAC 610.

En realizaciones preferidas, el polipéptido o proteína se transfecta establemente en la células huésped. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que la presente invención se puede utilizar con células de mamífero transfectadas transitoria o establemente.

Células

- 10 Se puede utilizar cualquier célula o tipo celular susceptible a cultivo celular, y a la expresión de polipéptidos, de acuerdo con la presente invención. Ejemplos no limitantes de células de mamífero que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma del ratón BALB/c (NSO/1, ECACC Nº 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Holanda)); línea CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En una realización particularmente preferida, la presente invención se utiliza en el cultivo de y la expresión de polipéptidos y proteínas en líneas celulares CHO.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- Adicionalmente, se puede utilizar cualquiera de las líneas celulares de hibridoma disponibles comercial y no comercialmente que expresen polipéptidos o proteínas de acuerdo con la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que las líneas celulares de hibridoma pueden tener diferentes necesidades nutritivas y/o pueden necesitar diferentes condiciones de cultivo para el crecimiento y la expresión de polipéptidos y proteínas óptimos, y serán capaces de modificar las condiciones según sea necesario.
- Como se ha señalado anteriormente, en muchos casos las células se seleccionarán o modificarán para que produzcan altos niveles de proteínas y polipéptidos. A menudo, las células se modifican genéticamente para que produzcan altos niveles de proteínas, por ejemplo, por la introducción de un gen que codifica la proteína o el polipéptido de interés y/o por la introducción de elementos de control que regulen la expresión del gen (sea endógeno o introducido) que codifica el polipéptido de interés.
- Ciertos polipéptidos pueden tener efectos perjudiciales para el crecimiento celular, la viabilidad celular o algunas otras características de las células que en último término limiten la producción del polipéptido o proteína de interés de alguna manera. Incluso entre una población de células de un tipo particular modificado para que exprese un polipéptido específico, existe una variabilidad en la población celular de manera que ciertas células individuales crecerán mejor y/o producirán más polipéptido de interés. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, la línea celular la selecciona el facultativo por su crecimiento robusto en las condiciones particulares escogidas para cultivar las células. En realizaciones particularmente preferidas, las células individuales modificadas para que expresen un polipéptido particular se escogen para la producción a gran escala basándose en el crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, el título del polipéptido que se expresa o cualquier combinación de estos o cualquiera de otras condiciones que el facultativo considere importantes.

Fase de cultivo celular

- Los procedimientos típicos para producir un polipéptido de interés incluyen los cultivos discontinuos y los cultivos semi-discontinuos. Los procesos de cultivo discontinuo tradicionalmente comprenden inocular un cultivo de producción a gran escala con un cultivo de siembra con una densidad celular particular, cultivar las células en condiciones que contribuyan al crecimiento y la viabilidad celular, recolectar el cultivo cuando las células alcancen una densidad celular específica, y purificar el polipéptido que se expresa. Los procedimientos de cultivo semi-discontinuo incluyen una etapa o etapas adicionales de suplementación del cultivo discontinuo con nutrientes y otros componentes que se consumen durante el crecimiento de las células. Un problema persistente y sin resolver de los cultivos discontinuos y semi-discontinuos tradicionales es la producción de productos metabólicos de desecho, que tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad, y la producción de los polipéptidos expresados. Dos productos metabólicos de desecho, que tienen particularmente efectos perjudiciales, son el lactato y el amonio, que se producen como resultado del metabolismo de la glucosa y glutamina, respectivamente. Además de la producción enzimática de amonio como resultado del metabolismo de la glutamina, el amonio también se acumula en los cultivos celulares como resultado de la degradación no metabólica a lo largo del tiempo. La presente invención

proporciona un procedimiento mejorado de producción a gran escala de polipéptidos que minimiza los efectos perjudiciales del amonio y el lactato ralentizando e incluso revirtiendo la acumulación de estos productos de desecho en los cultivos celulares. Un experto habituado en la técnica reconocerá que la presente invención se puede emplear en cualquier sistema en el que se cultivan células incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas discontinuos, semi-continuos y de perfusión. En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, las células se cultivan en sistemas discontinuos o semi-continuos.

5 *Medios*

Las formulaciones de medios tradicionales, que incluyen los medios disponibles en el mercado tales como el de Ham F10 (Sigma), Medio Mínimo Esencial ([MEM] Sigma), RPMI 1640 (Sigma) y Medio de Eagle modificado de 10 Dulbecco ([DMEM], Sigma), contienen niveles relativamente altos de glucosa y glutamina en comparación con otros aminoácidos. Se pensaba que estos componentes se necesitaban en abundancia ya que son fuentes primarias de energía metabólica para las células. Sin embargo, el rápido consumo de estos nutrientes da lugar a la acumulación de lactato y amonio como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, los altos niveles iniciales de glucosa y 15 glutamina y la posterior acumulación de lactato y amonio dan lugar a una alta osmolaridad, una condición que en sí misma a menudo es perjudicial para el crecimiento celular, la viabilidad celular y la producción de polipéptidos.

La presente invención proporciona una variedad de formulaciones de medios que cuando se utilizan de acuerdo con otras etapas de cultivo descritas en el presente documento, minimizan e incluso revierten la acumulación de lactato y amonio. Las formulaciones de los medios de la presente invención que han demostrado que tienen efectos 20 beneficiosos sobre el crecimiento y/o viabilidad celular o sobre la expresión del polipéptido o proteína incluyen uno o más de: i) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor de aproximadamente 70 mM, ii) una relación molar de glutamina acumulada respecto a asparagina acumulada de menos de aproximadamente 2, iii) una relación de glutamina acumulada respecto a los aminoácidos totales acumulados de menos de 25 aproximadamente 0,2, iv) una relación de iones inorgánicos acumulados con respecto a los aminoácidos totales acumulados de entre aproximadamente 0,4 a 1, y v) una cantidad acumulativa combinada de glutamina y asparagina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 16 mM. Un experto en la técnica entenderá que "acumulada", como se ha utilizado anteriormente, se refiere a la cantidad total de un componente o componentes particulares que se añaden durante el curso del cultivo celular, que incluyen los componentes añadidos al principio del cultivo y componentes añadidos posteriormente. Un experto en la técnica entenderá que las formulaciones de medios de la presente invención engloban medios tanto definidos como no definidos.

30 Las formulaciones de medios tradicionales comienzan con un nivel relativamente bajo de aminoácidos totales en comparación con las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, el medio de cultivo tradicional conocido como DME-F12 (una mezcla 50:50 de medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio de Ham F12) tiene un contenido total de aminoácidos de 7,29 mM, y el medio de cultivo tradicional conocido como RPMI-1640 tiene un contenido total de aminoácidos de 6,44 mM (véase, por ejemplo, H.J. Morton, *In Vitro*, 6:89-108 (1970), R.G. Ham, 35 Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA), 53:288-293 (1965), G.E. Moore y col., J. Am. Medical Assn., 199:519-24 (1967), que se incorporan en el presente documento por referencia). En ciertas realizaciones de la presente invención, la concentración de aminoácidos en los medios de cultivo es preferentemente mayor de aproximadamente 70 mM. Más preferentemente, las formulaciones de medio de la presente invención contienen concentraciones de aminoácidos mayores de aproximadamente 70 mM en el medio de partida. Se ha demostrado que cuando las concentraciones de 40 aminoácidos en los medios de partida están en este intervalo, la densidad celular y el título aumentan a lo largo del periodo de crecimiento del cultivo (véase el Ejemplo 13).

Adicionalmente, en ciertas realizaciones de la presente invención, la relación molar de glutamina respecto a asparagina en los medios de cultivo está reducida en comparación con otros medios disponibles comercial o no comercialmente. Preferentemente la relación molar de glutamina respecto a asparagina en los medios de cultivo es menor de aproximadamente dos.

45 Adicionalmente, en ciertas realizaciones de la presente invención, la relación molar de glutamina respecto a los aminoácidos totales en los medios de cultivo está reducida en comparación con otros medios disponibles comercial y no comercialmente. Preferentemente la relación molar de glutamina con respecto a los aminoácidos totales en los medios de cultivo es menor de aproximadamente 0,2.

50 Un resultado interesante e inesperado de la disminución de la relación molar de glutamina respecto a asparagina o respecto a la concentración total de aminoácidos en los medios de partida de acuerdo con la presente invención era que además de observarse un descenso de la acumulación de amonio, se veía también un descenso de la acumulación de lactato. En ciertas realizaciones, los niveles acumulados de amonio y lactato no solo eran más bajos que los de los cultivos de control, sino que de hecho ahora descienden tras una acumulación inicial (como ejemplo, véase los Ejemplos 3 y 7).

Boraston (Patente de EE. UU. Número 5.871.999) ha desvelado un medio de cultivo en el que la relación molar de los 55 iones inorgánicos totales respecto a los aminoácidos totales está entre 1 y 10. Boraston demostraba que proporcionando un medio de cultivo en el que la relación molar de iones inorgánicos totales respecto a aminoácidos totales está en este intervalo, disminuye la agregación células CHO cultivadas en el medio. En otra realización de la

presente invención, la relación molar de iones inorgánicos totales con respecto a los aminoácidos totales en el medio de cultivo se reduce incluso más, hasta aproximadamente entre 0,4 a 1. Como se muestra en el Ejemplo 13, la reducción de esta relación de 1,75 a aproximadamente 0,7 resulta en un marcado aumento de la densidad celular y la producción del polipéptido o proteína que se expresa a lo largo del periodo de crecimiento del cultivo.

- 5 En otra realización preferida de la presente invención, el medio de cultivo contiene una concentración combinada de glutamina y asparagina de entre aproximadamente 16 y 36 mM. Como se muestra en el Ejemplo 14, Tabla 22, los medios que contienen una concentración combinada total de glutamina y asparagina en este intervalo presentan títulos mayores del polipéptido que se expresa que los medios que contienen una glutamina y asparagina totales combinadas fuera de este intervalo. Un experto en la técnica será capaz de escoger la concentración combinada exacta de glutamina y asparagina dentro de este intervalo con el fin de optimizar el crecimiento y/o viabilidad celular y para maximizar la producción del polipéptido que se expresa.
- 10

Además, un experto habituado en la técnica reconocerá que cualquiera de las condiciones enumeradas anteriormente se pueden utilizar o solas o en varias combinaciones entre ellas. Utilizando la formulación de medios que presentan una, algunas o todas las características anteriores, un experto habituado en la técnica será capaz de optimizar el crecimiento y/o viabilidad celular y para maximizar la producción del polipéptido que se expresa.

15

Cualquiera de estas formulaciones de medios desveladas en la presente invención se puede suplementar opcionalmente según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, hidrolizados proteicos, o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser beneficioso suplementar los medios con inductores químicos tales como hexametileno-bis (acetamida) ("HMBA") y butirato sódico ("NaB"). Estos suplementos opcionales se pueden añadir al comienzo del cultivo o se pueden añadir en un punto posterior con el fin de reponer los nutrientes agotados, o por otra razón. Un experto habituado en la técnica será consciente de cualquier suplemento deseable o necesario que se pueda incluir en las formulaciones de los medios desvelados.

20

25

Proporcionar un cultivo de células de mamífero

Se conocen bien en la técnica distintos procedimientos para preparar células de mamífero para la producción de proteínas o polipéptidos por cultivo discontinuo y semi-continuo. Como se describe anteriormente, se puede introducir un ácido nucleico suficiente para conseguir la expresión (típicamente un vector que contiene el gen que codifica el polipéptido o proteína de interés y cualquiera de los elementos genéticos de control unidos operativamente) en la línea celular huésped por medio de cualquiera de distintas técnicas bien conocidas. Típicamente, se exploran las células para determinar si las células huésped han captado ya el vector y expresan el polipéptido o proteína de interés. Los procedimientos tradicionales para detectar un polipéptido o proteína de interés particular que se expresa en las células de mamífero incluyen pero no se limitan a inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, SDS-PAGE, transferencia de Western, ensayo de immunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), técnicas de cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC), ensayos de actividad biológica y cromatografía de afinidad. Un experto habituado en la técnica será consciente de otras técnicas apropiadas para detectar los polipéptidos o proteínas que se expresan. Si múltiples células huésped expresan el polipéptido o proteína de interés, se pueden utilizar algunas o todas las técnicas enumeradas para determinar cuál de las células expresa ese polipéptido o proteína con los niveles más altos.

30

35

40

Una vez que se identifica la célula que expresa el polipéptido o proteína de interés, la célula se propaga en un cultivo por cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos por el experto habituado en la técnica. La célula que expresa el polipéptido o proteína de interés se propaga típicamente cultivándola a una temperatura y en un medio que contribuya a la supervivencia, crecimiento y viabilidad de la célula. El volumen del cultivo inicial puede ser de cualquier tamaño, pero a menudo es más pequeño que el volumen del cultivo de producción en el biorreactor que se utiliza en la producción final del polipéptido o proteína de interés, y frecuentemente las células se pasan varias veces por biorreactores de volúmenes crecientes antes de sembrar el biorreactor de producción. El cultivo celular se puede agitar o remover para aumentar la oxigenación del medio y la dispersión de los nutrientes a las células. De manera alternativa o adicionalmente, se pueden utilizar dispositivos de aireación especiales que se conocen bien en la técnica para aumentar y controlar la oxigenación del cultivo. De acuerdo con la presente invención, un experto habituado en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor, que incluyen pero no se limitan al pH, temperatura, oxigenación, etc.

45

50

La densidad celular de partida en el biorreactor de producción será como mínimo una única célula por volumen de cultivo. En realizaciones preferidas de la presente invención, las densidades celulares de partida en el biorreactor de producción pueden variar desde aproximadamente 2×10^2 células viables por ml a aproximadamente 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 o 10×10^6 células viables por ml y mayores.

55

Los cultivos celulares inicial e intermedio se pueden cultivar con cualquier densidad que se desee antes de sembrar el siguiente biorreactor intermedio o de producción final. Se prefiere que la mayoría de las células permanezcan vivas antes de la siembra aunque no se necesita una viabilidad total o casi total. En una realización de la presente

invención, las células se pueden retirar del sobrenadante, por ejemplo, por centrifugación a baja velocidad. También puede ser deseable lavar las células retiradas con un medio antes de la siembra del próximo biorreactor para eliminar cualquier producto metabólico de desecho o componentes del medio. El medio puede ser el medio en el que se cultivaron previamente las células o puede ser un medio diferente o una solución de lavado que selecciona el facultativo de la presente invención.

5 Las células se pueden entonces diluir hasta una densidad apropiada para la siembra del biorreactor de producción. En una realización preferida de la presente invención, las células se diluyen en el mismo medio que se utilizará en el biorreactor de producción. De manera alternativa, las células se pueden diluir en otro medio o solución, dependiendo de las necesidades y deseos del facultativo de la presente invención para ajustarse a las necesidades de las propias células, por ejemplo, si se van a almacenar durante un corto periodo de tiempo antes de la siembra del biorreactor de producción.

Fase de crecimiento inicial

10 Una vez que el biorreactor de producción se ha sembrado como se ha descrito anteriormente, el cultivo celular se mantienen en la fase de crecimiento inicial en condiciones que contribuyan a la supervivencia, crecimiento y viabilidad del cultivo celular. Las condiciones precisas variarán dependiendo del tipo celular, el organismo a partir del cual se deriva la célula, y la naturaleza y carácter del polipéptido o proteína que se expresa.

15 De acuerdo con la presente invención, el biorreactor de producción puede ser de cualquier volumen que sea apropiado para la producción a gran escala de polipéptidos o proteínas. En una realización preferida, el volumen del biorreactor de producción es al menos de 500 litros. En otras realizaciones preferidas, el volumen del biorreactor de producción es de 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más, o cualquier volumen entre estos. Un experto habituado en la técnica será consciente de y será capaz de escoger un biorreactor adecuado para su uso en la práctica de la presente invención. El biorreactor de producción se puede construir de cualquier material que contribuya al crecimiento y viabilidad celular que no interfiera con la expresión o estabilidad del polipéptido o proteína que se produzca.

20 25 La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento inicial se seleccionará basándose primariamente en el intervalo de temperaturas al que el cultivo celular se mantiene viable. Por ejemplo, durante la fase de crecimiento inicial, las células CHO crecen bien a 37 °C. En general, la mayoría de las células de mamífero crecen bien en un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C. Preferentemente, las células de mamífero crecen bien en el intervalo de 35 °C a 40 °C. Los expertos habituados en la técnica serán capaces de seleccionar la temperatura o temperaturas adecuadas a las que crecen las células, dependiendo de las necesidades de las células y las necesidades de producción del facultativo.

30 35 En una realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento inicial se mantiene a una única temperatura constante. En otra realización, la temperatura de la fase inicial de crecimiento se mantiene en un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura puede aumentarse o disminuirse constantemente durante la fase inicial de crecimiento. De manera alternativa, la temperatura se puede aumentar o disminuir cantidades distintas en varios momentos durante la fase inicial de crecimiento. Un experto habituado en la técnica será capaz de determinar si se deberían utilizar una única o múltiples temperaturas, y si la temperatura se debería ajustar constantemente o en cantidades distintas.

40 45 Las células se pueden cultivar durante la fase inicial de crecimiento durante una cantidad de tiempo mayor o menor, dependiendo de las necesidades del facultativo y las necesidades propias de las células. En una realización, las células se cultivan durante un periodo de tiempo suficiente para conseguir una densidad celular viable que sea un porcentaje determinado de la densidad celular viable máxima que alcanzarían las células eventualmente si se les permitiera crecer sin molestias. Por ejemplo, las células se pueden cultivar durante un periodo de tiempo suficiente para que alcance la densidad celular viable que se desea de un 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad celular viable máxima.

50 55 En otra realización se permite que las células crezcan durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, dependiendo de la concentración de partida del cultivo celular, la temperatura a la que se cultivan las células, y la tasa de crecimiento intrínseca de las células, las células se pueden cultivar durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, se permite que las células crezcan durante un mes o más. Las células se cultivarían durante 0 días en el biorreactor de producción si su crecimiento en el biorreactor de siembra, a la temperatura de la fase inicial de crecimiento, fuera suficiente para que la densidad de células viables en el biorreactor de producción en el momento de su inoculación ya estuviera al porcentaje deseado de la densidad celular viable máxima. El facultativo de la presente invención será capaz de escoger la duración de la fase inicial de crecimiento dependiendo las necesidades de producción del polipéptido o proteína y las necesidades propias de las células.

El cultivo celular se puede agitar o remover durante la fase inicial de cultivo con el fin de aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto habituado en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase

inicial de crecimiento, incluyendo, pero sin limitación, el pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, se puede controlar el pH suplementando con una cantidad apropiada de un ácido o una base y la oxigenación se puede controlar con dispositivos de aireación que se conocen bien en la técnica.

Cambio de las condiciones de cultivo

5 De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, al final de la fase inicial de crecimiento, se puede cambiar al menos una de las condiciones del cultivo de forma que se aplica un segundo grupo de condiciones de cultivo y se produce un cambio metabólico en el cultivo. La acumulación de metabolitos inhibidores, sobre todo principalmente amonio y lactato, inhibe el crecimiento. Un cambio metabólico se consigue, por ejemplo, por un cambio en la temperatura, pH, osmolalidad o nivel de inductores químicos del cultivo celular, se puede caracterizar por una
 10 reducción en la relación de la tasa específica de producción de lactato con respecto a la tasa específica de consumo de glucosa. En una realización no limitante, las condiciones del cultivo se cambian cambiando la temperatura del cultivo. Sin embargo, como se conoce en la técnica, el cambio de temperatura no es el único mecanismo por el cual se puede conseguir un cambio metabólico apropiado. Por ejemplo, dicho cambio metabólico también se puede conseguir cambiando otras condiciones del cultivo que incluyen, pero no se limitan a, pH, osmolalidad, y niveles de
 15 butirato sódico. Como se ha tratado anteriormente, el momento del cambio de cultivo lo determinará el facultativo de la presente invención, basándose en las necesidades de producción del polipéptido o proteína o las necesidades propias de las células.

20 Cuando se cambia la temperatura del cultivo, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede tomar varias horas o días para completar el cambio de temperatura. De manera alternativa, el cambio de temperatura puede ser relativamente brusco. Por ejemplo, el cambio de temperatura puede completarse en menos de varias horas. Con el equipo de producción y control apropiado, tal como es convencional en la producción comercial de polipéptidos o proteínas a gran escala, se puede completar el cambio de temperatura incluso en menos de una hora.

25 La temperatura del cultivo celular en la fase de crecimiento posterior se seleccionará basándose primariamente en el intervalo de temperaturas al que el cultivo celular se mantiene viable y expresa los polipéptidos o proteínas recombinantes a niveles adecuados comercialmente. En general, la mayoría de las células de mamífero se mantienen viables y expresan polipéptidos o proteínas recombinantes a niveles adecuados comercialmente en un intervalo de aproximadamente 25 °C a 42 °C. Preferentemente, las células de mamífero se mantienen viables y expresan polipéptidos o proteínas recombinantes a niveles adecuados comercialmente en un intervalo de 25 °C a 35 °C. Los expertos habituados en la técnica serán capaces de seleccionar una temperatura o temperaturas adecuadas en las que crecen las células, dependiendo de las necesidades de las células y las necesidades de producción del facultativo.

30 En una realización de la presente invención, la temperatura de la fase de crecimiento posterior se mantiene como una única temperatura constante. En otra realización, la temperatura de la fase de crecimiento posterior se mantiene en un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, la temperatura se puede aumentar o disminuir gradualmente durante la fase de crecimiento posterior. De manera alternativa, la temperatura se puede aumentar o disminuir en cantidades distintas en varios momentos durante la fase de crecimiento posterior. Un experto habituado en la técnica entenderá que los cambios individuales múltiples se engloban en esta realización. Por ejemplo, la temperatura se puede cambiar una vez, las células se mantienen a esta temperatura o intervalo de temperaturas durante un cierto periodo de tiempo, tras el cual la temperatura se puede cambiar de nuevo –a una temperatura mayor o menor. La temperatura del cultivo después de cada cambio individual puede ser constante o puede mantenerse en un cierto intervalo de temperaturas.

35 En el Ejemplo 16, se muestran datos que demuestran la eficacia del empleo de dos cambios de temperatura sucesivos, aunque se entenderá por los expertos habituados en la técnica que de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar tres o más cambios de temperatura sucesivos para aumentar la viabilidad o densidad celular y/o aumentar la expresión de polipéptidos o proteínas recombinantes. La temperatura o intervalo de temperaturas del cultivo celular después de cada cambio de temperatura sucesivo puede ser mayor o menor que la temperatura o intervalo de temperaturas que precedía al cambio. En una realización de la presente invención, cada temperatura o intervalo de temperaturas sucesivos es más baja que la temperatura o intervalo de temperaturas precedente.

Fase de producción posterior

40 De acuerdo con la presente invención, una vez que se han cambiado las condiciones del cultivo celular como se ha tratado anteriormente, el cultivo celular se mantiene en la fase de producción posterior en un segundo grupo de condiciones de cultivo que contribuyen a la supervivencia y viabilidad del cultivo celular y apropiado para la expresión del polipéptido o proteína deseados a niveles adecuados comercialmente.

45 Como se ha tratado anteriormente, el cultivo se puede cambiar cambiando una o más de varias condiciones de cultivo, que incluyen, pero no se limitan a, temperatura, pH, osmolalidad, y niveles de butirato sódico. En una realización, la temperatura del cultivo se cambia. De acuerdo con esta realización, durante la fase de producción

posterior, el cultivo se mantiene a una temperatura o intervalo de temperaturas que es menor que la temperatura o intervalo de temperaturas de la fase inicial de crecimiento. Por ejemplo, durante la fase de producción posterior, las células CHO expresan bien los polipéptidos y proteínas recombinantes en un intervalo de 25 °C a 35 °C. Como se ha tratado anteriormente, se pueden emplear múltiples cambios individuales de temperatura para aumentar la densidad o viabilidad celular o para aumentar la expresión del polipéptido o proteína recombinantes.

De acuerdo con la presente invención, las células se pueden mantener en la fase de producción posterior hasta que se alcance una densidad celular o un título de producción que se deseé. En una realización, las células se mantienen en la fase de producción posterior hasta que el título del polipéptido o proteína recombinantes alcanzan un máximo. En otras realizaciones, el cultivo se puede recolectar antes de este punto, dependiendo de las necesidades de producción del facultativo o las necesidades propias de las células. Por ejemplo, las células pueden mantenerse durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar una densidad celular viable de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad celular viable máxima. En algunos casos, puede ser deseable permitir que la densidad celular viable alcance un máximo, y luego se permite que la densidad celular viable decline hasta cierto nivel antes de recolectar el cultivo. En un ejemplo extremo, puede ser deseable permitir que la densidad celular viable se aproxime o alcance el cero antes de recolectar el cultivo.

En otra realización de la presente invención, se permite que las células crezcan durante un periodo definido de tiempo durante la fase de producción posterior. Por ejemplo, dependiendo de la concentración del cultivo celular al inicio de la fase de crecimiento posterior, la temperatura a la que se cultivan las células, y la tasa de crecimiento intrínseco de las células, se pueden cultivar las células durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más días. En algunos casos, se permite que las células crezcan durante un mes o más. El facultativo de la presente invención será capaz de escoger la duración de la fase de producción posterior dependiendo de las necesidades de producción del polipéptido o la proteína y las necesidades propias de las células.

En ciertos casos, puede ser necesario suplementar el cultivo celular durante la fase de producción posterior con nutrientes u otros componentes del medio que se hayan agotado o metabolizado por las células. Por ejemplo, puede ser ventajoso suplementar el cultivo celular con nutrientes u otros componentes del medio que se haya observado que se han agotado durante el control del cultivo celular (véase, la sección posterior 'Control de las condiciones de cultivo'). De manera alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular antes de la fase de producción posterior. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso o necesario suplementar el cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, elementos traza (compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otra fuente de energía.

Estos componentes suplementarios se pueden añadir al cultivo celular todos al mismo tiempo, o se pueden proporcionar al cultivo celular en una serie de adiciones. En una realización de la presente invención, los componentes suplementarios se proporcionan al cultivo celular en múltiples veces en cantidades proporcionales. En otra realización, puede ser deseable proporcionar solo ciertos de los componentes suplementarios inicialmente, y proporcionar los componentes restantes en un momento posterior. En otra realización más de la presente invención, el cultivo celular se alimenta continuamente con estos componentes suplementarios.

De acuerdo con la presente invención, el volumen total que se añade al cultivo celular debería mantenerse óptimamente en la cantidad mínima. Por ejemplo, el volumen total del medio o solución que contiene los componentes suplementarios que se añaden al cultivo celular puede ser del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % del volumen del cultivo celular antes de proporcionar los componentes suplementarios.

El cultivo celular se puede agitar o remover durante la fase de producción posterior con el fin de aumentar la oxigenación y la dispersión de nutrientes a las células. De acuerdo con la presente invención, un experto habituado en la técnica entenderá que puede ser beneficioso controlar o regular ciertas condiciones internas del biorreactor durante la fase de crecimiento posterior, que incluyen pero no se limitan a pH, temperatura, oxigenación, etc. Por ejemplo, el pH puede controlarse suplementando una cantidad apropiada de un ácido o una base y la oxigenación se puede controlar con dispositivos de aireación que se conocen bien en la técnica.

Control de las condiciones de cultivo

En ciertas realizaciones de la presente invención, el facultativo puede encontrar beneficioso o necesario controlar periódicamente las condiciones particulares de crecimiento del cultivo celular. Controlar las condiciones del cultivo celular permite al facultativo determinar si el cultivo celular está produciendo polipéptido o proteína recombinante a niveles subóptimos o si el cultivo va a entrar en una fase de producción subóptima. Con el fin de controlar ciertas condiciones del cultivo celular, será necesario retirar pequeñas alícuotas del cultivo para analizarlas. Un experto habituado en la técnica entenderá que tal retirada potencialmente puede introducir contaminación en el cultivo celular, y tendrá que tener el cuidado apropiado para minimizar el riesgo de dicha contaminación.

Como ejemplo no limitante, puede ser beneficioso o necesario controlar la temperatura, pH, densidad celular, viabilidad celular, densidad integrada de células viables, niveles de lactato, niveles de amonio, osmolaridad, o título

5 del polipéptido o proteína que se expresa. Se conocen bien numerosas técnicas en la técnica que permitirán a un experto habituado en la técnica medir estas condiciones. Por ejemplo, se puede medir la densidad celular utilizando un hemocitómetro, un contador Coulter, o el examen de densidad celular (CEDEX). La densidad celular viable se puede determinar tiñendo una muestra de cultivo con azul Tripano. Como solo las células muertas captan el azul tripano, se puede determinar la densidad celular viable contando el número total de células, dividiendo el número de células que captan el colorante por el número total de células, tomar el reciproco. Se puede utilizar una HPLC para determinar los niveles de lactato, amonio o el polipéptido o proteína que se expresa. De manera alternativa, el nivel de polipéptido o proteína que se expresa se puede determinar por técnicas de biología molecular convencionales tales como la tinción con Coomassie de geles de SDS-PAGE, transferencia de Western, ensayos de Bradford, 10 ensayos de Lowry, ensayos de Biuret, y absorbancia UV. También puede ser ventajoso o necesario controlar las modificaciones post-traduccionales del polipéptido o proteína que se expresa, incluyendo la fosforilación y glicosilación.

Aislamiento del polipéptido que se expresa

15 En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar las proteínas o polipéptidos que se expresan de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, el polipéptido o proteína que se expresa se segregan en el medio y por lo tanto se pueden retirar las células y otros sólidos, por centrifugación o filtrado por ejemplo, como una primera etapa del proceso de purificación. Esta realización es particularmente útil cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención, ya que los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento dan como resultado un aumento de la viabilidad celular. Como resultado, pocas células mueren durante el proceso de cultivo, y 20 se liberan menos enzimas proteolíticas en el medio que pueden disminuir potencialmente el rendimiento del polipéptido o proteína que se expresa.

25 De manera alternativa, el polipéptido o proteína que se expresa se une a la superficie de una célula huésped. En esta realización, los medios se retiran y las células huésped que expresan el polipéptido o proteína se lisán como una primera etapa del proceso de purificación. La lisis de las células huésped de mamífero se puede conseguir por cualquiera de los distintos medios bien conocidos por los expertos habituados en la técnica, incluyendo la destrucción física con perlas de cristal y la exposición a condiciones de alto pH.

30 El polipéptido o proteína se puede aislar y purificar por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño, e hidroxiapatita), filtración centrifugación en gel, o solubilidad diferencial, precipitación en etanol o por cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (Véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2^a Edición, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. y Hames, B.D. (eds.), Protein Expression : A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification : Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol. 182), Academic Press, 1997, las cuales se incorporan en el presente documento por referencia). Para la cromatografía de immunoafinidad en particular, la 35 proteína se puede aislar uniéndola a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se pueden generar contra esa proteína y se fija en un soporte estático. De manera alternativa, se pueden unir marcadores de afinidad tales como una secuencia de envoltura de gripe, poli-histidina, o glutatión-S-transferasa a la proteína por técnicas recombinantes convencionales para permitir una fácil purificación por pasajes por la columna de afinidad apropiada. Se 40 pueden añadir inhibidores de proteasas tales como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina en cualquiera o todos los estadios con el fin de reducir o eliminar la degradación del polipéptido o proteína durante el proceso de purificación. Los inhibidores de proteasas se desean particularmente cuando las células se tienen que lisar con el fin de aislar y purificar el polipéptido o proteína que se expresa. Un experto habituado en la técnica apreciará que la técnica de purificación exacta variará dependiendo del carácter del polipéptido o la proteína que se va a purificar, el carácter de las células en las que se expresa el polipéptido o 45 proteína, y la composición del medio en el que se cultivan las células.

Formulaciones farmacéuticas

50 En ciertas realizaciones preferidas de la invención, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán una actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones inventivas que se describen anteriormente se pueden administrar en un sujeto o se pueden formular para suministrarse por cualquier vía disponible que incluye, pero no se limita a las vías parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las 55 composiciones farmacéuticas inventivas incluyen típicamente un polipéptido o proteína purificados que se expresa en una línea celular de mamífero, un agente de suministro (es decir, un polímero catiónico, un transportador peptídico molecular, un tensioactivo, etc., como se ha descrito anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción retardada, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

60 Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con la vía de administración que se pretende. Las soluciones o suspensiones que se utilizan para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden

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

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados

10 incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución fosfato tamponada (PBS). En todos los casos, la composición debería ser estéril y debería ser fluida hasta el extremo en que se pueda administrar con una jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se deben conservar contra la acción contaminante de 15 microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, los parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico. La absorción prolongada de las 20 composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el polipéptido o proteína purificados en una cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes que se han enumerado anteriormente, según se necesite, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el polipéptido o proteínas purificados que se expresan a partir de una línea celular de mamífero en un vehículo estéril que contienen un medio de dispersión básico y otros ingredientes necesarios de entre los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones 30 inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que da como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional que se deseé a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

35 Las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Con el fin de la administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificados se pueden incorporar con excipientes y utilizarse en forma de tabletas, trociscos, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal. Se pueden incluir agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, 40 píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como la celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como el ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz, un lubricante tal como el estearato magnésico o Esterotes; una sustancia de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal, un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o saborizante de naranja. Las formulaciones para suministro oral pueden incorporar ventajosamente agentes 45 para mejorar la estabilidad en el tracto gastrointestinal y/o aumentar la absorción.

50 Para la administración por inhalación, las composiciones inventivas comprenden un polipéptido o proteína purificados que se expresan a partir de una línea celular de mamífero y un agente de suministro se suministran preferentemente en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un envase presurizado o un dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como el dióxido de carbono, o un nebulizador. La presente invención contempla particularmente el suministro de las composiciones que utiliza un pulverizador nasal, inhalador, u otro suministro directo en las vías aéreas superiores e inferiores. La administración de vacunas ADN dirigidas contra los virus de gripe han demostrado que inducen respuestas de linfocitos T CD8, lo que indica que al menos algunas células en el tracto respiratorio pueden captar ADN cuando se suministra por esta vía, y los agentes de suministro de la invención aumentarán la captación celular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, las 55 composiciones que comprenden un polipéptido purificado que se expresa a partir de una línea celular de mamífero y un agente de suministro se formulan como grandes partículas porosas para la administración en aerosol.

60 La administración sistémica también puede ser por medio transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación, penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir por medio del uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el polipéptido o proteína purificados y los agentes de suministro se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas y

se conocen en general en la técnica.

Las composiciones se pueden preparar también en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales de supositorios tales como manteca de coco y otros glicéridos) o de enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, las composiciones se preparan con vehículos que protegerán el polipéptido o proteína contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán aparentes para los expertos en la técnica. Los materiales se pueden obtener también comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden utilizar suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. Nº 4.522.811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del polipéptido o proteína activos que se calcula para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario.

El polipéptido o proteína que se expresa de acuerdo con la presente invención se puede administrar en varios intervalos y durante diferentes períodos de tiempo según se necesite, por ejemplo, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, entre 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas, aproximadamente 4, 5, o 6 semanas, etc. El experto apreciará que hay ciertos factores que pueden tener influencia en la dosificación y tiempo necesarios para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen pero no se limitan a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades que estén presentes. En general, el tratamiento de un sujeto con un polipéptido o proteína como se describe en el presente documento puede incluir un único tratamiento o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Se entiende además que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y puede opcionalmente hacerse a medida del receptor particular, por ejemplo, mediante la administración de dosis crecientes hasta que se alcanza una respuesta deseada que se había preseleccionado. Se entiende que el nivel de dosis específica para cualquier sujeto animal particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del polipéptido o proteína específicos que se empleen, la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación farmacológica, y el grado de expresión o actividad que se va a modular.

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

Las composiciones farmacéuticas inventivas se pueden incluir en un envase, paquete, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Se tiene que entender que la descripción anterior es solamente representativa y no pretende ser limitante. Serán evidentes para el experto en la técnica procedimientos y materiales alternativos para implementar la invención y también aplicaciones adicionales, y se pretende que se incluyan en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medio 1 aumentado por un proceso semi-continuo de anti-GDF-8

Los procesos semi-continuos tradicionales para cultivar líneas celulares tienen varios obstáculos que incluyen el tiempo y el esfuerzo necesarios para administrar las alimentaciones y la necesidad de equipamiento especial en los biorreactores a gran escala. El objetivo era desarrollar un medio discontinuo para la producción de las proteínas de interés en biorreactores a gran escala que necesite alimentaciones mínimas.

Materiales y procedimientos

CEPAS Y MEDIOS: Se modificaron células de ovario de hámster chino ("CHO") para expresar un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento y diferenciación 8 (células "anti-GDF-8") (véase Veldman y col., Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor, documento US20040142382 A1). Las células anti-GDF-8 se utilizaron para ensayar un nuevo medio discontinuo. Se compararon el Medio 1 y el Medio 2 en cuanto a su capacidad para soportar una alta densidad y viabilidad celular. Las composiciones de estos medios, así como el Medio 3 se enumeran en la Tabla 1. Los medios se prepararon añadiendo todos los componentes excepto FeSO₄·7H₂O. Los medios se ajustaron entonces a un pH de 7,25, se registró la osmolaridad y se añadió entonces el

FeSO4·7H2O.

CONDICIONES DE CULTIVO: Para los experimentos en matraz, las células anti-GDF-8 se cultivaron en matraces con agitado y se hicieron tres pasajes. Para los experimentos en biorreactor, las células anti-GDF-8 se cultivaron en los medios durante 12 días, se suplementaron diariamente con un 2 % por volumen de 20x del medio de alimentación Medio 4 (Tabla 3) o un 3 % por volumen de 16x de Medio 4 (Tabla 4) después del día 5. Los primeros 4 días, las células se cultivaron a 37 °C. El día 5, las células se cambiaron a 31 °C.

5

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS: Se tomaron muestras de los cultivos diariamente y se analizaron en cuanto a los niveles de aminoácidos, vitaminas, hierro, fosfato, glucosa y glutamina.

Tabla 1. Composiciones del Medio 1, Medio 2 y Medio 3.

	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
Aminoácidos	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
alanina	96,03	1,08	17,80	0,20	24,87	0,28
arginina	1186,99	6,82	347,97	2,00	423,43	2,43
asparagina·H ₂ O	713,59	4,76	75,00	0,50	173,90	1,16
Ácido aspártico	318,53	2,39	26,20	0,20	52,72	0,40
Cisteína·HClH ₂ O	70,01	0,40	70,19	0,40	70,01	0,40
cistina·2HCl	297,09	0,95	62,25	0,20	62,09	0,20
Ácido glutámico	158,59	1,08	29,40	0,20	41,08	0,28
glutamina	1892,40	12,96	1163,95	7,97	1162,40	7,96
glicina	95,88	1,28	30,00	0,40	35,92	0,48
Histidina·HClH ₂ O	369,10	1,76	46,00	0,22	75,27	0,36
isoleucina	623,63	4,76	104,99	0,80	151,90	1,16
leucina	852,31	6,51	104,99	0,80	172,69	1,32
lisina·HCl	945,96	5,20	145,99	0,80	218,38	1,20
metionina	291,82	1,96	29,80	0,20	53,55	0,36
fenilalanina	428,62	2,60	65,99	0,40	98,81	0,60
prolina	372,25	3,24	68,99	0,60	96,40	0,84
serina	904,71	8,62	126,00	1,20	273,07	2,60
treonina	513,39	4,31	94,99	0,80	132,81	1,12
triptófano	159,32	0,78	16,00	0,08	28,99	0,14
tirosina·2Na·2H ₂ O	560,81	2,15	103,79	0,40	145,10	0,56
valina	505,36	4,32	93,99	0,80	131,17	1,12
<hr/>						
Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
biotina	2,00	8,21	0,20	0,82	0,36	1,49
Pantotenato cálcico	22,02	46,27	2,24	4,71	4,03	8,47
Cloruro de colina	87,67	630,74	8,98	64,60	16,11	115,92
Ácido fólico	25,95	58,84	2,65	6,01	4,76	10,80
inositol	123,39	685,47	12,60	69,99	22,64	125,79

(continuación)

	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
nicotinamida	19,60	160,70	2,02	16,56	3,61	29,62
piridoxal·HCl	1,99	9,83	2,00	9,85	1,99	9,83
piridoxina·HCl	18,06	87,67	0,03	0,15	1,67	8,10
riboflavina	2,20	5,85	0,22	0,59	0,40	1,06
tiamina·HCl	21,51	63,84	2,17	6,44	3,92	11,64
vitamina B12	6,93	5,12	0,78	0,58	1,34	0,99
Sales inorgánicas	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
CaCl ₂	115,78	1,04	116,09	1,05	115,78	1,04
KCl	310,94	4,17	311,77	4,18	310,94	4,17
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50	70,99	0,50	70,81	0,50
NaCl	1104,96	18,92	5539,00	94,85	3704,96	63,44
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	636,33	4,61	62,49	0,45	114,33	0,83
MgSO ₄	48,70	0,41	48,83	0,41	48,70	0,41
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	95,00			8,60	95,00
MgCl ₂	28,53	0,30	28,61	0,30	28,53	0,30
NaHCO ₃	2000,00	23,81	2440,00	29,04	2440,00	29,04
Elementos traza	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
Selenito sódico	28,00	161,94	5,00	28,92	7,00	40,49
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	49,86	123,42	50,00	123,75	49,86	123,42
CuSO ₄	2,69	16,80	0,80	5,00	0,97	6,06
CuSO ₄ ·5H ₂ O	11,24	45,00			7,49	30,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2503,85	9006,64	839,96	3021,45	1542,85	5549,81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2734,77	9528,82	429,96	1498,12	1383,80	4821,59
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,26	1,51			0,17	1,01
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	210,00	739,27			140,00	492,84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,86	1,50			1,24	1,00
NH ₄ VO ₃	0,98	8,33			0,65	5,56
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0,20	0,74			0,13	0,49
SnCl ₂ ·2H ₂ O	0,18	0,80			0,12	0,53

(continuación)

	Medio 1		Medio 2		Medio 3	
Otros Componentes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Hidrocortisona	0,23	0,64	0,04	0,10	0,09	0,24
Putrescina·2HCl	6,48	40,22	1,08	6,70	2,48	15,39
Ácido linoleico	0,22	0,80	0,04	0,14	0,06	0,20
Ácido tióctico	0,56	2,73	0,10	0,49	0,14	0,69
D-glucosa (Dextrosa)	16039,43	89107,92	6150,72	34170,64	11042,24	61345,76
PVA	2560,00		2400,00		2520,00	
Insulina	54,00		10,00		14,00	
Piruvato sódico	54,85	498,63	55,00	499,95	54,85	498,63

Resultados y conclusiones

5 La Figura 1 muestra que la tasa de crecimiento de las células anti-GDF-8 era similar tanto en el Medio 1 como en el Medio 2 en los experimentos en matraz.

10 La Figura 2 muestra que en los biorreactores, el Medio 1 presentaba un aumento significativo en la densidad y viabilidad celular final sobre el Medio 3. El título final también aumentaba significativamente, desde 551 mg/l para el proceso en plataforma a 976 mg/l con el Medio 1 (datos no mostrados). La temperatura se cambió de 37 °C a 31 °C el día 5. Debido al inesperado crecimiento celular, los cultivos se alimentaron diariamente después del día 5 con o un 2 % por volumen de 20x de Medio 4 o un 3 % por volumen de 16x de Medio 4. Por lo tanto esto no es un verdadero experimento discontinuo como se pretendía originalmente. Se suplementó con asparagina y tiamina en los medios de alimentación comenzando el día 10.

15 En el desarrollo de un medio discontinuo concentrado, se tienen que considerar varios problemas. Primero, los nutrientes concentrados pueden ser tóxicos para las células. En el medio desarrollado en el presente Ejemplo, todos los nutrientes y componentes se determinaron para que estuvieran por debajo de los límites de toxicidad (datos no mostrados).

20 Segundo, el medio discontinuo concentrado tiene necesariamente una osmolaridad más alta que los medios no concentrados, la cual ha demostrado tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento y viabilidad celulares. Este problema se puede sortear bajando la cantidad de NaCl en los medios de partida. Además, los medios discontinuos concentrados contienen niveles insuficientes de glucosa para sostener el crecimiento durante el periodo de cultivo completo. Por lo tanto, los cultivos se suplementaron diariamente tras el día 5 con una alimentación de glucosa.

Tercero, la insulina y la glutamina son susceptibles a la degradación durante el día 12 del periodo de cultivo. Por lo tanto, el cultivo se suplementó con estos componentes además de la glucosa.

25 Finalmente, el hierro precipitará fuera de una solución que contenga altas concentraciones de fosfato y pH alto. Este problema puede sortearse añadiendo hierro al final del proceso de preparación del medio, después de que el pH se haya ajustado a un nivel apropiado.

Ejemplo 2: Desarrollo del medio de alimentación concentrado (Medio 5) para las células anti-GDF-8 en un proceso semi-continuo

30 En el Ejemplo 1, se desarrolló un proceso discontinuo para cultivar las células anti-GDF-8 utilizando el Medio 1. Debido a la alta densidad celular que resultaba durante el proceso, se determinó que sería ventajosa la suplementación de nutrientes además de la glucosa y la glutamina. Sin embargo, la suplementación del lote con 8x de Medio 4 resultaría en una excesiva dilución del cultivo. Se desarrollaron medios de alimentación más concentrados con el fin de sortear este problema.

Materiales y procedimientos y resultados

35 La tabla 2 enumera las composiciones del Medio 4A-1, Medio 4B, Traza B y Traza D que se utilizaron en las formulaciones de las Tablas 3-7.

Tabla 2. Composiciones del Medio 4A-1, Medio 4B, Traza B y Traza D que se utiliza en las formulaciones de las Tablas 3-7.

	Medio 4A-1		Medio 4B		Elementos Traza B		Elementos Traza D	
Aminoácidos	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
alanina	17,80	0,20						
arginina	191,00	1,10						
asparagina·H ₂ O	135,00	0,90						
Ácido aspártico			66,50	0,50				
Ácido glutámico			29,40	0,20				
glicina	15,00	0,20						
Histidina·HCl·H ₂ O	73,50	0,35						
isoleucina	118,00	0,90						
leucina	170,00	1,30	1,30					
lisina·HCl	182,00	1,00						
metionina	59,60	0,40						
fenilalanina	82,50	0,50						
prolina	69,00	0,60						
serina	158,00	1,50						
treonina	95,20	0,80						
triptófano	32,60	0,16						
tirosina·2Na·2H ₂ O			104,00	0,40				
valina	93,60	0,80						
Vitaminas	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
biotina	0,41	1,68						
Pantotenato cárlico	4,50	9,45						
Cloruro de colina	17,90	128,78						
Ácido fólico			5,30	12,02				
inositol	25,20	140,00	140,00					
nicotinamida	4,00	32,79						
piridoxina·HCl	4,10	19,90						
riboflavina	0,45	1,20						
tiamina·HCl	4,40	13,06						
vitamina B12	1,40	1,03						

(continuación)

	Medio 4A-1		Medio 4B		Elementos Traza B		Elementos Traza D	
Elementos traza	µg/l	nM	mg/l	µM	µg/l	nM	µg/l	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O					1,24	1,00		
CuSO ₄	0,43	2,69						
CuSO ₄ ·5H ₂ O							7,49	30,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O							834	3000
MnSO ₄ ·H ₂ O					0,17	1,01		
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O					140,00	492,84		
NH ₄ VO ₃					0,65	5,56		
NiSO ₄ ·6H ₂ O					0,13	0,49		
SnCl ₂ ·2H ₂ O					0,12	0,53		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	230,00	801,39					863	3007
Otros Componentes	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
Ácido linoleico			42,00	0,15				
Ácido tióctico			105,00	0,51				
D-glucosa (Dextrosa)			1000000	5555,56				

1. 20x de Medio 4

5 El primer medio concentrado se desarrolló como 20x de Medio 4. La formulación del medio para el 20x de Medio 4 se proporciona en la Tabla 3.

Tabla 3. Hoja de trabajo del medio de alimentación 20x de Medio 4.

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	31,120	g/l
	Nucellin™	40,000	ml/l
	Materia prima H/P	20,000	ml/l
	Materia prima Selenito	2,000	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,610	g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,430	g/l
	Ácido apartico	1,330	g/l
	Ácido glutámico	0,588	g/l
	Ácido linoleico	0,840	ml/l
	Ácido tióctico	2,100	ml/l
	Tirosina·2Na (Pm 225)	1,790	g/l

(continuación)

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
	1000x de Traza B	6,000	ml/l
	Glucosa	100,000	g/l
	Glutamina	14,600	g/l
	pH a 7,0		
	Osmolaridad registrada	1064,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Añadir 108 ml de Traza D, 0,25 g FeSO ₄ ·7H ₂ O a 280 ml de Materia prima de Cisteína	
III	Ácido fólico	720 ml de ácido fólico 6 mM	

Nota: Nucellin™ está fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); materia prima de H/P = 0,036 mg/ml de hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina·2HCl,

La formulación del medio consiste en tres partes: I, II, III. La parte I es la versión concentrada de 8x de Medio 4 con los componentes individuales del Medio 4B excepto el ácido fólico debido a los problemas de solubilidad de esta vitamina. La Parte II es materia prima de hierro, Traza D y cisteína ácida, para evitar una posible precipitación del hierro si se añade en la parte I. La parte III es materia prima de ácido fólico. La parte I se añade en un 2 % por volumen diariamente comenzando el día 5 y las partes II y III se añaden una vez el día 5 junto con la Parte I.

El pH final del medio de alimentación se ajustó a 7,0 y la osmolaridad era aproximadamente de 1064 mOsm. Una alimentación del 2 % dará como resultado un aumento de 2 g/l de glucosa, 2 mM de Glutamina y de la osmolaridad de 14 mOsm en el cultivo

2. 16x de Medio 4

Para reducir el aumento de osmolaridad, el medio de alimentación se cambió de 20x de Medio 4 (2 % por volumen diariamente) a 16x de Medio 4 (3 % por volumen diariamente). La formulación del medio para 16x de Medio 4 se proporciona en la Tabla 4.

15

Tabla 4. Hoja de trabajo de medio de 16x de Medio 4.

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	24,896	g/l
	Nucellin™	32,000	ml/l
	Materia prima H/P	16,000	ml/l
	Materia prima Selenito	1,600	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,088	g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,344	g/l
	Ácido apartico	1,064	g/l
	Ácido glutámico	0,470	g/l
	Ácido linoleico	0,672	ml/l
	Ácido tióctico	1,680	ml/l
	Tirosina·2Na (Pm 225)	1,432	g/l
	1000x de Traza B	9,000	ml/l
	Glutamina	6,280	g/l

(continuación)

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
	pH a 7,0		
	Osmolaridad registrada	295,000	mOsm
II	Cisteína (400 mM)	Añadir 108 ml de Traza D, 0,25 g FeSO ₄ ·7H ₂ O a 280 ml de Materia prima de Cisteína	
III	Ácido fólico	720 ml de ácido fólico 6 mM	
Nota: Nucellin™ está fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); materia prima de H/P = 0,036 mg/ml hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina·2HCl,			

En este 16x de Medio 4 modificado, también se eliminó la glucosa para reducir adicionalmente la osmolaridad y dar alguna flexibilidad a la alimentación con glucosa. La osmolaridad total del medio de alimentación es ahora de 295 mOsm.

3. 16x de Medio 4

Se hicieron cambios en la formulación de 16x de Medio 4. La solución de materia prima de hierro se añadió en la alimentación dando como resultado una adición de 0,45 mM en cada alimentación. Adicionalmente, se añadió glucosa de nuevo para dar una adición de 1,5 g/l cada alimentación. La formulación del medio para este 16x de Medio 4 modificado se proporciona en la tabla 5.

Tabla 5. Hoja de trabajo de medio de alimentación 16x de Medio 4

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
I	Medio 4A-1	24,896	g/l
	Nucellin™	32,000	ml/l
	Materia prima H/P	16,000	ml/l
	Materia prima Selenito	1,600	ml/l
	PVA	2,400	g/l
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,088	g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,344	g/l
	Ácido aspártico	1,064	g/l
	Ácido Glutámico	0,470	g/l
	Ácido linoleico	0,672	ml/l
	Ácido Tióctico	1,680	ml/l
	Tirosina·2Na (Pm 225)	1,432	g/l
	1000x Traza B	9,000	ml/l
	Glucosa	50,000	g/l
	Glutamina	7,300	g/l
	pH to 7,0		
	FeSO ₄ ·7H ₂ O (materia prima 1 mM)	15,000	ml/l
	Osmolaridad registrada	607,000	mOsm

(continuación)

Parte	Componente	Cantidad	Unidad
II	Ácido Fólico	720 ml de Ácido Fólico 6 mM	
III	Cisteína (400 mM)	Añadir 108 ml de Traza D, 0,25 g FeSO ₄ ·7H ₂ O a 280 ml de Materia prima de Cisteína	
Nota: Nucellin™ está fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); materia prima de H/P = 0,036 mg/ml hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina·2HCl,			

4. 16x de Medio 4

5 Aquí, el medio de alimentación (16x de Medio 4) se produjo en medio combinado en vez de 3 alimentaciones separadas como en los últimos lotes distintos. Se hicieron los ensayos para asegurar que el ácido fólico se pudiera disolver a la concentración necesaria y que ni el hierro ni el ácido fólico precipitaran en la solución tras el almacenamiento ni a 4 °C ni a temperatura ambiente durante 6 días. La formulación del medio para 16x de Medio 4 combinado se proporciona en la Tabla 6.

Tabla 6. Hoja de trabajo del medio de alimentación 16x de Medio 4.

Componente	Cantidad	Unidad
Medio 4A-1	24,896	g/l
Nucellin™	32,000	ml/l
Materia prima H/P	16,000	ml/l
Materia prima Selenito	1,600	ml/l
PVA	2,400	g/l
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,088	g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,344	g/l
Ácido aspártico	1,064	g/l
Ácido Glutámico	0,470	g/l
Ácido linoleico	0,672	ml/l
Ácido Tióctico	1,680	ml/l
Tirosina·2Na (Pm 225)	1,432	g/l
Glucosa	66,700	g/l
Glutamina	7,300	g/l
Ácido Fólico	70,560	mg/l
Cisteína ácida (400 mM)	6,250	ml/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O (materia prima 1 mM)	23,000	ml/l
1000x de Traza B	9,000	ml/l
1000x de Traza D	3,300	ml/l
pH esperado 6,11	Ajustado a 7,0	
Osmolaridad registrada	724,000	mOsm
Nota: Nucellin™ está fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) ; materia prima de H/P = 0,036 mg/ml hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina·2HCl,		

La osmolaridad final de los medios es de 724 mOsm, con una adición diaria de glucosa de 2 g/l y una adición de glutamina de 1,5 mM.

5. 12x de Medio 4

Aquí, se hicieron varios cambios al medio de alimentación. Se utilizó Medio 4B en polvo en vez de añadir cada ingrediente individual en el Medio 4B. El Medio 4B en polvo se mezcló con glucosa y se disolvió por separado en condiciones básicas titulando la solución a pH 10,25. Se añadieron asparagina y tiamina adicionales ya que el análisis de aminoácidos y vitaminas mostraba que estos dos componentes estaban agotados al final del proceso semi-continuo. El uso de 12x de Medio 4 reducía además el aumento de osmolaridad cuando se alimentaba el cultivo. La formulación de 12x de Medio 4 se proporciona en la Tabla 7.

10

Tabla 7. Hoja de trabajo del medio de alimentación 12x de Medio 4.

Componente	Cantidad	Unidad
Medio 4A-1	18,672	g/l
Nucellin™	24,000	ml/l
Materia prima H/P	12,000	ml/l
Materia prima Selenito	1,200	ml/l
PVA	2,400	g/l
Asparagina.H ₂ O	1,620	g/l
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,566	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,258	g/l
Glutamina	5,475	g/l
Tiamina	0,040	g/l
Medio 4B y glucosa predisueltos	-175	ml/l
Cisteína ácida (400 mM)	4,688	ml/l
Registro de pH		
Ajuste del pH a 7,2 con HCl 5 N		
FeSO ₄ (materia prima 1 mM)	17,250	ml/l
1000x de Traza B	6,750	ml/l
1000x de Traza D	2,475	ml/l
Registro de pH (esperado 7,18)		
Registro de Osm	566,000	
Medio 4B y glucosa predisueltos (para 1 l de medio de alimentación)		
Agua	150 ml	
Mezcla de Medio 4B (14,5 g) con glucosa (38,3 g)	Añadido	
Ajuste del pH utilizando un 25 % de NaOH hasta disolución (pH aproximadamente de 10,25)		
Nota: Nucellin™ está fabricado por Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA); materia prima de H/P = 0,036 mg/ml hidrocortisona, 1,08 mg/ml Putrescina·2HCl,		

La osmolaridad final es de 566 mOsm. Una alimentación diaria de un 4 % por volumen da un aumento de osmolaridad aproximada de 8,6, un aumento de glucosa de 2 g/l y un aumento de glutamina de 1,5 mM. La formulación de medios de 12x Medio 4 también se conoce como Medio 5. El Medio 5 es fácil de compararse con el 20x de Medio 4 o 16x de Medio 4, y es estable durante 10 días a temperatura ambiente o a 4 °C (datos no mostrados).

15

Ejemplo 3: Proceso semi-continuo con privación de glutamina para el cultivo celular de anti-GDF-8

Las células necesitan glutamina en el medio de partida para sobrevivir. Tradicionalmente, los niveles iniciales de glutamina son altos y se alimenta con glutamina diariamente después del día 5 hasta el final del proceso semi-continuo. Los procesos semi-continuos tradicionales normalmente dan como resultado altos niveles de lactato y amonio en los cultivos celulares, que se sabe que tienen efectos inhibidores sobre el crecimiento celular, densidad celular y expresión de la proteína recombinante. Los procesos semi-continuos en los que se añade glucosa lentamente al cultivo han demostrado que disminuyen la producción de lactato y mejoran el crecimiento celular, la densidad celular y la expresión de proteína recombinante. Sin embargo, los procedimientos de la técnica anterior para la manipulación de la adición de glucosa no son prácticos para la fabricación a gran escala. Aquí, utilizando un medio de cultivo con niveles de partida menores de glutamina y eliminando la glutamina de la alimentación, se demuestra que se producían menores niveles de amonio y lactato, dando lugar a un aumento de la viabilidad celular. De manera adicional, en los cultivos privados de glutamina, aumenta la expresión de proteína recombinante y se reduce la osmolaridad final.

Materiales y procedimientos

CEPAS Y MEDIOS: Se cultivaron las células anti-GDF-8 en modo semi-continuo en Medio 1 en un Biorreactor de 1 l. CONDICIONES DE CULTIVO: Las células se cultivaron durante doce días en Biorreactores de 1 l. Se cambió la temperatura de 37 °C a 31 °C en el día 4 o el día 5 dependiendo del crecimiento celular. Se ensayaron tres procesos semi-continuos: un proceso normal (de control), un proceso de alimentación sin glutamina y un proceso de privación de glutamina. Los detalles pertinentes de estos procesos se enumeran en la Tabla 8 y la Tabla 9.

20 Tabla 8. Proceso semi-continuo en Biorreactores de 1 l con un proceso de alimentación sin glutamina

	Proceso de Control	Proceso de alimentación sin glutamina
Glutamina del medio de partida (mM)	13 mM	13 mM
Alimentación con glutamina	5 mM el Día 4	Sin alimentación con glutamina
Medio de alimentación	Medio 5 (con 37,5 mM de glutamina)	Medio 5 sin glutamina
Programación de la alimentación	4 % diariamente desde el día 5	4 % diariamente desde el día 5
Cambio de temperatura a 31 °C	Día 4	Día 5

Tabla 9. Proceso semi-continuo en Biorreactores de 1 l con un proceso de privación de glutamina

	Proceso de Control	Proceso con glutamina baja
Glutamina del medio de partida (mM)	13 mM	4 mM
Alimentación con glutamina	5 mM el Día 4	Sin alimentar con glutamina
Medio de alimentación	Medio 5 (con 37,5 mM de glutamina)	Medio 5 sin glutamina
Programación de la alimentación	4 % diariamente desde el día 5	4 % diariamente desde el día 5
Cambio de temperatura a 31 °C	Día 4	Día 5

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS: Se tomaron muestras diarias de los cultivos y se analizaron en cuanto a la densidad celular, viabilidad celular, niveles de lactato, glutamina, y amonio. El título del anticuerpo anti-GDF-8 expresado también se midió diariamente.

Resultados y Conclusiones

La Figura 3 muestra la densidad celular de los cultivos que se cultivan en condiciones de alimentación sin glutamina o de control semi-continuo. En ambos casos, la densidad celular era similar durante el curso del experimento.

30 La Figura 4 muestra el porcentaje de viabilidad celular en cultivos que se cultivan en condiciones de alimentación sin glutamina o de control semi-continuo. El cultivo de alimentación sin glutamina presentaba una viabilidad marcadamente mayor al final del experimento, comenzando el día 6.

35 La Figura 5 muestra el porcentaje de viabilidad celular en cultivos que se cultivan en condiciones sin alimentación con glutamina o de control semi-continuo. El cultivo de alimentación sin glutamina presentaba una marcada disminución de los niveles de amonio al final del experimento, comenzando el día 4.

La Figura 6 muestra los niveles de lactato en los cultivos que se cultivan en condiciones sin alimentación de glutamina o de control semi-continuo. Los niveles de lactato eran ligeramente menores en el cultivo de alimentación sin glutamina a lo largo del curso del experimento.

5 La Figura 7 muestra el título de anticuerpo anti-GDF-8 en los cultivos que se cultivan en condiciones sin alimentación de glutamina o de control semi-continuo. El título final de anticuerpo anti-GDF-8 era mayor en el cultivo de alimentación sin glutamina.

La Figura 8 muestra la densidad celular de los cultivos que se cultivan en condiciones de privación de glutamina o de control semi-continuo. En ambos casos, la densidad celular era similar durante el curso del experimento.

10 La Figura 9 muestra la viabilidad celular en los cultivos que se cultivan en condiciones de privación de glutamina o de control semi-continuo. En ambos casos, la viabilidad celular era similar durante el curso del experimento.

La Figura 10 muestra los niveles de amonio en los cultivos que se cultivan en condiciones de privación de glutamina o de control semi-continuo. El cultivo con privación de glutamina presentaba una marcada disminución de los niveles de amonio a lo largo del curso del experimento.

15 La Figura 11 muestra los niveles de lactato en los cultivos que se cultivan en condiciones de privación de glutamina o de control semi-continuo. El cultivo con privación de glutamina presentaba una disminución marcada de los niveles de lactato a lo largo del experimento hacia el final, comenzando el día 4.

La Figura 12 muestra el título de anticuerpo anti-GDF-8 en los cultivos que se cultivan en condiciones de privación de glutamina o de control semi-continuo. El título de anticuerpo anti-GDF-8 era más alto en el cultivo con privación de glutamina.

20 Colectivamente, estos resultados indican que la disminución de los niveles de glutamina es beneficiosa para los cultivos celulares reduciendo la cantidad de producción de amonio, aumentando la viabilidad celular y aumentando el título del anticuerpo anti-GDF-8 que se expresa. Además, en los cultivos con privación de glutamina, se observaron bajos niveles de lactato, posiblemente debidos a la disminución de la tasa del consumo de glucosa. La disminución de los niveles de amonio y lactato también tiene el efecto de reducir la osmolaridad total. Se sabe 25 también que la osmolaridad elevada tiene efectos inhibidores sobre el crecimiento celular y la viabilidad. Los niveles iniciales de glutamina bajos junto con la eliminación de la alimentación de glutamina también tienen un efecto positivo en la reducción del amonio que se produce como resultado de la degradación de glutamina no enzimática en los medios almacenados. La eliminación de glutamina en la alimentación también simplifica el proceso de cultivo de células anti-GDF-8.

30 **Ejemplo 4. Respuesta a la dosis de hierro de las células anti-GDF-8 en el Medio 1 y el Medio 2**

El Medio 1 está mucho más concentrado en nutrientes que el Medio 2. Los niveles óptimos de hierro para el crecimiento celular en el Medio 1 se determinaron con el fin de evitar problemas de deficiencia de hierro durante el cultivo celular.

Materiales y procedimientos

35 Las células anti-GDF-8 se cultivaron en placas para un pasaje en Medio 1 o en Medio 2. Las concentraciones de estos medios se modificaron por adición de diferentes cantidades de una solución de materia prima de hierro. Las densidades celulares finales se midieron por CEDEX.

Resultados y conclusiones

40 La Figura 13 muestra la respuesta a la dosis de hierro de las células anti-GDF-8 en el Medio 1 y el Medio 2 que contienen diferentes concentraciones de hierro. En el Medio 2, la densidad celular era relativamente constante para concentraciones de hierro que variaban desde 3 μM a 15 μM . En el Medio 1, la densidad celular aumentaba con el aumento de la concentración de hierro pero alcanzaba un máximo después de aproximadamente 5 μM . Esta diferencia podría deberse al alto contenido en nutrientes del Medio 1, que puede reducir la disponibilidad del hierro a las células como consecuencia de la quelación del hierro en el medio. Estos resultados indican que los niveles de hierro deberían mantenerse por encima de 5 μM para evitar problemas de deficiencia de hierro en el Medio 1.

Ejemplo 5. Sustitución de glutamato por glutamina en el proceso en Biorreactor

Se llevaron a cabo tres experimentos para ensayar los efectos de la sustitución de glutamato por glutamina en un proceso de cultivo celular de anti-Lewis Y.

Materiales y procedimientos

50 Se llevaron a cabo los experimentos en biorreactores de 10 l a un pH 7.1, un 30 % de oxígeno disuelto, y una temperatura de partida de 37 °C con un cambio a 31 °C el día 5. Los gases de aireación y del espacio superior eran un 88 % de una mezcla de un 93 % de aire/7 % de CO₂ y un 12 % de oxígeno. El medio de partida era en todos los

experimentos el Medio 1, que contiene glutamina. Los medios de alimentación y la programación de alimentación que incluye alimentaciones suplementarias de glucosa y glutamina se muestran en la Tabla 10. Las columnas marcadas con "Glutamato" se alimentaron con Medio 5 modificado, que no contenía glutamina, pero contenía una concentración molar de glutamato igual a la concentración molar de glutamina del Medio 5 convencional. Las columnas marcadas con glutamina se alimentaron con el Medio 5 convencional.

5

Tabla 10. Programación de alimentación.

Día	9040-44		9040-56		9040-64	
	Glutamato 1	Glutamina 1	Glutamato 2	Glutamina 2	Glutamato 3	Glutamina 3
0						
1						
2						
3						
4		5 mM gln		5 mM gln	3 g/l gluc3	7,7 mM gln 2,9 g/l gluc
5	3,6 g/ gluc	5 mM gln 5,5 g/l gluc	3,5 g/l gluc	5 mM gln 6 g/l gluc	3 g/l gluc	3 g/l gluc
6	12 % 16x Medio 4	12 % 16x Medio 4	17 % Medio 5	17 % 16x Medio 4	29 % Medio 5	29 % Medio 5
7		4 mM gln				
8						
9		2,5 g/l gluc				
10	10 % 16x Medio 4	10 % 16x Medio 4	8 % Medio 5	5 % 16x Medio 4		
11		1 g/l gluc				
12						
13		1 g/l gluc				

Resultados y conclusiones

10 En cada experimento, la densidad celular es similar como se muestra en la Figura 14. Las densidades celulares son bajas en los experimentos de Glutamina 2 y Glutamato 2 debido a una desviación del pH a aproximadamente 6,7 el día 3 del proceso. La caída en la densidad entre el día 6 y 7 en los experimentos de Glutamina 3 y Glutamato 3 es debido al 29 % de medio de alimentación el día 6.

15 La Figura 15 muestra la viabilidad celular de los cultivos de alimentación con glutamato y glutamina. Las viabilidades se mantenían más altas durante la segunda mitad del proceso en los biorreactores que contenían cultivos de alimentación con glutamato.

En el Experimento 1, el título de anti-Lewis Y es similar entre los cultivos de alimentación de glutamato y glutamina. La Figura 16 muestra que en los Experimentos 2 y 3, los títulos de anti-Lewis Y son más bajos en los reactores alimentados con glutamina. El título de anti-Lewis Y más bajo que se observa en estos reactores podría deberse a los altos niveles de lactato que se producen, como se muestra en la Figura 17.

20 Los biorreactores que funcionan con glutamato en el medio de alimentación tienen una concentración de amonio más baja (Figura 18) y una menor osmolaridad (Figura 19).

Se utilizó el ensayo ELISA de unión para ensayar la actividad de las muestras de los experimentos Glutamina 1 y Glutamato 1. Las actividades eran similares: el 110 % de la referencia para la muestra de Glutamina 1 y del 122 % de la referencia para la muestra de Glutamato 1 (datos no mostrados).

25 La sustitución de glutamato por glutamina en estos experimentos no tenía un efecto significativo sobre la densidad celular. Sin embargo, la viabilidad celular es menor en los Biorreactores alimentados con glutamina. El amonio, lactato y osmolaridad son menores en los Biorreactores alimentados con glutamato en comparación de los alimentados con glutamina. Como media, el título de anti-Lewis Y es mayor en los Biorreactores alimentados con glutamato y la actividad es esencialmente la misma en ambas condiciones.

Ejemplo 6. Sustitución de glucosa y glutamina en el proceso de cultivo de células anti-Lewis Y

El propósito de este experimento era ensayar los efectos de la sustitución de glucosa y glutamina con los medios de alimentación enumerados en la Tabla 11 a continuación, en el cultivo de células anti-Lewis Y (véase Bogheart y col., Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewis y and eliminates Lewis-positive human carcinoma cells and xenografts, Clin. Can. Res. 10:4538-49 (2004)). Se midieron los niveles de densidad celular, viabilidad celular, título de anti-Lewis Y y amonio.

Materiales y procedimientos

El experimento se llevó a cabo en matraces con agitado de 250 ml con un volumen de partida de 75 ml. Todos los matraces con agitado se sembraron con $0,25 \times 10^6$ células/ml en Medio 2. Los matraces se incubaron a 37 °C en una incubadora con un 7 % de CO₂ durante 14 días. Los días 3 y 4, los matraces se alimentaron con un 5 % por volumen del medio de alimentación Medio 6. La composición del Medio 6 se enumera en la Tabla 11. Los días 5-13 los matraces se alimentaron con un 5 % por volumen de una de las soluciones enumeradas en la Tabla 12. Cada condición se llevó a cabo por duplicado. Las muestras se tomaron diariamente para los recuentos celulares por CEDEX y los ensayos de amonio, glucosa, y lactato.

15

Tabla 11. Composición del Medio 6

Aminoácidos	mg/l	mM	Elementos traza	µg/l	nM
alanina	142,48	1,60	Selenito sódico	40,00	231,35
arginina	1528,84	8,79	CuSO ₄	3,44	21,51
asparagina•H ₂ O	1080,60	7,20	CuSO ₄ •5H ₂ O	7,49	30,00
Ácido aspártico	532,40	4,00	FeSO ₄ •7H ₂ O	2534	9115
cistina•2HCl	473,00	1,51	ZnSO ₄ •7H ₂ O	2704	9421
Ácido glutámico	235,38	1,60	MnSO ₄ •H ₂ O	0,17	1,01
glutamina	4820,00	33,01	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140	492,84
glicina	120,07	1,60	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,24	1,00
histidina•HCl•H ₂ O	588,32	2,80	NH ₄ VO ₃	0,65	5,56
isoleucina	944,52	7,21	NiSO ₄ •6H ₂ O	0,13	0,49
leucina	1360,75	10,39	SnCl ₂ •2H ₂ O	0,12	0,53
lisina•HCl	1456,80	8,00	AlCl ₃ •6H ₂ O	1,20	4,97
metionina	477,06	3,20	AgNO ₃	0,17	1,00
fenilalanina	660,36	4,00	Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	2,55	9,98
prolina	552,31	4,80	KBr	0,12	1,01
serina	1264,70	12,04	CdCl ₂ •2,5H ₂ O	2,28	9,99
treonina	762,02	6,40	CoCl ₂ •6H ₂ O	2,38	10,00
triptófano	260,94	1,28	CrCl ₃	0,32	2,02
tirosina•2Na•2H ₂ O	832,62	3,19	NaF	4,20	100,02
valina	749,21	6,40	GeO ₂	0,53	5,07
			KI	0,17	1,02

(continuación)

Vitaminas	mg/l	mM	RbCl	1,21	10,01
biotina	3,28	0,01	ZrOCl ₂ •8H ₂ O	3,22	9,99
Pantotenato cálcico	36,02	0,08			
Cloruro de colina	143,28	1,03	Otros componentes	µg/l	nM
Ácido fólico	42,43	0,10	Hidrocortisona	288	0,79
inositol	201,71	1,12	Putrescina•2HCl	8000	49,66
nicotinamida	32,02	0,26	Ácido linoleico	336,25	1,20
piridoxina•HCl	32,82	0,16	Ácido tióctico	840,63	4,08
riboflavina	3,60	0,01			
tiamina•HCl	35,22	0,10	Otros Componentes	mg/l	mM
vitamina B12	11,21	0,01	D-glucosa (Dextrosa)	33005,99	183,37
			PVA	2400,00	
Sales inorgánicas	mg/l	 mM	Nucellin™	80,00	
KH ₂ PO ₄	1635,00	12,02			
MgSO ₄ •7H ₂ O	171,98	0,70			

Tabla 12. Alimentaciones los días 5-13. Medio 6 modificado que no contiene glucosa ni glutamina

GluGln	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 4,82 g/l glutamina (control)
Glu	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 4,82 g/l glutamato
GluAsp	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 4,36 g/l asparagina
GluGlyGln	Medio 6 modificado + 43 g/l glucosa + 6,71 g/l glicilglutamina
GluGlu	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 4,82 g/l glutamina
GalGlu	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 4,82 g/l glutamato
GalGln	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 4,36 g/l asparagina
GalGlyGln	Medio 6 modificado + 43 g/l galactosa + 6,71 g/l glicilglutamina
GalAsp	Medio 6 + 43 g/l glucosa

5 Resultados y conclusiones

La densidad celular más alta se vio cuando el glutamato o glicilglutamina se sustituían por glutamina en presencia de glucosa o galactosa en el medio de alimentación. La densidad celular era en general menor en los cultivos de alimentación con glucosa/glutamina, galactosa/glutamina, o solo glucosa (Figura 20). La viabilidad final más alta era la de los cultivos de alimentación con solo glucosa, seguida por los cultivos de alimentación con glucosa/glutamato. La viabilidad más baja se vio en los cultivos de alimentación de glutamina o asparagina, combinada con glucosa o galactosa (Figura 21).

El título del día 14 era más alto en los cultivos de alimentación de glucosa/glicilglutamina y glucosa/glutamato a aproximadamente 700 µg/ml. El título era más bajo en los cultivos de alimentación de galactosa/glicilglutamina y galactosa/asparagina a aproximadamente 500 µg/ml. El título en el control de glucosa/glutamina era aproximadamente de 570 µg/ml (Figura 22).

Los niveles más bajos de amonio se vieron en los matraces alimentados con glucosa/glutamato o solo glucosa. Los matraces alimentados con galactosa/glutamina, glucosa/glutamina, glucosa/glicilglutamina, y glucosa/asparagina

mostraban niveles intermedios de amonio. Los matraces alimentados con galactosa/asparagina, galactosa/glicilglutamina, y galactosa/glutamina tenían los niveles más altos de amonio (Figura 23).

Los niveles de glucosa se mantenían por encima de 1 g/l en todos los matraces alimentados con galactosa hasta el día 11. A partir del día 11 hasta el día 14, la glucosa en estos cultivos no se llegaba a agotar completamente, permaneciendo entre 0,6 y 1 g/l, sin diferencias significativas entre los diferentes cultivos.

Los niveles de glucosa aumentaban en todos los matraces alimentados con glucosa o glucosa combinada con otro sustrato hasta el día 10. A partir del día 10 hasta el día 14 en estos cultivos, los niveles de glucosa se mantenían prácticamente constantes y similares entre ellos. El día 14 permanecían aproximadamente 8,4 g/l de glucosa en los cultivos alimentados con glucosa/glutamato y permanecían aproximadamente 10,8 g/l de glucosa en los cultivos alimentados solo con glucosa.

Los niveles de lactato alcanzaban una cantidad de aproximadamente 2,4 g/l el día 5, cuando las condiciones eran las mismas para todas las células, y caían hasta esencialmente cero en todos los cultivos sobre el día 14. Los niveles de lactato eran mayores desde el día 10 hasta el día 14 en el control de glucosa/glutamina, pero estaban por debajo de 1 g/l durante este periodo (datos no mostrados).

Todas las condiciones que se ensayaron en este experimento daban como resultado una mayor densidad celular que en condiciones de control de glucosa/glutamina. Todas las condiciones ensayadas excepto la condición de galactosa/asparagina daban como resultado una viabilidad final más alta que con la condición de alimentación de control de glucosa/glutamina o la de galactosa/glutamina. El título en el control de glucosa/glutamina era aproximadamente 570 µg/ml en comparación con el más alto de aproximadamente 700 µg/ml en la condición de alimentación de glucosa/glicilglutamina y la condición de alimentación glucosa/glutamato.

Ejemplo 7. Evaluación de un Proceso discontinuo con privación de glutamina para la producción de anti-GDF-8

Los procedimientos de producción semi-continuos típicos necesitan múltiples alimentaciones durante el periodo de cultivo. Estas alimentaciones se diseñan para remplazar nutrientes en el medio que se hayan agotado por las células, o se hayan podido degradar durante el lote. Estas alimentaciones, cuando el proceso se aumenta de escala para utilizarse en reactores más grandes, crean complicaciones, tales como la necesidad de un salto impulsor (véase la Figura 24). Además, las alimentaciones diluyen la cantidad del anti-GDF-8 ya secretado en el cultivo y por lo tanto afectan al título de recolección. El uso de un proceso discontinuo permitiría la inoculación del biorreactor a volumen completo en vez de un volumen parcial, de manera que se incluyeran las alimentaciones, eliminándose la necesidad de un salto impulsor y reduciría enormemente cualquier efecto de dilución de la productividad.

La glutamina es una de las razones más importantes por las que se utiliza una estrategia semi-continua ya que no es estable a 37 °C y se ha pensado que es necesario que se reponga durante un cultivo discontinuo. Sin embargo, los resultados de los Ejemplos 2, 5, y 6, en los que se ensayó una estrategia de privación de glutamina, demuestran un aumento significativo de productividad en comparación con un reactor de control que se alimentaba con glutamina. Este resultado se combinó con el proceso discontinuo para crear el proceso discontinuo con privación de glutamina que se ensayó en este Ejemplo.

Materiales y procedimientos

Las células anti-GDF-8 se cultivaron en Biorreactores de 1 l durante 12 días de acuerdo con las siguientes cuatro condiciones de cultivo. Los parámetros del biorreactor para todas las condiciones se mantuvieron iguales. El oxígeno disuelto se mantuvo a no menos de un 23 % de saturación de aire mediante aireación con aire y el pH se mantuvo a 7,0 por la adición de una solución que contenía bicarbonato sódico a 0,58 M y carbonato sódico a 0,71 M. La temperatura de todos los cultivos se mantuvo a 37 °C durante los primeros cuatro días del lote. El cuarto día del lote, la temperatura de todos los biorreactores se bajó a 31 °C y se mantuvo en este punto durante la duración del lote. El control y los cultivos semi-continuos se alimentaron con un 8 %, 12 % y 8 % del volumen total del reactor con sus medios de alimentación respectivos los días 5, 7, y 10, respectivamente.

1) Control

- Medio de inoculación Medio 7 (véase la Tabla 13).
- Medio de alimentación 8, alimentación el día 5, 7, y 10 (véase la Tabla 13).
- Alimentación de 5 mM de glutamina el día 4.
- Bajada de temperatura a 31 °C el día 4.

2) Semi-continuo con privación de glutamina.

- Medio de inoculación Medio 7 con solamente 4 mM de glutamina (véase la Tabla 13).
- Medio de alimentación 8 sin glutamina, alimentación los días 5, 7, y 10 (véase la Tabla 13).
- Sin alimentación de glutamina el día 4.
- Disminución de la temperatura a 31 °C el día 4.

3) Privación de glutamina en discontinuo

- Medio de inoculación nuevo medio discontinuo con solamente 4 mM de glutamina (véase la Tabla 13).
- Sin Medio de alimentación.

- Sin alimentación con glutamina.

- 5 - Disminución de la temperatura a 31 °C el día 4.
- Adición de 5 g/l de glucosa el día 8.

4) Lote de privación de glutamina suplementado el día 8.

- Medio de inoculación nuevo medio discontinuo con solamente 4 mM de glutamina (véase la Tabla 13).
- Sin Medio de alimentación.

10 - Sin alimentación con glutamina.

- Disminución de la temperatura a 31 °C el día 4.

- Adición de 4 g de glucosa, 375 mg de asparagina, 3 ml materia prima de FeSO₄ 1 mM, 3,33 ml de Nucellin™ a 5 g/l, 2,57 ml de hidrocortisona a 36 mg/l y 1,0 g/l de materia prima de putrescina, 0,23 ml de materia prima de Selenito sódico a 50 mg/l, y 13,1 mg de tiamina el día 8.

15

Tabla 13. Composiciones de medios que se utilizan.

	PM	Medio 7	Medio 8	Medio discontinuo
Aminoácidos		mM	mM	mM
L-Alanina	89,0	1,08	2,4	0,2
L- Arginina	174,0	6,84	13,2	4
L-Asparagina•H ₂ O	150,0	4,76	21,4	7,5
Ácido l-Aspártico	133,0	2,40	6	1,65
L-Cisteína•HCl• H ₂ O	176,0	0,40	0	0,4
L-Cistina•2HCl	313	0,95	1,875	1
Ácido L-Glutámico	147,0	1,08	2,4	1,08
L-Glutamina	146,0	13,00	37,5	4
Glicina	75,0	1,28	2,4	1,54
L -Histidina•HCl•H ₂ O	210,0	1,76	4,2	1,76
L-isoleucina	131,0	4,76	10,8	2,83
L-leucina	131,0	6,52	15,6	4,7
Lisina•HCl	182,0	5,20	12	5,2
L-Metionina	149,0	1,96	4,8	2,6
L-fenilalanina	165,0	2,60	6	2,2
L-prolina	115,0	3,24	7,2	4,1
L-serina	105,0	8,60	18	8,6
L-treonina	119,0	4,32	9,6	3,2
L-triptófano	204,0	0,78	1,92	1,04
L-tirosina 2Na•2H ₂ O	261,0	2,16	4,8	1,75
L-valina	117,0	4,32	9,6	4

(continuación)

Vitaminas		uM	uM	uM
Biotina	244,0	8,31	20,4	11
D-Pantotenato cálcico	476,0	46,06	112,8	46,06
Cloruro de colina	139,0	632,2	1548	840
Ácido fólico	441,0	58,8	144	58,8
l-inositol	180,0	686	1680	911
nicotinamida	122,0	161,7	396	215
piridoxina•HCl	206,0	88,15	240	88
piridoxal•HCl	203,0	10	0	10
riboflavina	376,0	5,37	13,2	1,1
tiamina•HCl	337,0	63,7	274,7	117
vitamina B12	1355,0	4,9	12	7,8
Sales inorgánicas				
NaCl	58,5	18,8 mM		
KCl	74,6	4,2 mM		4,19 mM
CaCl ₂	111	1,05 mM		1,05 mM
Selenito sódico	173	27 ug/l	60 ug/l	60 ug/l
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	142	4,68 mM	11 mM	4,68 mM
Na ₂ HPO ₄	138	0,5 mM		0,3986 mM
MgSO ₄	120	1,15 mM	1,05 mM	1,15 mM
MgCl ₂	95	0,3 mM		0,3 mM
FeSO ₄ •7H ₂ O	278	9 uM	24,675 uM	9 uM
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	404	0,125 uM		0,124 uM
ZnSO ₄ •7H ₂ O	287	9,2 uM	17 uM	9,2 uM
CuSO ₄	160	0,05 uM	0,074 uM	0,064 uM
NaHCO ₃	84	23,8 mM		23,8 mM
Otros				
Glucosa	180	16 g/l	38,3 g/l	15 g/l
Alcohol polivinílico		2,56 g/l	2,4 g/l	2,56 g/l
Hidrocortisona	363	0,23 mg/l	0,43 mg/l	0,28 mg/l
Putrescina•2HCl	161	6,4 mg/l	12 mg/l	7,7 mg/l
Piruvato sódico	110	500 uM		500 uM
Ácido linoleico	280	0,81 uM	1,8 uM	0,81 uM
Ácido tióctico	206	2,7 uM	6 uM	2,7 uM
Nucellin™		54 mg/l	120 mg/l	50 mg/l
1000x Traza B		1,5 ml/l	6,75 ml/l	1,5 ml/l

Resultados y conclusiones

El crecimiento celular de los primeros 4 días era similar en el control y los procesos discontinuos, mientras que el proceso semi-continuo con privación de glutamina tenía ligeramente menor densidad celular y permanecía un poco más bajo en el resto de los lotes. Ambos procesos discontinuos mantenían densidades celulares más altas durante la duración del lote, probablemente debido a la falta de una dilución significativa (véase la Figura 25). Las viabilidades de todos los cultivos eran las mismas hasta el día 8. Sin embargo, es interesante señalar que el día 11, la viabilidad del proceso discontinuo que no se había suplementado era menor que en los otros tres biorreactores y terminaba significativamente menor en el último día. Esto sugiere que el medio discontinuo podía optimizarse más ya que el proceso discontinuo suplementado tenía una viabilidad que era la misma que los biorreactores semi-continuos (véase la Figura 26).

Las células cultivadas en un proceso discontinuo con privación de glutamina o en el proceso semi-continuo con privación de glutamina conseguían mejores resultados que las mismas células cultivadas en el proceso semi-continuo de control en cuanto a la productividad. El proceso semi-continuo de control tenía un título de recolección al día de 685 mg/ml, como se esperaba, mientras que el proceso semi-continuo con privación de glutamina tenía un título de recolección de 1080 mg/ml, aproximadamente un 58 % más alto que el control. Esto es similar a los resultados que se veían anteriormente. El proceso discontinuo no suplementado con privación de glutamina tenía un título de recolección al día de 960 mg/ml, un 40 % más alto que el control, similar al proceso semi-continuo con privación de glutamina, mientras que el proceso discontinuo con privación de glutamina suplementado tenía el título más alto con 1296 mg/ml. Esto es un 89 % de aumento por encima del control (véase la Figura 27).

Cuando los niveles inhibidores de las cuatro condiciones se analizaron, los resultados mostraban que los niveles de lactato y amonio para los tres procesos con privación de glutamina eran significativamente menores que el control. De hecho, tras el día 4, las tres condiciones o paraban de producir o comenzaban a consumir lactato mientras que el control continuaba produciendo lactato a lo largo del lote (véase la Figura 8). Como se esperaba, los niveles de amonio eran mucho más bajos en el proceso de privación de glutamina y declinaban tras el día 4, mientras que el control continuaba produciendo amonio (véase la Figura 29).

En este Ejemplo, la combinación de un proceso discontinuo con una estrategia de privación de glutamina daba como resultado una mejora del 40 % en la productividad sobre el proceso semi-continuo de control para las células anti-GDF-8. Los datos sugieren también que con alguna optimización del medio discontinuo, se puede alcanzar al menos una mejora de 2 veces en la productividad. Esta mejora en la productividad se puede atribuir a dos factores. Primero, la privación de glutamina aumenta la productividad directamente o manteniendo los niveles de amonio y lactato muy bajos. Segundo, debido a la ausencia de alimentaciones, el título no se diluye durante el lote. El aumento de productividad junto con la facilidad de operación inherente al proceso discontinuo hace que sea una opción atractiva para producir polipéptidos recombinantes.

Ejemplo 8. Efectos de las concentraciones de glutamina y asparagina en un medio discontinuo sobre el proceso de cultivo de células anti-GDF-8

En los Ejemplos 2, 5 y 6, se había demostrado que la privación de glutamina confería beneficios sobre los cultivos semi-continuos en dos líneas celulares, incluyendo el aumento del crecimiento celular, la viabilidad celular y el título así como la disminución de producción de lactato y amonio. La asparagina también parece que tiene un papel en los medios discontinuos.

Materiales y procedimientos

Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en Biorreactores de 1 l en Medio 9 modificado con diferentes concentraciones de glutamina y asparagina. La composición del Medio 9 básico se enumera en la Tabla 14. Las variaciones experimentales de esta composición básica se enumeran en la Tabla 15. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante los primeros 5 días con la excepción del Reactor 4 cuya temperatura era de 30 °C durante el primer día debido a problemas con el control de temperatura. Los cultivos se cambiaron a 31 °C el día 6. El día 7, los cultivos se alimentaron una vez con un 5 % por volumen de Medio 5 que carecía de glutamina. Los cultivos se midieron diariamente en cuanto a densidad celular, título de anti-GDF-8, niveles de lactato y amonio.

Tabla 14. Composición del Medio 9

Aminoácidos	mg/l	mM	Elementos traza	µg/l	nM
alanina	17,80	0,20	Selenito sódico	69,16	400,00
arginina	696,00	4,00	Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	50,00	123,76
asparagina•H ₂ O	3000,00	20,00	CuSO ₄	10,24	64,00
Ácido aspártico	219,45	1,65	CuSO ₄ •5H ₂ O	99,88	400,00

(continuación)

Aminoácidos	mg/l	mM	Elementos traza	µg/l	nM
Cisteína•HCl•H ₂ O	70,40	0,40	FeSO ₄ •7H ₂ O	4170	15000
Cisteína•2HCl	468,75	1,50	ZnSO ₄ •7H ₂ O	2640	9200
Glutamato monosódico	33,80	0,20	MnSO ₄ •H ₂ O	33,80	200,00
glutamina	584,00	4,00	Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	284,07	1000
glicina	115,50	1,54	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	247,20	200,00
Histidina•HCl•H ₂ O	474,60	2,26	NH ₄ VO ₃	2,34	20,00
isoleucina	570,73	4,36	NiSO ₄ •6H ₂ O	5,26	20,00
leucina	1030,70	7,87	SnCl ₂ •2H ₂ O	0,90	4,00
Lisina•HCl	1401,40	7,70	AlCl ₃ •6H ₂ O	0,97	4,00
metionina	387,40	2,60	KBr	0,48	4,00
fenilalanina	507,00	3,07	CrCl ₃	15,83	100,00
prolina	539,50	4,69	NaF	0,17	4,00
serina	1052,00	10,02	GeO ₂	0,42	4,00
treonina	564,80	4,75	KI	33,20	200,00
triptófano	274,16	1,34	RbCl	0,48	4,00
Tirosina•2Na•2H ₂ O	745,75	2,86	H ₃ BO ₃	12,37	200,00
valina	749,00	6,40	LiCl	0,17	4,00
Vitaminas	mg/l	mM	Otros componentes	µg/l	nM
biotina	2,68	0,01	Hidrocortisona	540,00	1,49
Pantotenato cálcico	21,92	0,05	Putrescina•2HCl	15000	93,11
Cloruro de colina	158,46	1,14	Ácido linoleico	290,00	1,04
Ácido fólico	25,93	0,06	Ácido tióctico	716,00	3,48
inositol	163,98	0,91			
nicotinamida	26,23	0,22	Otros componentes	mg/l	mM
Piridoxal•HCl	2,03	0,01	D-glucosa (Dextrosa)	15000,00	83,33
piridoxina•HCl	36,13	0,18	PVA	2560,00	
riboflavina	2,41	0,01	Nucellin™	50,00	
Tiamina•HCl	39,43	0,12	Piruvato sódico	55,00	0,50
vitamina B12	21,17	0,02			

(continuación)

Sales inorgánicas	mg/l	mM	
CaCl ₂	116,55	1,05	
KCl	312,90	4,19	
Na ₂ HPO ₄	56,60	0,40	
NaCl	1100,00	18,80	
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	645,84	4,68	
MgSO ₄	138,00	1,15	
MgCl ₂	28,50	0,30	
NaHCO ₃	2000,00	23,81	

Tabla 15. Condiciones de glutamina y asparagina ensayadas

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Línea celular	anti-GDF-8					
Medio	Medio discontinuo (Medio 9)					
Niveles de Glutamina	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM	4 mM	4 mM
Niveles de Asparagina	8 mM	12 mM	20 mM	8 mM	12 mM	20 mM
Densidad de siembra (x10 ⁶ /ml)	0,3 a 0,35					
Medio de alimentación	Medio 5-Glutamina, 5 % el día 7					
Días de cultivo	12					
Cambio de temperatura (37-31 °C)	Día 6	Día 6	Día 6	Día 5	Día 5	Día 4

5 Resultados y conclusiones

Las Figuras 30, 31, 32, y 33 muestran el crecimiento de las células anti-GDF-8, título de anti-GDF-8, niveles de lactato y amonio, respectivamente, a lo largo del curso de los experimentos en distintas condiciones experimentales.

En todas las condiciones experimentales, 4 mM de glutamina es mejor que 1 mM de glutamina en todos los niveles de asparagina ensayados. A niveles de glutamina comparables, las condiciones de 12 mM y 20 mM de asparagina son mejores que 8 mM. La disminución de los niveles de lactato y NH₄ se observó al final del cultivo en todas las condiciones ensayadas.

Ejemplo 9. Efectos de las concentraciones de glutamina y asparagina en medio discontinuo sobre el proceso de cultivo de células anti-GDF-8

En el Ejemplo 8 se demostró que el Medio 9 contenía una concentración inicial de 4 mM de glutamina actúa mejor que el medio que contenía 1 mM de glutamina, independientemente de los niveles de asparagina. Este ejemplo demuestra el efecto del medio que contiene niveles de glutamina 13 mM y distintos niveles de asparagina.

Materiales y procedimientos

Las células anti-GDF-8 se cultivaron durante doce días en Biorreactores de 1 l en Medio 9 modificado con diferentes concentraciones de glutamina y asparagina como se enumera en la Tabla 16. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante los primeros 3 días. Los cultivos se cambiaron entonces a 31 °C el día 4. El día 7, los cultivos se alimentaron una vez con un 5 % por volumen del Medio 5 que carecía de glutamina. Los cultivos se midieron periódicamente en cuanto a la densidad celular, viabilidad celular, niveles de lactato, amonio y niveles de glutamina, título de anti-GDF-8, y osmolaridad.

Tabla 16. Condiciones de glutamina y asparagina ensayadas

	Reactor 1	Reactor 2	Reactor 3	Reactor 4	Reactor 5	Reactor 6
Línea celular	anti-GDF-8					
Medio	Medio discontinuo (Medio 9)					
Niveles de Glutamina	4 mM	4 mM	13 mM	13 mM	13 mM	13 mM
Niveles de Asparagina	20 mM	20 mM	20 mM	12 mM	12 mM	8 mM
Densidad de siembra ($\times 10^6/\text{ml}$)	0,3 a 0,35					
Medio de alimentación	Medio 5-Glutamina, 5 % el día 7					
Días de cultivo	12					
Cambio de temperatura (37-31 °C)	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4	Día 4

Resultados y conclusiones

Las Figuras 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 muestran el crecimiento celular de las células anti-GDF-8, el porcentaje de viabilidad de las células anti-GDF-8, los niveles de lactato, los niveles de amonio, niveles de glutamina, título de anti-GDF-8, y osmolaridad, respectivamente, a lo largo del curso de los experimentos en distintas condiciones experimentales.

Entre todas las condiciones ensayadas, solamente el Medio 9 que contenía 13 mM de glutamina y 20 mM de asparagina mostraba efectos secundarios adversos significativos sobre el crecimiento celular y el título. La glutamina se agotó en todos los cultivos a aproximadamente el mismo tiempo, independientemente de si el cultivo comenzaba con 4 mM o 13 mM de glutamina. El título de anti-GDF-8 más alto se obtenía en cultivos que contenían 13 mM de glutamina y 12 mM de asparagina. Todas las condiciones de cultivo presentaban una disminución de los niveles de lactato y amonio cerca del final del cultivo. Los niveles más altos de amonio en el cultivo eran los del cultivo que contenía 13 mM de glutamina y 20 mM de asparagina.

Ejemplo 10. Efecto de los niveles de asparagina y cisteína sobre la disminución que se observa en los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

En los Ejemplos 2, 5, y 6, se descubrió que los cultivos que se cultivaban en condiciones de privación de glutamina presentaban una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Sin embargo, los cultivos que se cultivaban en Medio 9 en condiciones de no privación de glutamina siguen presentando una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo. Este efecto no se observaba en otros medios tales como el Medio 1, en el que la privación de glutamina parece necesaria para disminuir los niveles de lactato y amonio. El Medio 9 y el Medio 1 se diferencian en los niveles de asparagina (20 mM en el Medio 9 frente a 11 mM total en el Medio 1 más la alimentación) y cisteína ácida (1,5 mM en el Medio 9 frente a 0,95 mM en el Medio 1). Este ejemplo ensaya si estos dos componentes eran responsables de la disminución que se observaba en los niveles de lactato y amonio al final del cultivo.

Materiales y procedimientos

Las células anti-GDF-8 se cultivaron en BioReactores de 1 l durante 12 días. Las células se cultivaron inicialmente a 37 °C y se cambiaron a 31 °C el día 4 o día 5 a 8-10 x 10⁶/ml. La Tabla 17 enumera las distintas condiciones experimentales que se ensayaron. Las muestras se tomaron diariamente y se guardaron para el análisis de título por HPLC de Proteína A.

Tabla 17. Condiciones de asparagina y cisteína ensayadas

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Gln Total (mM)	Asn Total (mM)	Alimentación	
Medio 1	13	5	29	11	Medio 5, 30 % total	
						5 mM Gln, día 4
					Medio 5-Gln, 30 % total	

(continuación)

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Gln Total (mM)	Asn Total (mM)	Alimentación	
Medio 1	4	5	4	11		
					Medio 5-Gln, 5 % día 7	
Medio discontinuo (Medio 9)	4	20	4	21		
Medio 1+ 5 mM Asn + 0,5 mM Cisteína	13	10	29	16	Medio 5, 30 % total	5 mM Gln, día 4
Medio discontinuo (Medio 9)	13	20	29	21	Medio 5, 30 % total	5 mM Gln, día 4
Nota: Medio 5-Gln = Medio 5 que carece de glutamina.						

Resultados y conclusiones

- Las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9 presentaban una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo, independientemente de si los cultivos se iniciaban con 4 mM o 13 mM de glutamina (véase las Figuras 42 y 43). Por el contrario, en Medio 1 solo presentaba la disminución de lactato y amonio al final del proceso de cultivo cuando los cultivos se iniciaban con 4 mM de glutamina (véase las Figuras 42 y 43). La adición de asparagina y cistina extra al Medio 1 que contenía 13 mM de glutamina no daba como resultado la disminución de los niveles de amonio y lactato al final del proceso de cultivo (véase las Figuras 42 y 43).
- También se observó que los cultivos que presentaban una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (Medio 1 con 4 mM de glutamina, Medio 9 con 4 mM de glutamina y Medio 9 con 13 mM de glutamina) tenían una osmolaridad total menor al final del proceso de cultivo (véase la Figura 47).
- El Medio 9 con 4 mM de glutamina presentaba el título de anti-GDF-8 más alto, seguido por el Medio 9 con 13 mM de glutamina alimentado el día 4 (véase la Figura 46). Teniendo en cuenta el efecto de la dilución por la alimentación, el Medio 9 que contenía 4 mM de glutamina tenía un título de anti-GDF-8 equivalente al Medio 9 que contenía 13 mM de glutamina.
- Ejemplo 11. El efecto de los niveles de aminoácidos y vitaminas sobre la disminución observada de los niveles de lactato y amonio en células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9**
- En el Ejemplo 10 se ensayó si la diferencia en los niveles de asparagina y cisteína entre el Medio 1 y el Medio 9 era responsable de la disminución observada en los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo en el Medio 9 que no se había privado de glutamina. Se determinó que estos factores no eran responsables de la disminución que se observaba. El Medio 1 y el Medio 9 también se diferencian en sus concentraciones de aminoácidos y vitaminas. Este ejemplo ensaya si las diferencias en las concentraciones de aminoácidos y vitaminas entre estos dos medios eran las responsables de la disminución que se observaba.
- Materiales y procedimientos**
- Las células anti-GDF-8 se cultivaron en BioReactores de 1 l durante 12 días. Las células se cultivaron inicialmente a 37 °C y se cambiaron a 31 °C el día 4 a 8-10 x 10⁶/ml. La Tabla 18 enumera las distintas condiciones experimentales que se ensayaron. Se añadieron aminoácidos, vitaminas, hidrocortisona y putrescina, elementos traza E (composición enumerada en la Tabla 19) y hierro a las distintas condiciones experimentales de Medio 1 de manera que los niveles de estos componentes eran iguales a los niveles del Medio 9. Las muestras se tomaron diariamente y se guardaron para los análisis del título por Proteína A HPLC.

Tabla 18. Condiciones de aminoácidos y vitaminas ensayadas

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Alimentación	Día 5	Día 7	Día 10	Día 11
Medio 1	13	5	Medio 5 30 % total	8 %	12 %	8 %	
			5 mM Gln, día 4	Medio 5	Medio 5	Medio 5	
Medio 1+AA Medio 1+ Vit,H/P,E,Fe	13	15	Medio 5 30 % total	8 %	12 %	8 %	
			5 mM Gln, día 4	Medio 5	Medio 5	Medio 5	
Medio 1 + todos Medio 9 con 13 mM Gln	13	15	Medio 5 30 % total	8 %	12 %	8 %	4 g/l glucosa
			5 mM Gln, día 4	Medio 5	Medio 5	Medio 5	4 g/l glucosa
Nota: AA = Aminoácidos, H/P = 0.036 mg/ml hidrocortisona, 1.08 mg/ml Putrescina•2HCl, E: Elementos Traza E.							

Tabla 19: Composición de Elementos traza E

Elementos Traza	µg/l	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	123,60	100,00
AlCl ₃ •6H ₂ O	0,48	2,00
H ₃ BO ₃	6,18	100,00
CrCl ₃	7,92	50,00
CuSO ₄ •5H ₂ O	49,94	200,00
GeO ₂	0,21	2,00
KBr	0,24	2,00
KI	16,60	100,00
LiCl	0,08	2,00
MnSO ₄ •H ₂ O	16,90	100,00
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	142,03	500,00
NaF	0,08	2,00
NH ₄ VO ₃	1,17	10,00
NiSO ₄ •6H ₂ O	2,63	10,00
RbCl	0,24	2,00
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,45	2,00
Selenito sódico	34,58	200,00

5 Resultados y conclusiones

Todas las condiciones que se ensayaron presentaban una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo excepto en el Medio 1 que contenía aminoácidos añadidos, indicando que el aumento de niveles de aminoácidos en el Medio 9 en comparación con el Medio 1 no son responsables de la disminución de los niveles de lactato y amonio (véase las Figuras 49 y 50). Sin embargo el Medio 1 que contenía vitaminas, hidrocortisona y putrescina, elementos traza E y hierro añadidos presentaba niveles más bajos de lactato y amonio al final del proceso de cultivo en comparación con el Medio 1 que contenía aminoácidos añadidos (véase las Figuras 49 y 50). Esto indica que estos componentes pueden ser responsables de la disminución que se observaba en el Medio 9.

Los cultivos que se cultivaron en Medio 1 que contenía vitaminas, hidrocortisona, y putrescina, elementos traza E y hierro añadidos presentaban los niveles más bajos de amonio a lo largo del experimento debido a la menor cantidad total de asparagina y glutamina en el medio de partida (véase la Figura 50).

Ejemplo 12. Efecto de los niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro en la disminución de los niveles de lactato y amonio que se observa en las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

En el Ejemplo 11, se determinó que el aumento de los niveles de vitaminas, hidrocortisona y putrescina, elementos traza E y hierro en el Medio 9 con respecto al Medio 1 podía ser responsable de la disminución de los niveles de lactato y amonio que se observa al final del proceso de cultivo. Aquí, estos componentes se ensayaron individualmente y en combinación, para determinar cuál, si había alguno, era el responsable de la disminución que se observaba.

Materiales y procedimientos

Las células anti-GDF-8 se cultivaron en BioReactores de 1 l durante 12 días. Las células se cultivaron inicialmente a 37 °C y se cambiaron a 31 °C el día 4 a 8-10 × 10⁶ células/ml. La Tabla 20 enumera las distintas condiciones experimentales ensayadas. La hidrocortisona y putrescina se añadieron en todas las condiciones del Medio 1 de manera que los niveles de estos componentes eran iguales a los niveles en el Medio 9. Las vitaminas, elementos traza E (composición enumerada en la Tabla 19) y el hierro se añadieron a distintas condiciones experimentales del Medio 1 de manera que los niveles de estos componentes eran iguales a los niveles en el Medio 9. Las muestras se tomaron diariamente y se guardaron para el análisis de título por Proteína A HPLC.

Tabla 20. Condiciones de aminoácidos y vitaminas ensayadas

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Alimentación	Cambio de temperatura	Día 4	Día 5	Día 7	Día 10
Medio 1+Fe	13	15	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio
Medio 1+E	13	15	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio
Medio 1+Vit	13	15	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio
Medio 1+Fe+E	13	15	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio
Medio 1+Fe+Vit	13	15	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio
Medio 1+E+Vit	13	15	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio
Medio 9 con 13 mM Gln	13	20	Medio 5 30 % total	día 4	5 mM Gln, día 4	8 % Medio 5	12 % Medio 5	8 % Medio

Nota: E: Elementos Traza E.

Resultados y conclusiones

De todas las condiciones ensayadas, solamente el Medio 9 que contenía 13 mM de glutamina y el Medio 1 que contenía elementos traza E presentaban una disminución de los niveles de lactato y amonio al final del proceso de cultivo (véase las Figuras 54 y 55). Debería señalarse que la disminución de niveles que se observa en el Medio 1 que contiene elementos traza E podría ser debida al hecho de que la temperatura de este cultivo se cambió cuando las células estaban a aproximadamente 6 × 10⁶ células/ml.

El Medio 9 que contenía 13 mM de glutamina presentaba un mayor título de anti-GDF-8 que cualquiera de las formulaciones del Medio 1.

Ejemplo 13. Comparación de los Medios 1, 3, y 9 sobre el crecimiento celular y el título de anti-GDF-8

Este experimento se llevó a cabo para medir las diferencias de crecimiento celular y de título de anti-GDF-8 utilizando los Medios 1, 3 y 9.

Materiales y procedimientos

Las células anti-GDF-8 se cultivaron en varios medios y en condiciones de alimentación como se enumera en la Tabla 21. La información pertinente de los medios se enumera en la Tabla 22. Las células se cultivaron en BioReactores de 1 l durante 12 días y se cambiaron de 37 °C a 31 °C el día 4.

5

Tabla 21. Condiciones de medios y alimentación ensayadas

			Alimentación							
Medio	Asn	Gln	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11	
Medio 3	14 mM	4 mM	3,3 % Medio 5-Gln	10 % Medio 5-Gln	3,3 % Medio 5-Gln	3,3 % Medio 5-Gln				
Medio 3	14 mM	4 mM	3,3 % Medio 5-Gln	10 % Medio 5-Gln	3,3 % Medio 5-Gln	3,3 % Medio 5-Gln				
Medio 1	14 mM	4 mM			8 % Medio 5-Gln		12 % Medio 5-Gln	8 % Medio 5-Gln		
Medio 9	20 mM	4 mM				5 % Medio 5-Gln				

Nota: Medio 5-Gln - Medio 5 que carece de glutamina.

Tabla 22. Sumario de medios

Medio	Asn	Gln	Alimentación	AA(de partida)/(Total)	Ion/Total AA
Medio 3	14 mM	4 mM	34 % Medio 5-Gln	34 mM / 64 mM	1,75
Medio 9	20 mM	4 mM	5 % Medio 5-Gln	91,4 mM / 94,3 mM	0,72
Medio 1	14 mM	4 mM	31,6 % Medio 5-Gln	78 mM / 96,4 mM	0,74

Nota: Medio 5-Gln - Medio 5 que carece de glutamina.

Resultados y conclusiones

- 10 Las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9 presentaban la densidad celular y título de anti-GDF-8 más altos, mientras que las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 3 presentan la densidad celular y título de anti-GDF-8 más bajos (véase las Figuras 57 y 58). El hecho de que el Medio 9 produzca resultados superiores que el Medio 1 indica que es mejor proporcionar los componentes del medio en el medio de partida que suplementarlos por medio de alimentaciones múltiples. Adicionalmente, el hecho de que tanto el Medio 1 como el Medio 9 actúan mejor que el Medio 3 indica que proporcionando aminoácidos en concentraciones mayores de aproximadamente 70 mM se proporcionan mejores resultados que proporcionando aminoácidos en concentraciones menores de 70 mM. Finalmente, proporcionando aminoácidos en concentraciones mayores de 70 mM en los medios de partida dan como resultado mayores densidades celulares y títulos (compárese el Medio 9 vs. Medio 1).
- 15

Ejemplo 14. Análisis estadístico de niveles de glutamina y asparagina totales óptimos en Medio 9 para el cultivo de células anti-GDF-8 en Biorreactores

Materiales y procedimientos

- 20 Las células anti-GDF-8 se cultivaron en Biorreactores de 1 l y se cambiaron de 37 °C a 31 °C los días indicados en la Tabla 23. Los títulos finales se sometieron a un ensayo T con el fin de determinar el nivel óptimo de glutamina sola y el nivel óptimo de glutamina y asparagina totales combinadas. La Tabla 23 resume algunas condiciones experimentales relevantes y los resultados finales para el cultivo de células anti-GDF-8 en Medio 9.
- 25

Tabla 23. Condiciones experimentales relevantes y resultados finales para las células anti-GDF-8 cultivadas en Medio 9

Medio	Gln (mM)	Asn (mM)	Día de cambio	Alimentación	Título (ug/ml)	Título/1200	Total Gln	Total Asn	Total
Medio 9	1	8	6	5 % Medio 5-Gln	615,2	0,51	1	9	
Medio 9	1	8	6	5 % Medio 5-Gln	857,1	0,71	4	9	
Medio 9	1	12	6	5 % Medio 5-Gln	947	0,79	1	13	
Medio 9	4	12	4	5 % Medio 5-Gln	1184	0,99	4	13	
Medio 9	4	20	4	5 % Medio 5-Gln	769,6	0,64	1	21	
Medio 9	4	8	5	5 % Medio 5-Gln	1262,6	1,05	13	9	
Medio 9	4	20	4	5 % Medio 5-Gln	1198	1,00	4	21	
Medio 9	4	20	4	5 % Medio 5-Gln	1321,1	1,10	4	21	
Medio 9	4	20	4	5 % Medio 5-Gln	1162,4	0,97	4	21	
Medio 9	13	20	4	5 % Medio 5-Gln	1436,6	1,20	4	21	
Medio 9	15	12	4	5 % Medio 5-Gln	1638,6	1,37	13	13	
Medio 9	13	12	4	5 % Medio 5-Gln	1606,7	1,34	13	13	
Medio 9	13	20	4	5 % Medio 5-Gln	1075,91	0,90	13	21	
Medio 9	13	20	4	5 % Medio 5-Gln	1058,4	0,88	13	21	
Medio 9	13	20	4	5 % Medio 5-Gln	1075,91	0,90	15	21	
Medio 9	13	5	4	Asn, Gln, 5 % Medio 5-Gln	974,52	0,81	28,5	11	
Medio 9	13	20	4	Asn, Gln, 5 % Medio 5-Gln	831,81	0,69	28,5	26	
Medio 9	13	20	4	Medio 5, 30 % total, 5 mM Gln día 4	975,4	0,81	28,5	26	
Medio 9	13	20	4	Medio 5, 30 % total, 5 mM Gln día 4	973,5	0,81	28,5	26	

Nota: Medio 5-Gln - Medio 5 que carece de glutamina.

Resultados y conclusiones

La Figura 59 muestra los títulos de anti-GDF-8 extrapolados para varios niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina totales combinadas. La Tabla 24 muestra los resultados de un ensayo T que compara el título normalizado de los niveles de glutamina entre 2 y 15 mM con los niveles de glutamina fuera de este intervalo. La

5 Tabla 25 muestra los resultados de un ensayo T que compara el título de los niveles de glutamina y asparagina combinadas entre 16 y 36 mM con los niveles de glutamina y asparagina combinadas fuera de este intervalo.

Ambos resultados del ensayo T indicaban diferencias significativas en los títulos de anti-GDF-8 entre los dos grupos que se compararon. Los cultivos que se cultivan en Medio 9 que contenían entre 2 y 15 mM de glutamina y entre 16 y 36 mM de glutamina y asparagina combinadas presentaban mayores títulos de anti-GDF-8 que los cultivos que se cultivaban en medios con niveles de glutamina y de glutamina y asparagina combinadas que se encontraban fuera de estos intervalos. En todos los experimentos, los niveles de asparagina eran mayores de 9 mM.

10 Tabla 24. Resultados del ensayo T que comparan el título normalizado en las condiciones de $2 \text{ mM} < \text{Gln} < 15 \text{ mM}$ frente a $\text{Gln} > 15 \text{ mM}$, $\text{Gln} < 2 \text{ mM}$

Título normalizado	$\text{Gln} > 15$, $\text{Gln} < 2$	$2 < \text{Gln} < 15$
Media	0,724649917	1,033147493
Varianza	0,013326655	0,036834109
Observaciones	7	12
Varianza agrupada	0,028537361	
Hipótesis de la diferencia media	0	
df	17	
t Stat	-3,839791986	
$P(T \leq t)$ de una cola	0,000656219	
t Crítica de una cola	1,739606432	
$P(T \leq t)$ de dos colas	0,001312438	
t Crítica de dos colas	2,109818524	

15 Tabla 25. Resultados del ensayo T que compara el título normalizado en condiciones de $16 \text{ mM} < \text{Gln+Asn} < 36 \text{ mM}$ frente a $\text{Gln+Asn} > 36 \text{ mM}$, $\text{Gln+Asn} < 16 \text{ mM}$

Título normalizado	$\text{Asn+Gln} > 36$, $\text{Asn+Gln} < 16$	$16 < \text{Asn+Gln} < 36$
Media	0,735066584	1,027071104
Varianza	0,012061148	0,041504987
Observaciones	7	12
Varianza agrupada	0,031113044	
Hipótesis de la diferencia media	0	
df	17	
t Stat	-3,480816823	
$P(T \leq t)$ de una cola	0,001430281	
t Crítica de una cola	1,739606432	
$P(T \leq t)$ de dos colas	0,002860561	
t Crítica de dos colas	2,109818524	

Ejemplo 15. Efectos del Medio sobre el cultivo celular

Este ejemplo investigaba la actuación de tres variaciones del medio de cultivo a escala intermedia utilizando cultivos de siembra de alta densidad. Se esperaba que todos los medios ensayados presentaran mejoras por encima del

medio de Fase 1 (Medio 10 alimentado con medio de alimentación Medio 11), basado en los datos de biorreactor a pequeña escala.

Materiales y procedimientos

Se ensayaron células CHO que expresan un anticuerpo IgG1 monoclonal anti-péptido Abeta humanizado ("células anti-ABeta") en varios medios, como se muestra en la Tabla 26 (véase Basi y col., Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide, documento WO02/46237). El punto más bajo de pH fijado era 7,0 controlado con 0,95 M de Na₂CO₃ + 0,05 M de K₂CO₃, excepto en el Fase 1, que se controló con una solución que contenía bicarbonato sódico a 0,58 M y carbonato sódico a 0,71 M. El oxígeno disuelto se controló a un 30 % por aireación según necesidades con aire, el agitado era a 60 rpm, y el medio de alimentación era el Medio 5 (con o sin glutamina, como se ha señalado). Todos los cultivos se cultivaron a una escala de 130 l excepto en 03P49B501, que se cultivaban a una escala de 500 l. En resumen, el Medio 1 se enriqueció con todos los nutrientes, sin considerar las tasas de captación relativas, mientras que el Medio 12 se equilibró retirando los nutrientes aparentemente innecesarios de la versión enriquecida indiscriminadamente. Las composiciones de los Medios 10, 11, y 12 se enumeran en la Tabla 27.

Tabla 26. Medio inicial, cantidades de alimentación y fuentes de siembra para las ejecuciones Piloto

Lote Nº	Descripción	Medio Inicial	Cantidad de alimentación	¿Alimentación con Gln?	Fuente de siembra	Densidad de siembra (Viables/ml)
1	Fase 1	Medio 10	38 % *	Sí	Bolsas con agitado	0,2 x 10 ⁶
2	Medio rico, Gln alta (1)	Medio 1	16 %	Sí	Bolsas con agitado	0,2 x 10 ⁶
3	Med rico, Gln alta (2)	Medio 1	16 %	Sí	Bolsas con agitado	0,2 x 10 ⁶
4	Med rico, Gln baja	Medio 1	15 %	No	Bolsas con agitado	0,2 x 10 ⁶
5	Med equil., Gln baja (1)	Medio 12	10 %	No	Bolsas con agitado	0,2 x 10 ⁶
6	Med equil., Gln baja (2)	Medio 12	9 %	No	Bolsas con agitado	0,2 x 10 ⁶
7	Med equil., Gln baja, Siembra densa	Medio 12	5 %	No	Biorreactor de alta densidad	2,0 x 10 ⁶

* El proceso de Fase 1 se alimentó con Medio 12, que no es tan rico como el Medio 5.

Tabla 27. Composiciones de Medios 10, 11 y 12

	Medio 10		Medio 11		Medio 12	
	Aminoácidos	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l
alanina	24,87	0,28	142,48	1,60	17,80	0,20
arginina	423,43	2,43	1528,84	8,79	696,00	4,00
asparagina•H ₂ O	173,90	1,16	1080,60	7,20	1500,00	10,00
Ácido aspártico	52,72	0,40	532,40	4,00	219,45	1,65
cisteína•HCl•H ₂ O	70,01	0,40			70,40	0,40
cisteína•2HCl	62,09	0,20	470,00	1,50	312,50	1,00
Ácido glutámico	41,08	0,28	235,38	1,60		
Glutamato monosódico					33,80	0,20

(continuación)

	Medio 10		Medio 11		Medio 12	
Aminoácidos	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
glutamina	1162,40	7,96	6000,00	41,10	584,00	4,00
glicina	35,92	0,48	120,07	1,60	115,50	1,54
Histidina·HClH ₂ O	75,27	0,36	588,32	2,80	369,60	1,76
isoleucina	151,90	1,16	944,52	7,21	370,73	2,83
leucina	172,69	1,32	1360,75	10,39	615,70	4,70
lisina·HCl	218,38	1,20	1456,80	8,00	946,40	5,20
metionina	53,55	0,36	477,06	3,20	387,40	2,60
fenilalanina	98,81	0,60	660,36	4,00	363,00	2,20
prolina	96,40	0,84	552,31	4,80	471,50	4,10
serina	273,07	2,60	1264,70	12,04	903,00	8,60
treonina	132,81	1,12	762,02	6,40	380,80	3,20
triptófano	28,99	0,14	260,94	1,28	212,16	1,04
tirosina·2Na·2H ₂ O	145,10	0,56	832,62	3,19	456,75	1,75
valina	131,17	1,12	749,21	6,40	468,00	4,00
Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
biotina	0,36	1,49	3,28	13,45	2,68	11,00
Pantotenato cálcico	4,03	8,47	36,02	75,67	21,93	46,06
Cloruro de colina	16,11	115,92	143,28	1030	116,76	840,00
Ácido fólico	4,76	10,80	42,43	96,22	25,93	58,80
inositol	22,64	125,79	201,71	1120	163,98	911,00
nicotinamida	3,61	29,62	32,02	262,44	26,23	215,00
piridoxal·HCl	1,99	9,83			2,03	10,00
piridoxina·HCl	1,67	8,10	32,82	159,31	18,13	88,00
riboflavina	0,40	1,06	3,60	9,58	0,41	1,10
tiamina·HCl	3,92	11,64	35,22	104,51	39,43	117,00
vitamina B12	1,34	0,99	11,21	8,27	10,57	7,80
Sales inorgánicas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
CaCl ₂	115,78	1,04	113,27	1,02	116,55	1,05
KCl	310,94	4,17			312,90	4,19
KH ₂ PO ₄			1640,00	12,06		
Na ₂ HPO ₄	70,81	0,50			56,60	0,40

(continuación)

	Medio 10		Medio 11		Medio 12	
Sales inorgánicas	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
NaCl	3704,96	63,44				
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	114,53	0,83			645,84	4,68
MgSO ₄	48,70	0,41			138,00	1,15
MgSO ₄ •7H ₂ O	8,60	0,03	170,00	0,69		
MgCl ₂	28,53	0,30			28,50	0,30
NaHCO ₃	1220,00	14,52			2000,00	23,89
Elementos traza	µg/l	nM	µg/l	nM	µg/l	nM
Selenito sódico	7,00	40,49	40,00	231,35	53,65	310,27
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	49,86	123,42			50,00	123,76
CuSO ₄	0,97	6,06	3,44	21,51	10,00	62,50
CuSO ₄ •5H ₂ O	7,49	30,00	7,49	30,00	49,94	200,00
FeSO ₄ •7H ₂ O	1542	5549	2534	9115	3366	12000
ZnSO ₄ •7H ₂ O	1383	4821	2704	9421	2640	9198
MnSO ₄ •H ₂ O	0,17	1,01	0,17	1,01	16,90	100,00
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	140	492,84	140,00	492,84	142,03	500,00
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1,24	1,00	1,24	1,00	123,60	100,00
NH ₄ VO ₃	0,65	5,56	0,65	5,56	1,17	10,00
NiSO ₄ •6H ₂ O	0,13	0,49	0,13	0,49	2,63	10,00
SnCl ₂ •2H ₂ O	0,12	0,53	0,12	0,53	0,45	2,00
AlCl ₃ •6H ₂ O			1,20	4,97	0,48	2,00
AgNO ₃			0,17	1,00		
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂			2,55	9,98		
KBr			0,12	1,01	0,24	2,00
CdCl ₂ •2,5H ₂ O			2,28	9,99		
CoCl ₂ •6H ₂ O			2,38	10,00		
CrCl ₃			0,32	2,02	7,92	50,00
NaF			4,20	100,02	0,08	2,00
GeO ₂			0,53	5,07	0,21	2,00
KI			0,17	1,02	16,60	100
RbCl			1,21	10,01	0,24	2,00
ZrOCl ₂ •8H ₂ O			3,22	9,99		
H ₃ BO ₃					6,18	100,00
LiCl					0,08	2,00

(continuación)

Otros Componentes	$\mu\text{g/l}$	μM	$\mu\text{g/l}$	μM	$\mu\text{g/l}$	μM
Hidrocortisona	86,40	,24	288,00	0,79	360,00	0,99
Putrescina•2HCl	2480	15,39	8000	49,66	10000	62,07
Ácido linoleico	56,69	0,20	336,25	1,20	290,00	1,04
Ácido tióctico	141,71	0,69	840,63	4,08	716,00	3,48
Otros Componentes	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
D-glucosa (Dextrosa)	11042,24	61,35	43005,99	238,92	15000,00	83,33
PVA	2520,00		2400,00		2560,00	
Nucellin™	14,00		80,00		50,00	
Piruvato sódico	54,85	0,50			55,00	0,50

Resultados y conclusiones

- 5 Los cambios de medio dan lugar a una mejora constante a lo largo del curso de estos experimentos. En términos de crecimiento celular, viabilidad, reducción de niveles de lactato, reducción de niveles de amonio, y título, los niveles de glutamina reducidos eran mejores que los elevados (véase las Figuras 60-64) y el medio equilibrado (discontinuo) era mejor que el medio rico (Medio 1, véase las Figuras 60-64). Los cultivos que comenzaban con un inóculo de alta densidad presentaban un título final más alto que los cultivos que comenzaban con inóculos de densidad más baja (véase la Figura 64).
- 10 A diferencia de lo que se había observado en los biorreactores a pequeña escala, el primer medio (Medio 1 con Gln alta), daba como resultado títulos más bajos que los del proceso original (véase la Figura 64). Tampoco había cambio en la captación de lactato tras el cambio de temperatura (véase la Figura 62). Esto sugiere que hay alguna sensibilidad a la escala en este medio. Esta conclusión está apoyada por las ejecuciones paralelas a pequeña escala (2 l) que se hicieron junto con estos experimentos a escala intermedia (datos no mostrados). Las últimas formulaciones de medio que contienen menos glutamina no eran sensibles a la escala al menos en estos experimentos (véase las Figuras 60-65), aumentando la confianza de todos los datos recopilados en esta campaña.

Ejemplo 16. Producción de TNFR-Ig utilizando el medio 9**Materiales y procedimientos**

- 20 Las células CHO que expresan una proteína de fusión dimérica que consiste en la parte de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral humano (TNFR) de 75 kilodaltons (p75) unida a la parte Fc de IgG1 ("células TNFR-Ig"), se sembraron con alta densidad a partir de un biorreactor de perfusión y se diluyeron a 3×10^6 células viables/ml en Medio 9 para la etapa del biorreactor de producción.

Resultados y conclusiones

- 25 Las Figuras 66, 67, 68, 69, 70, 71 y 72 muestran el crecimiento celular, la viabilidad celular, la glucosa residual, los niveles de glutamina, la concentración de amonio, y el título relativo de producto, respectivamente. En la variación de modificaciones menores en el proceso, todas las condiciones producían un buen crecimiento celular, alta viabilidad celular, y un alto título final total.

- 30 Para todas las condiciones de este experimento, el subproducto metabólico inhibidor lactato o era consumido o se estabilizaba la concentración, sugiriendo que la producción de lactato se detenía. De manera similar, para el metabolito inhibidor amonio, los niveles aumentaban inicialmente, pero en algún momento tras el cambio de temperatura el amonio comenzaba a consumirse por las células. En este Ejemplo, los cultivos de células TNFR-Ig se sometieron a los inductores químicos butirato sódico y HMBA.

Ejemplo 17. Comparación de las condiciones de cultivo a gran y pequeña escala**Materiales y procedimientos**

- 35 Para determinar si el tamaño del cultivo afectaba las características de cultivo relevantes, se cultivaron las células

anti-GDF-8 a pequeña escala en biorreactores de 1 l o a gran escala en biorreactores de 6000 litros. Las células se cultivaron a 37 °C y se cambiaron a 31 °C el día 4.

Resultados y conclusiones

Como se puede ver en las Figuras 73, 74, 75 y 76 (que muestran la densidad celular, título, niveles de lactato y niveles de amonio, respectivamente) no había diferencias relevantes entre los cultivos a gran escala de 6000 litros y a pequeña escala de 1 litro para estas características. Tanto los niveles de lactato como de amonio empezaban a disminuir tras el cambio de temperatura el día 4. Este ejemplo demuestra que el tamaño del cultivo no afecta a la densidad celular, viabilidad celular, niveles de lactato y niveles de amonio cuando los cultivos se sometían a las mismas condiciones de cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un anticuerpo contra un fragmento A β de la proteína precursora de amiloide en un cultivo celular de producción a gran escala que comprende las etapas de:

proporcionar un cultivo celular que comprende;

- 5 células de mamífero que contienen un gen que codifica el anticuerpo, cuyo gen se expresa en una condición de cultivo celular; y
un medio que contiene glutamina y que tiene un medio característico seleccionado del grupo que consiste en:
(i) una cantidad acumulada de aminoácidos por unidad de volumen mayor de aproximadamente 70 mM, (ii) una relación molar de glutamina acumulada con respecto a asparagina acumulada de menos de aproximadamente 2, (iii) una relación molar de glutamina acumulada con respecto a los aminoácidos totales acumulados de menos de aproximadamente 0,2, (iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulados con respecto a los aminoácidos totales acumulados entre aproximadamente 0,4 a 1, (v) una cantidad acumulada de glutamina y asparagina combinadas por unidad de volumen mayor de aproximadamente 16 mM, y combinaciones de las mismas;
- 10 mantener dicho cultivo en una fase de crecimiento inicial con un primer grupo de condiciones de cultivo durante un primer periodo de tiempo suficiente para permitir que dichas células se reproduzcan hasta una densidad celular viable en el intervalo de aproximadamente un 20 %-80 % de la densidad celular viable máxima posible si dicho cultivo se mantuviera en el primer grupo de condiciones de cultivo;
cambiar al menos una de las condiciones del cultivo, de manera que se aplique un segundo grupo de condiciones de cultivo y se produzca un cambio metabólico en el cultivo, en el que dicho cambio metabólico se **caracteriza por** una reducción en la relación de una tasa específica de producción de lactato con respecto a la tasa específica de consumo de glucosa;
mantener dicho cultivo durante un segundo periodo de tiempo con el segundo grupo de condiciones y durante un segundo periodo de tiempo de forma que se acumula el anticuerpo en el cultivo celular.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho medio contiene una relación molar de glutamina acumulada respecto a asparagina acumulada de menos de aproximadamente 2; y
dicho medio tiene dos características de medio seleccionadas del grupo que consiste en: (i) un medio que contiene una cantidad de aminoácidos acumulados por unidad de volumen mayor de aproximadamente 70 mM, (iii) una relación molar de glutamina acumulada con respecto a los aminoácidos totales acumulados de menos de aproximadamente 0,2, (iv) una relación molar de iones inorgánicos acumulados con respecto a los aminoácidos totales acumulados entre aproximadamente 0,4 y 1, (v) una cantidad acumulada de glutamina y asparagina combinadas por unidad de volumen mayor de aproximadamente 16 mM, y combinaciones de las mismas.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha condición de cultivo celular en dicha etapa de cambio de al menos una de las condiciones de cultivo se selecciona de entre el grupo que consiste en: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalidad, (iv) nivel de inductor químico, y combinaciones de los mismos.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración inicial de glutamina de dicho medio es menor o igual a 10 mM.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración inicial de glutamina de dicho medio es menor o igual a 4 mM.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada por unidad de volumen de glutamina de dicho medio es menor o igual a 10 mM.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada por unidad de volumen de glutamina de dicho medio es menor o igual a 4 mM.
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la glutamina solo se proporciona en el medio inicial al principio del cultivo celular.
- 50 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la densidad inicial de dichas células de mamífero es al menos de 2×10^5 células/ml.
- 55 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la densidad inicial de dichas células de mamífero es al menos de 2×10^6 células/ml.
- 60 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de provisión comprende proveer al menos aproximadamente 1000 l de cultivo.
- 65 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de provisión comprende proveer al menos aproximadamente 10.000 l de cultivo.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho primer grupo de condiciones comprende un primer intervalo de temperaturas que es aproximadamente de 30 a 42 grados Celsius.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho primer grupo de condiciones comprende un primer intervalo de temperaturas que es aproximadamente de 37 grados Celsius.
- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo grupo de condiciones comprende un segundo intervalo de temperaturas que es aproximadamente de 25 a 41 grados Celsius.
- 10 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo grupo de condiciones comprende un segundo intervalo de temperaturas que es aproximadamente de 29 a 35 grados Celsius.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho segundo grupo de condiciones comprende un segundo intervalo de temperaturas que es aproximadamente de 31 grados Celsius.
- 15 18. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una segunda etapa de cambio posterior al dicho primer cambio de al menos una de las condiciones de cultivo que comprende el cambio de al menos una de las condiciones de cultivo, de manera que se aplica un tercer grupo de condiciones al cultivo.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la segunda etapa de cambio comprende el cambio de al menos una condición de cultivo seleccionada del grupo que consiste en: (i) temperatura, (ii) pH, (iii) osmolalidad, (iv) nivel de inductor químico, y combinaciones de los mismos.
- 20 20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicho tercer grupo de condiciones comprende un tercer intervalo de temperaturas que es aproximadamente de 27 a 37 grados Celsius.
21. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho primer periodo de tiempo es entre 1-7 días.
- 20 22. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho primer periodo de tiempo es aproximadamente de 4 días.
23. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el total de dicho primer periodo de tiempo y dicho segundo periodo de tiempo es al menos de 5 días.
- 25 24. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo periodo de tiempo, el nivel de lactato disminuye después de que el nivel de lactato en el cultivo ha alcanzado un nivel máximo.
- 25 25. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante un segundo periodo de tiempo, el nivel de amonio disminuye después de que el nivel de amonio en el cultivo ha alcanzado un nivel máximo.
- 30 26. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad total de dicho anticuerpo que se produce es al menos 1,5 veces mayor que la cantidad de anticuerpo que se produce en condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carece de dichas características de medio.
27. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad total de dicho anticuerpo que se produce es al menos 2 veces mayor que la cantidad de anticuerpo que se produce en condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carece de dichas características de medio.
- 35 28. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo celular se proporciona además con componentes supplementarios.
29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que dichos componentes supplementarios se proporcionan en intervalos múltiples.
- 40 30. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que dichos componentes supplementarios se seleccionan de entre el grupo que consiste en hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio, y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos presentes habitualmente a muy bajas concentraciones finales), aminoácidos, lípidos, o glucosa u otras fuentes de energía.
- 45 31. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo no se suplementa con componentes adicionales durante el curso de la producción de dicho anticuerpo.
32. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se sustituye la glicilglutamina por glutamina en dicho cultivo.
33. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina, y prolina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 25 mM.

34. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, tirosina, y prolina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 35 mM.
- 5 35. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho medio tiene una característica de medio seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) una cantidad total acumulada de histidina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 1,7 mM;
 - (ii) una cantidad total acumulada de isoleucina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 3,5 mM;
 - (iii) una cantidad total acumulada de leucina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 5,5 mM;
 - (iv) una cantidad total acumulada de metionina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 2,0 mM;
 - 10 (v) una cantidad total acumulada de fenilalanina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 2,5 mM;
 - (vi) una cantidad total acumulada de prolina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 2,5 mM;
 - (vii) una cantidad total acumulada de triptófano por unidad de volumen mayor de aproximadamente 1,0 mM; y
 - (viii) una cantidad total acumulada de tirosina por unidad de volumen mayor de aproximadamente 2,0 mM.
- 15 36. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de serina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 10 mM.
37. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de asparagina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 8 mM.
38. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de asparagina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 12 mM.
- 20 39. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de fósforo por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 5 mM.
40. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de glutamato por unidad de volumen en dicho medio es menor de aproximadamente 1 mM.
- 25 41. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de pantotenato cálcico por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 20 mg/l.
42. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de nicotinamida por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 25 mg/l.
43. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de piridoxina y piridoxal por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 35 mg/l.
- 30 44. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de riboflavina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 2,0 mg/l.
45. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad total acumulada de hidrocloruro de tiamina por unidad de volumen en dicho medio es mayor de aproximadamente 35 mg/l.
- 35 46. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además el aislamiento y/o purificación del anticuerpo que se produce, siendo útil dicho anticuerpo en la preparación de productos farmacéuticos.
47. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que:
- los niveles de lactato son menores que los niveles que se observan en condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carece de dicha característica del medio;
 - 40 los niveles de amonio son menores que los niveles que se observan en condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carece de dicha característica del medio; y
 - la cantidad total del anticuerpo que se produce es al menos tan alta como la que se observa en condiciones por lo demás idénticas en un medio por lo demás idéntico que carece de dicha característica del medio.
48. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-47, en el que dicho medio es un medio definido.

Figura 1. Comparación de Medio 1 y Medio 2 en matraces con agitado utilizando células anti-GDF-8

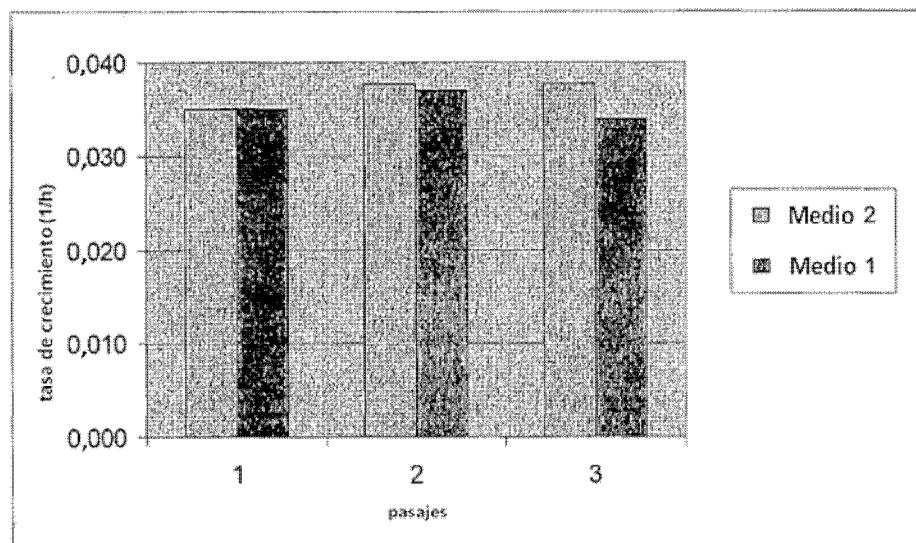


Figura 2. Crecimiento y viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 1

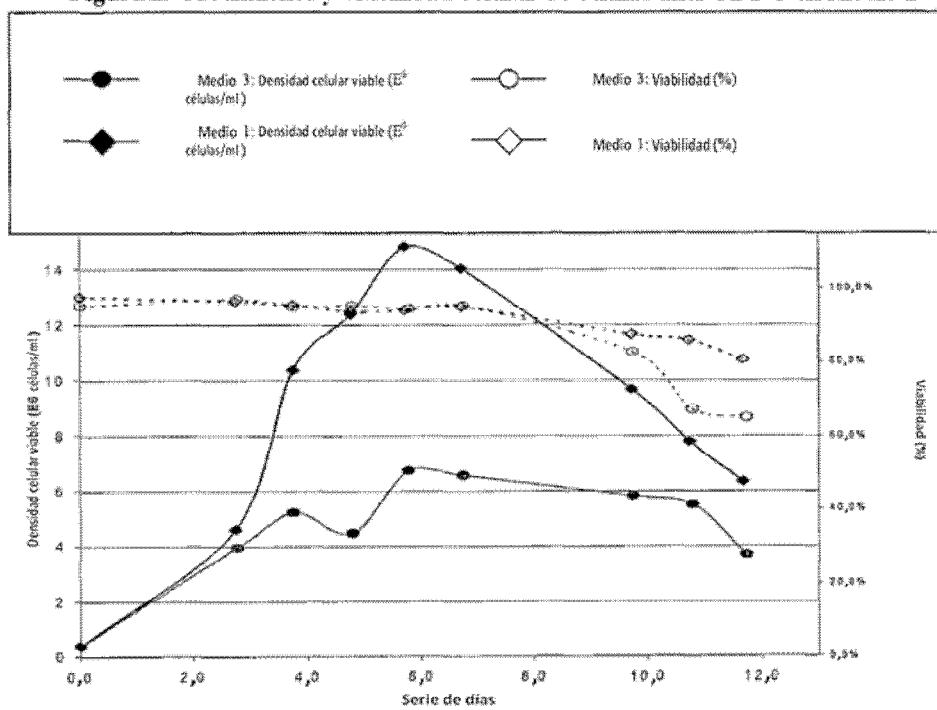


Figura 3. Crecimiento celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación con glutamina

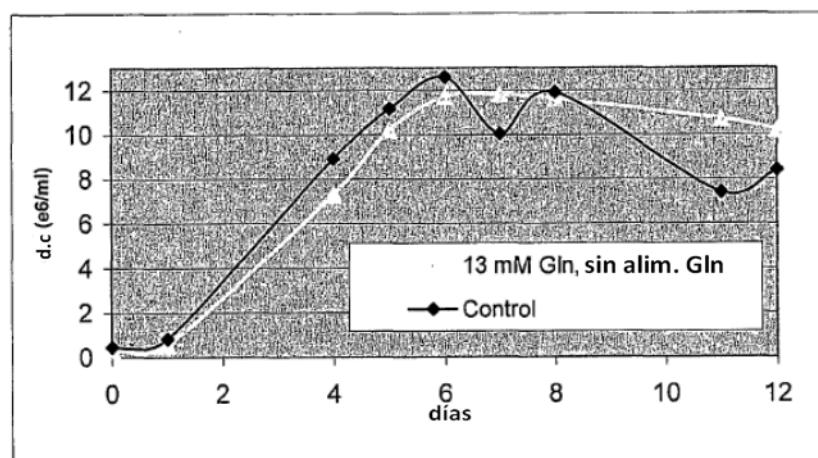


Figura 4. Viabilidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación con glutamina

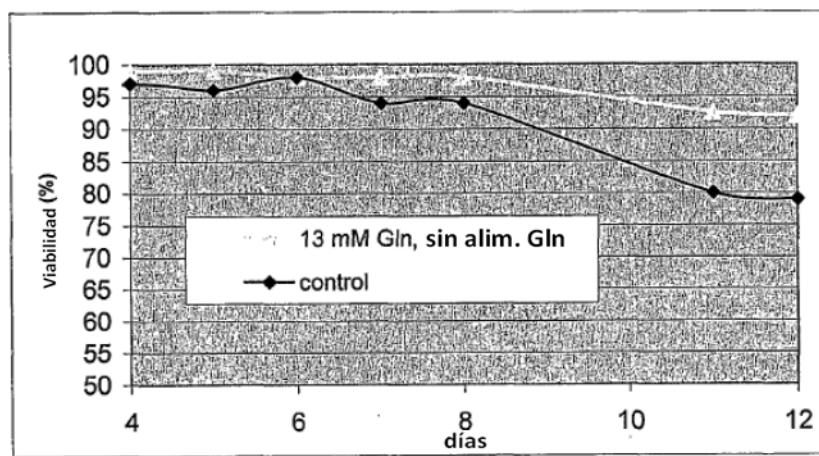


Figura 5. Niveles de amonio en cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación con glutamina

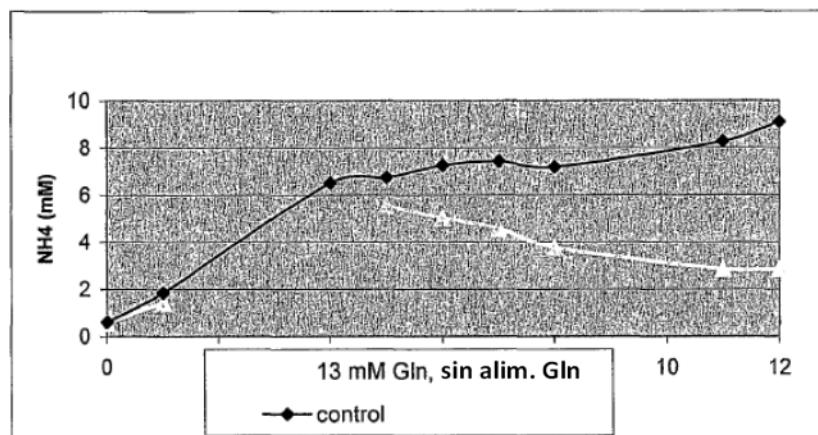


Figura 6. Niveles de lactato en cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación con glutamina

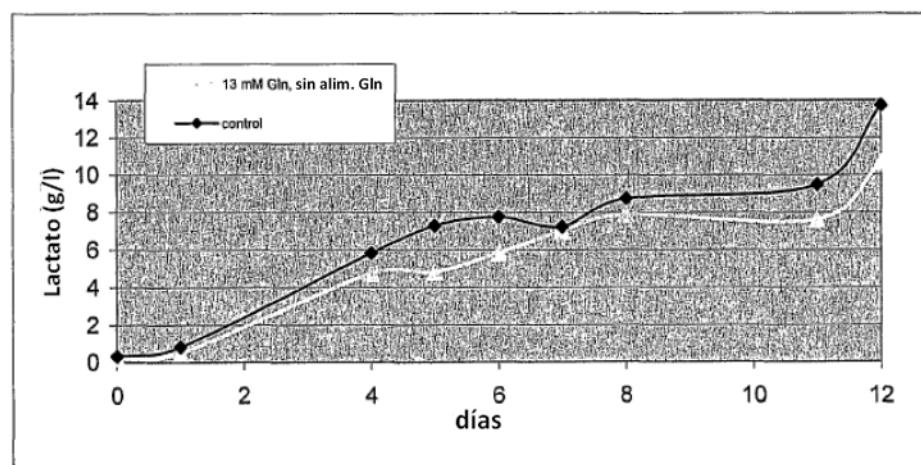


Figura 7. Título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y sin alimentación con glutamina

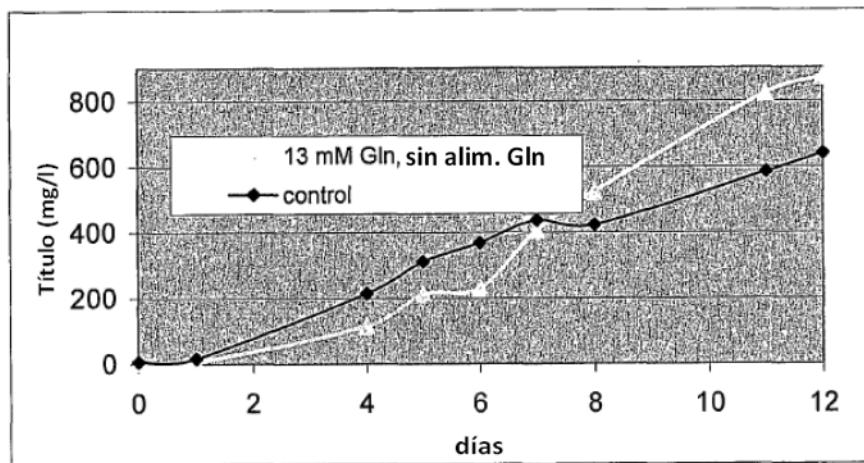


Figura 8. Densidad celular de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y alimentación con privación de glutamina

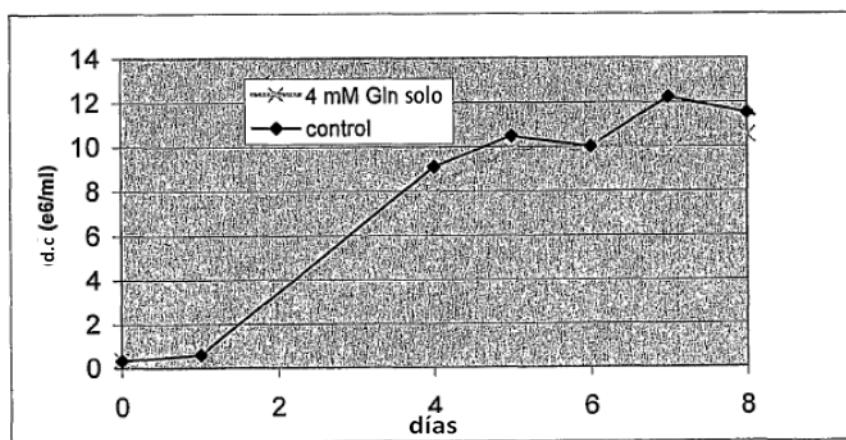


Figura 9. Viabilidad celular en cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control alimentados con privación de glutamina

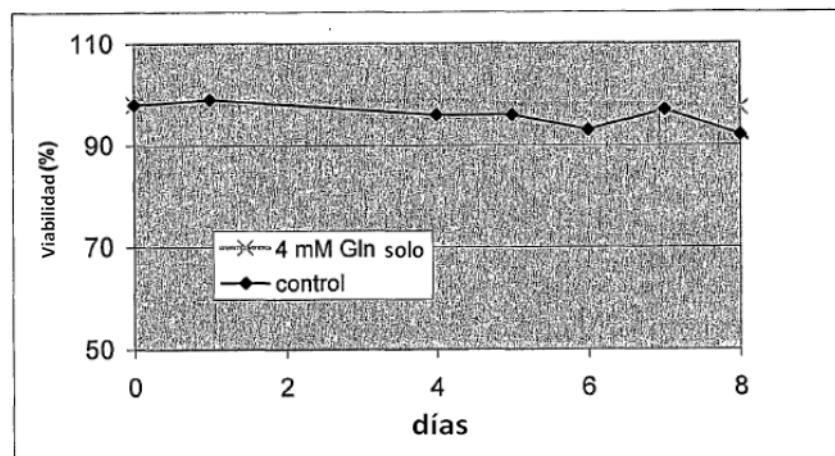


Figura 10. Niveles de amonio en cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control alimentados con privación de glutamina

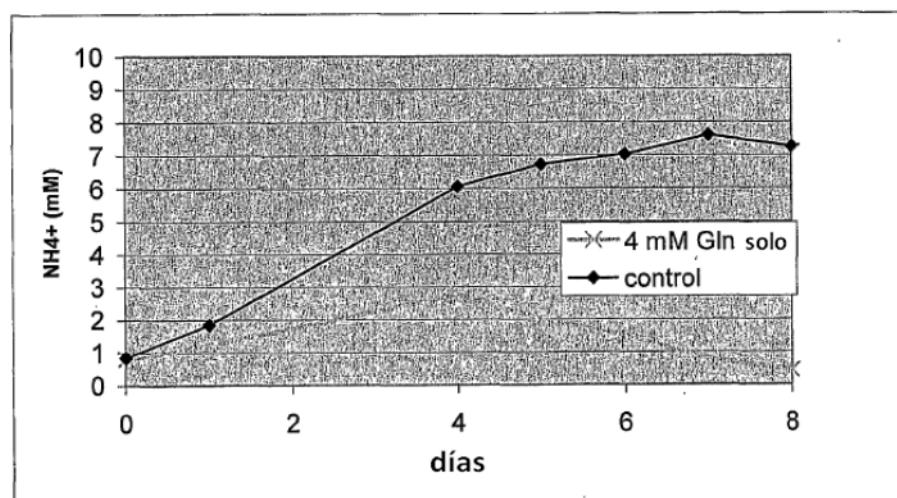


Figura 11. Niveles de lactato de cultivos de células anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y de privación de glutamina

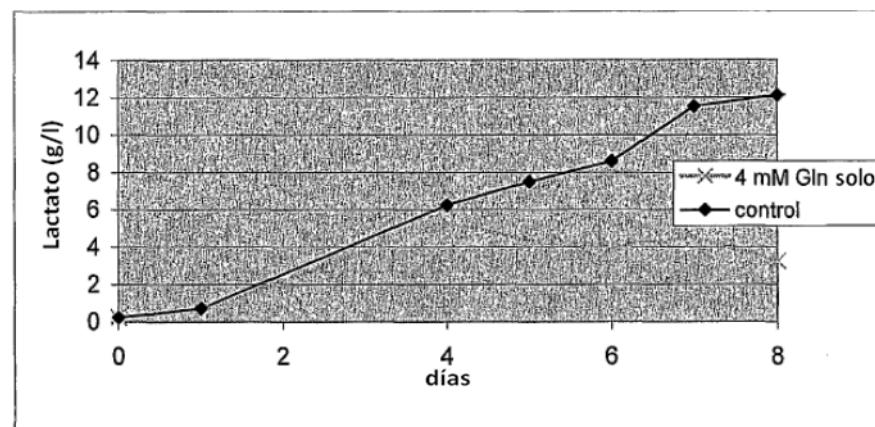


Figura 12. Título de anti-GDF-8 en condiciones de cultivo de control y de privación de glutamina

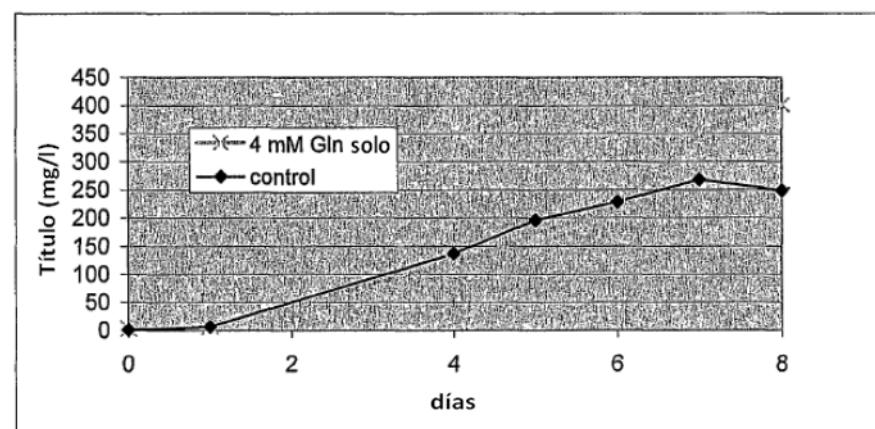


Figura 13. Respuesta a la dosis de hierro de células anti-GDF-8 en Medio 1 y Medio 2

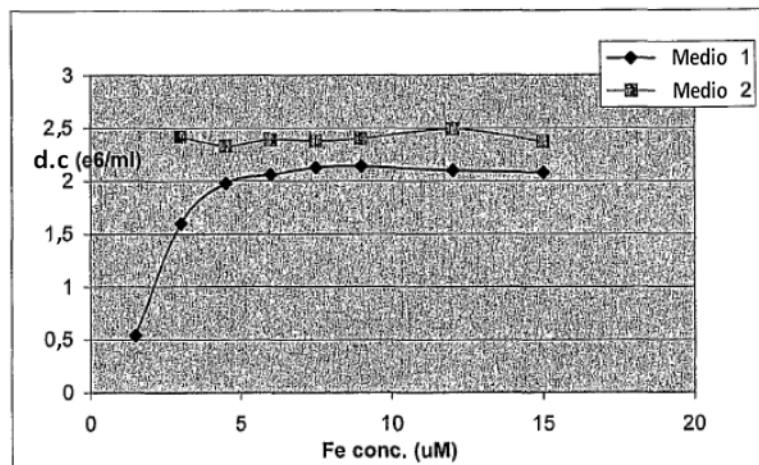


Figura 14. Densidad celular en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina

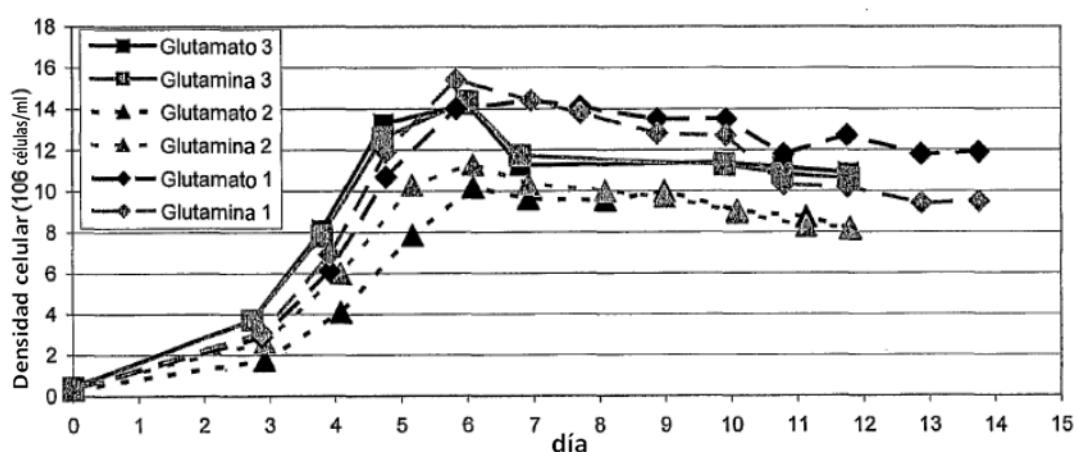


Figura 15. Viabilidad celular en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina

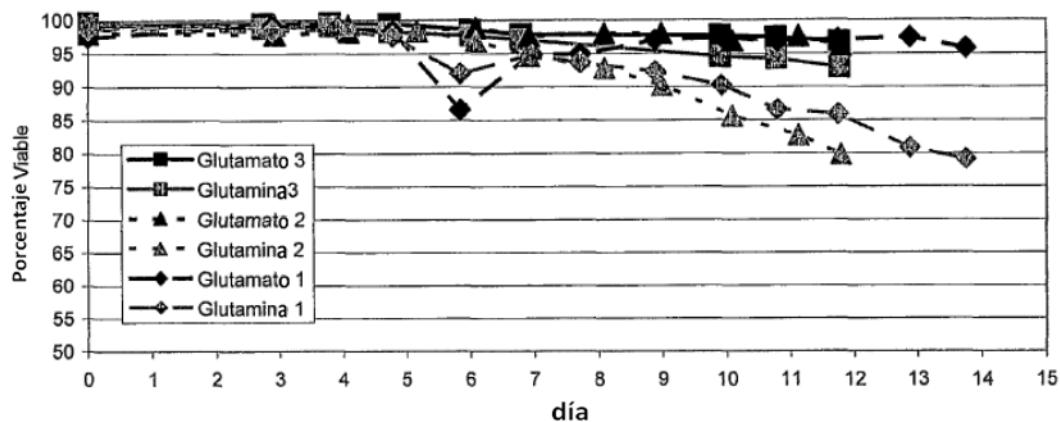


Figura 16. Título de anti-Lewis Y en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina

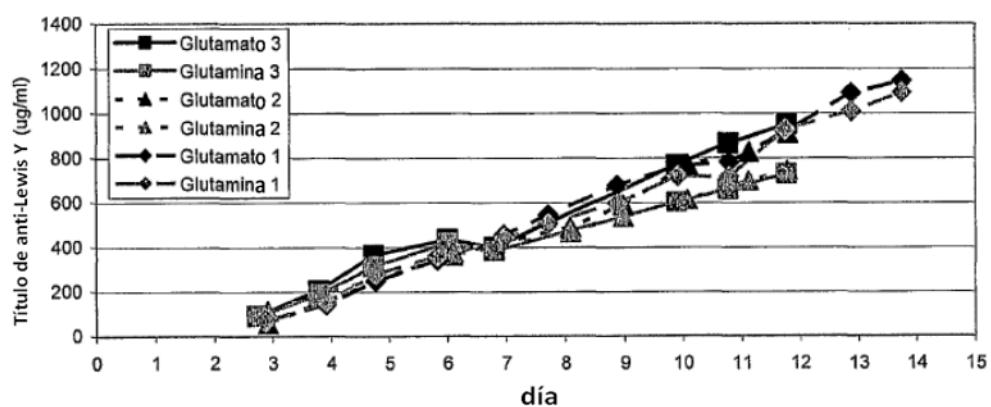


Figura 17. Niveles de lactato en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina

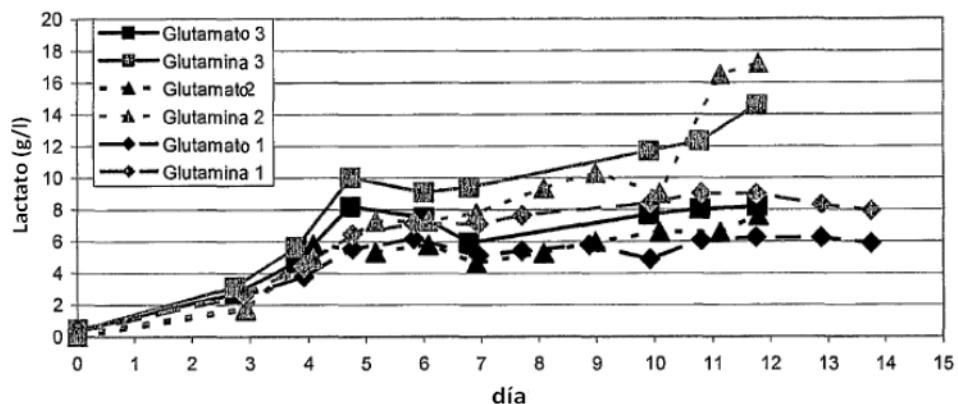


Figura 18. Niveles de amonio en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina

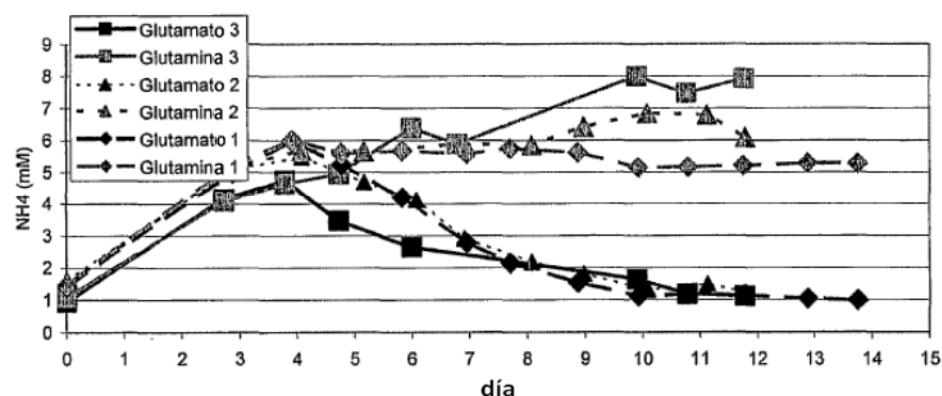


Figura 19. Osmolaridad en cultivos alimentados con Glutamato y Glutamina

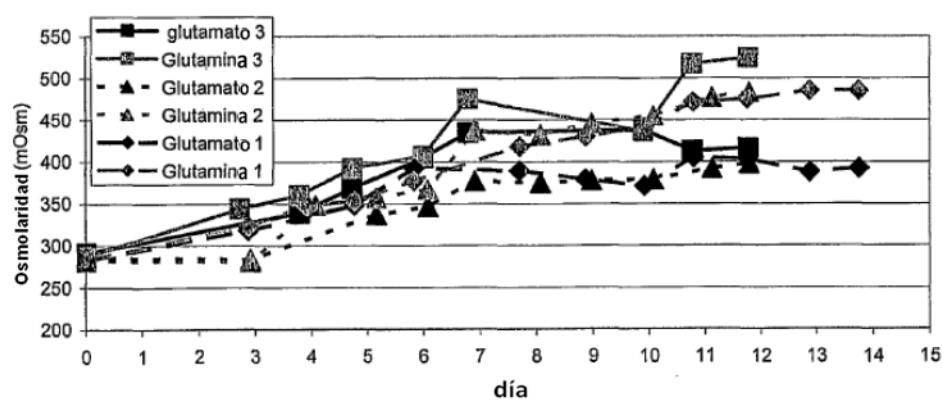


Figura 20. Densidad celular. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones

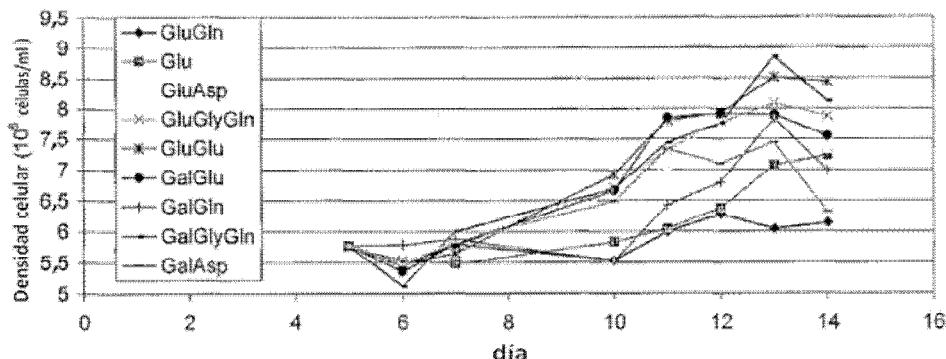


Figura 21. Viabilidad celular. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones

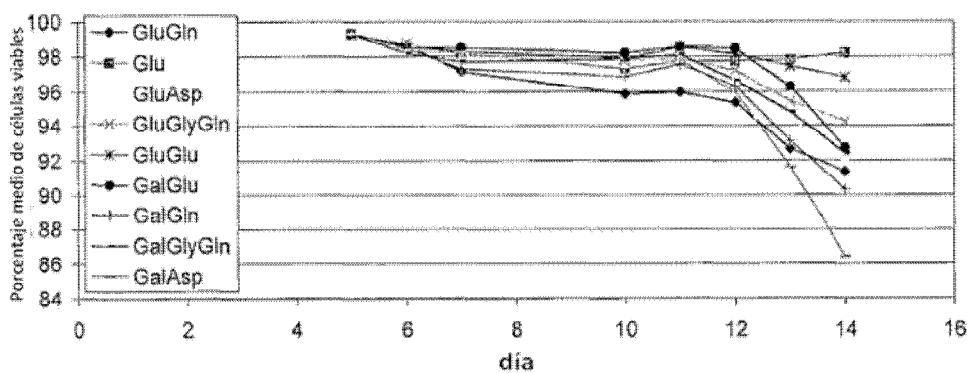


Figura 22. Título medio. Cada punto es la media de dos cultivos en matraces con agitado utilizando las mismas condiciones

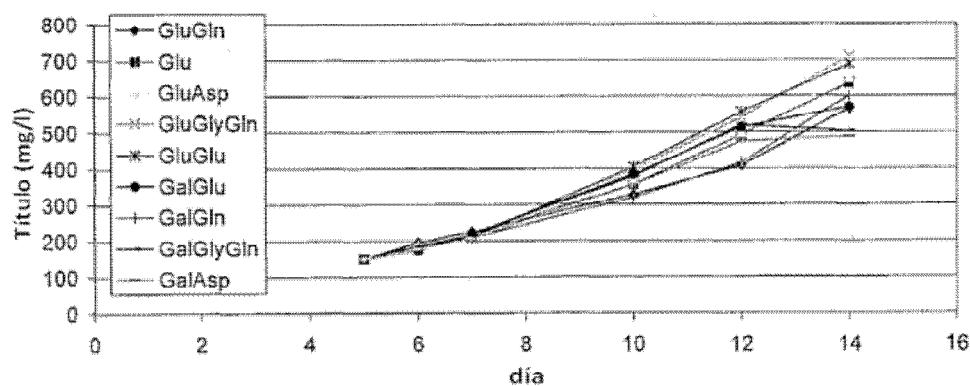


Figura 23. Niveles de amonio. Cada punto es la media de dos matraces con agitado cultivados utilizando las mismas condiciones

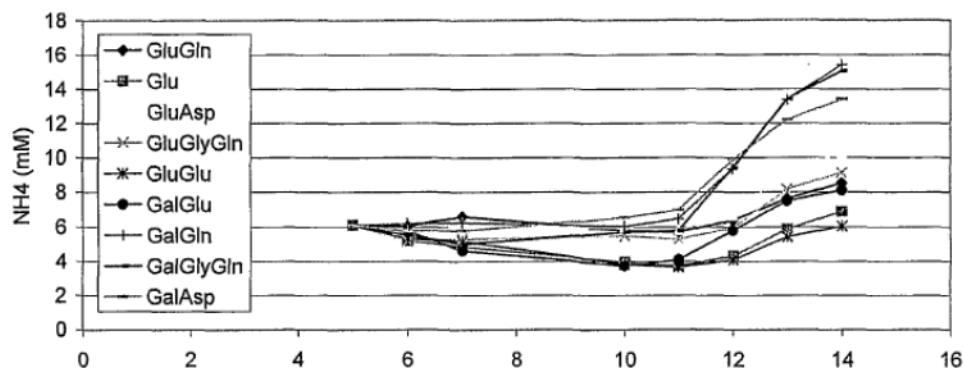


Figura 24. Salto Impulsor

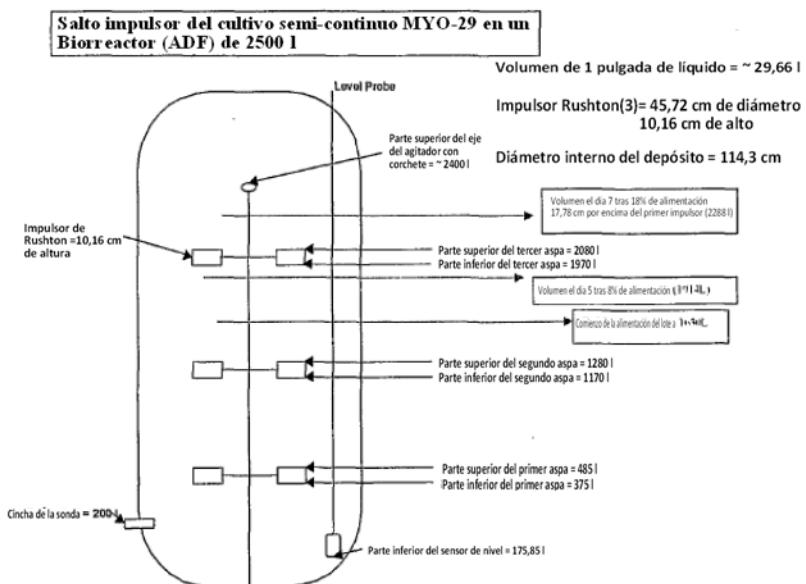


Figura 25. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

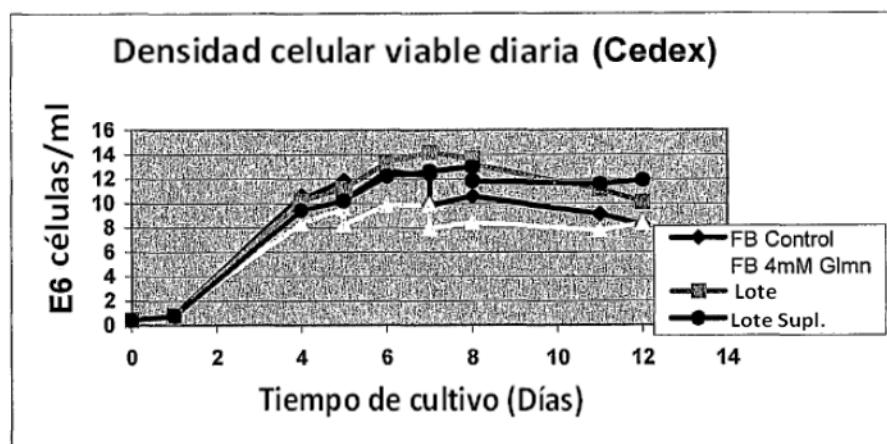


Figura 26. Viabilidad de células anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

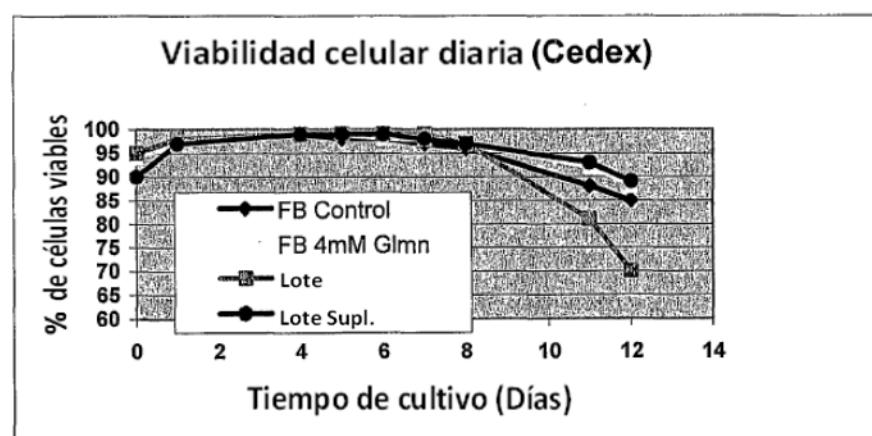


Figura 27. Título de anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

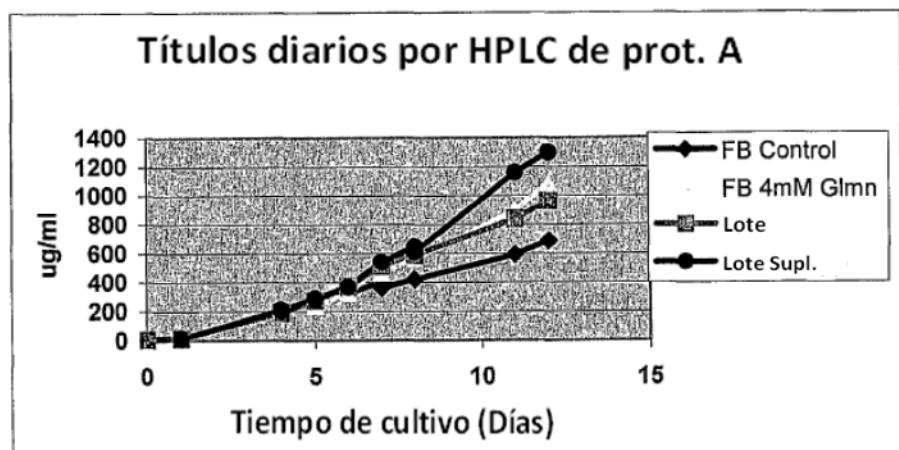


Figura 28. Niveles de lactato en cultivos de anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

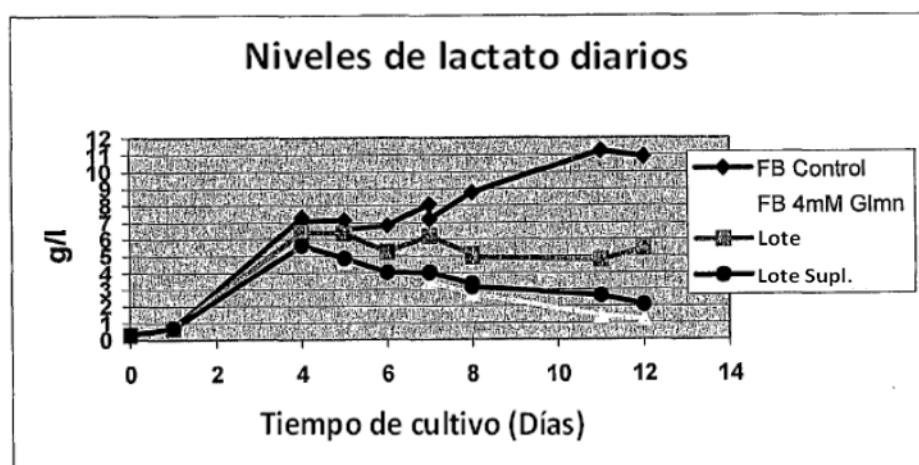


Figura 29. Niveles de amonio de cultivos de anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

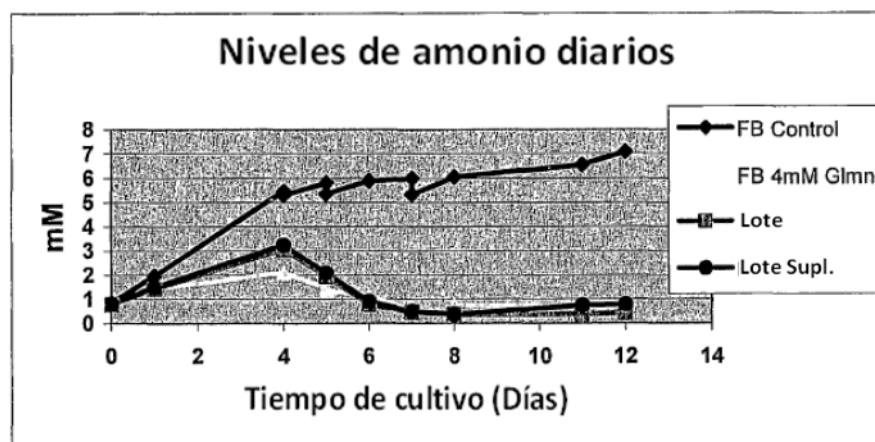


Figura 30. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

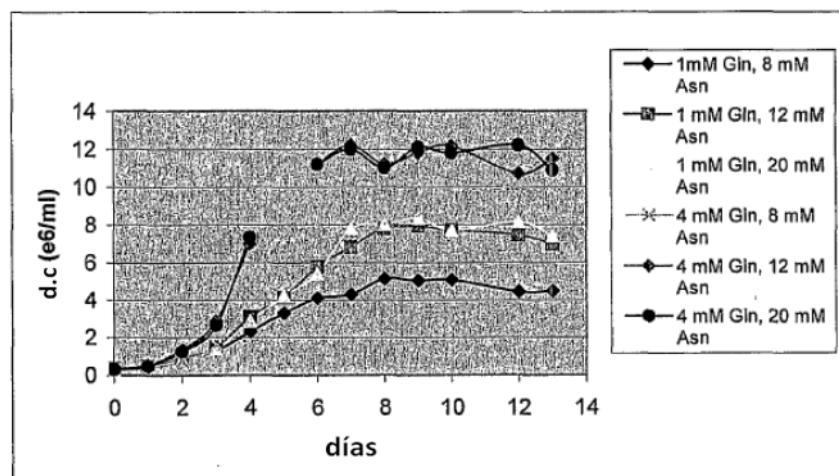


Figura 31. Título de anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

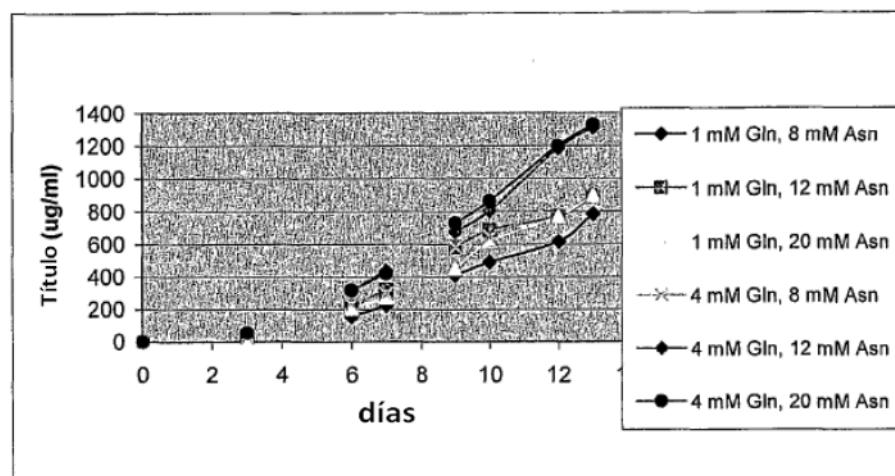


Figura 32. Niveles de lactato en cultivos de anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

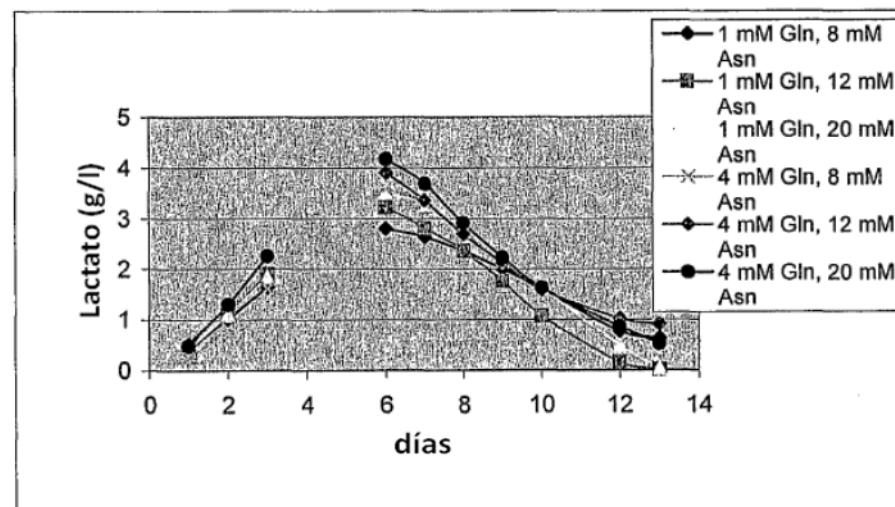


Figura 33. Niveles de amonio en cultivos de anti-GDF-8 en distintas condiciones experimentales

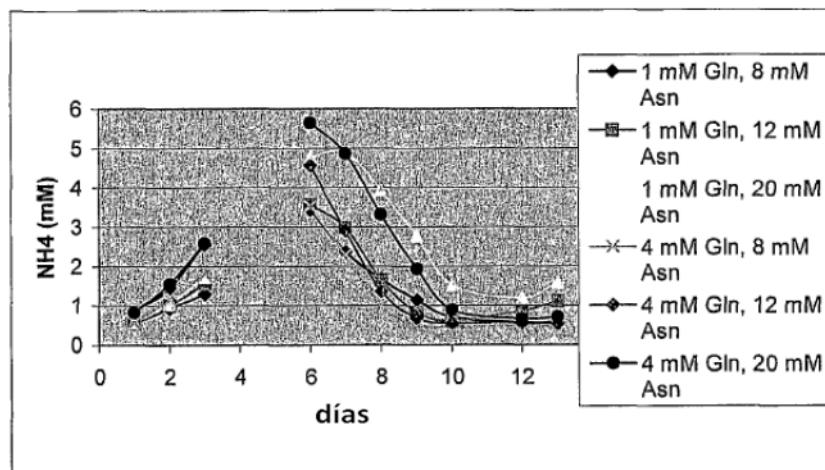


Figura 34. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina

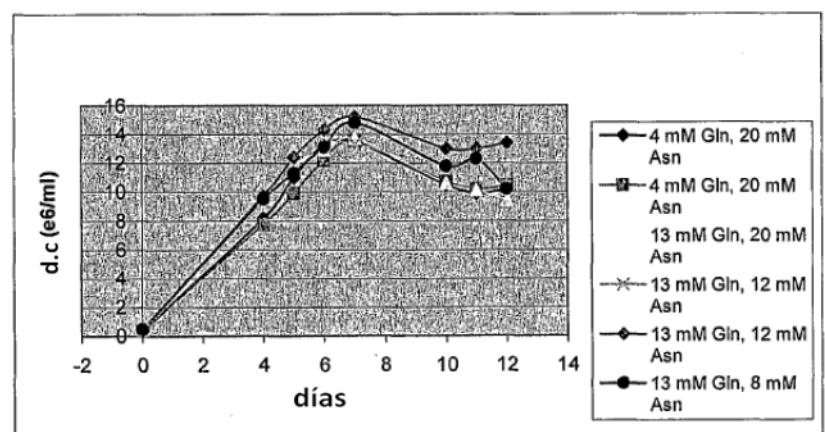


Figura 35. Viabilidad celular de células anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina

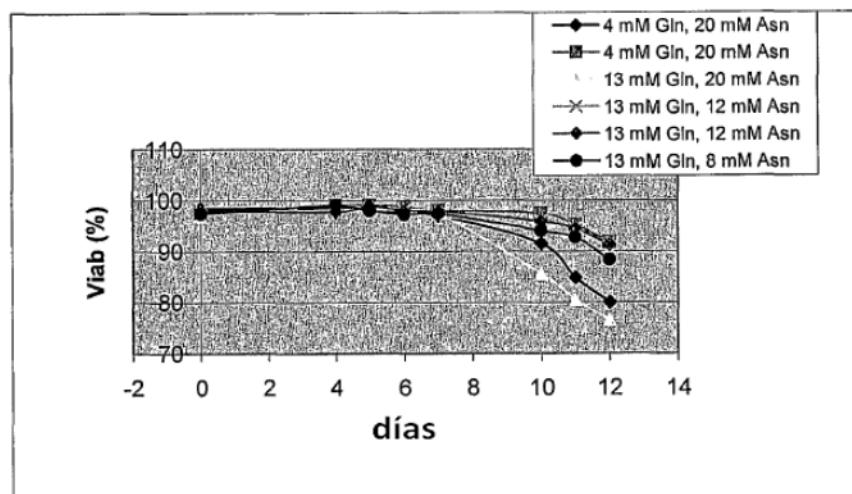
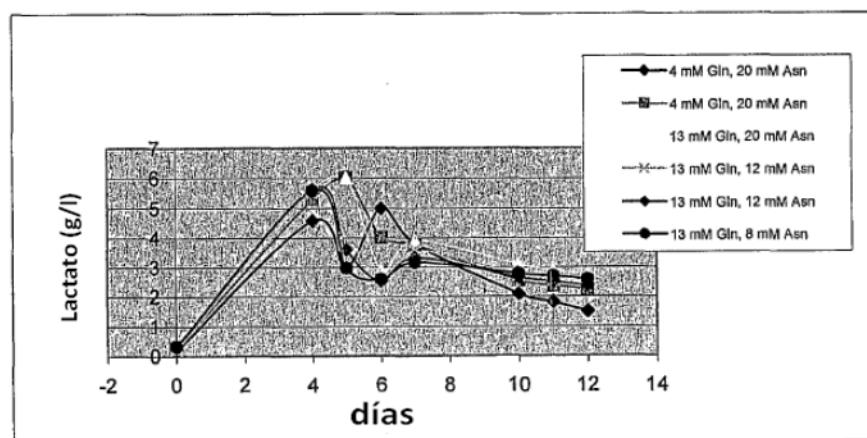


Figura 36. Niveles de lactato en cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina



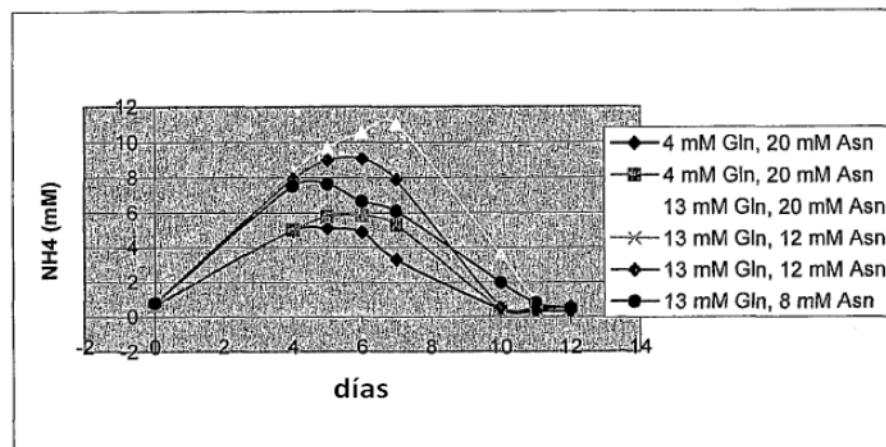


Figura 38. Niveles de glutamina en cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina

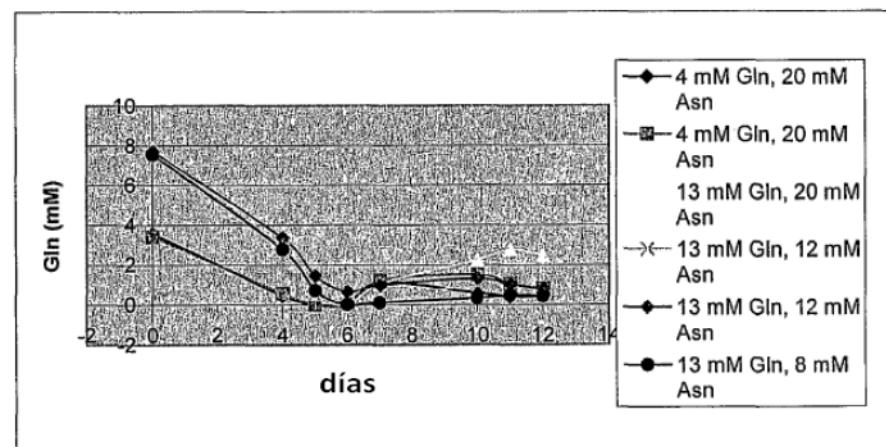


Figura 39. Titulo de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina

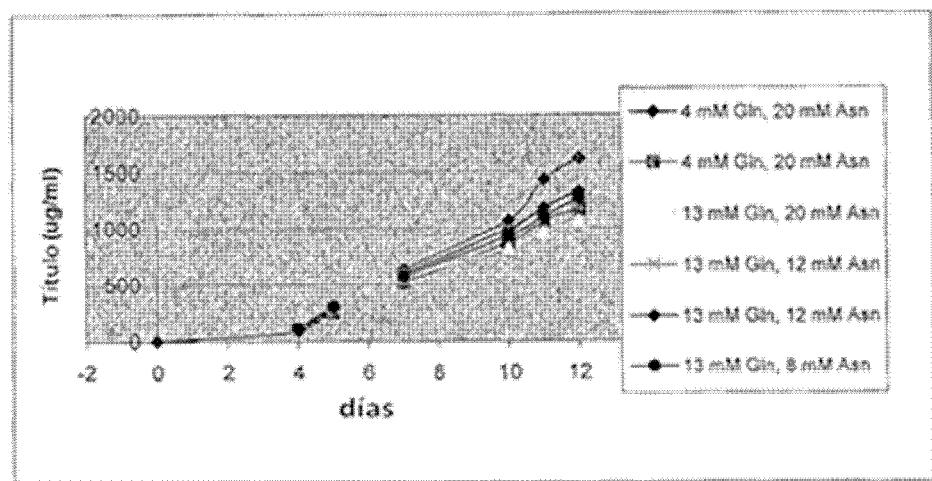


Figura 40. Osmolaridad de cultivos de anti-GDF-8 en Medio 9 modificado que contiene distintos niveles de glutamina y asparagina

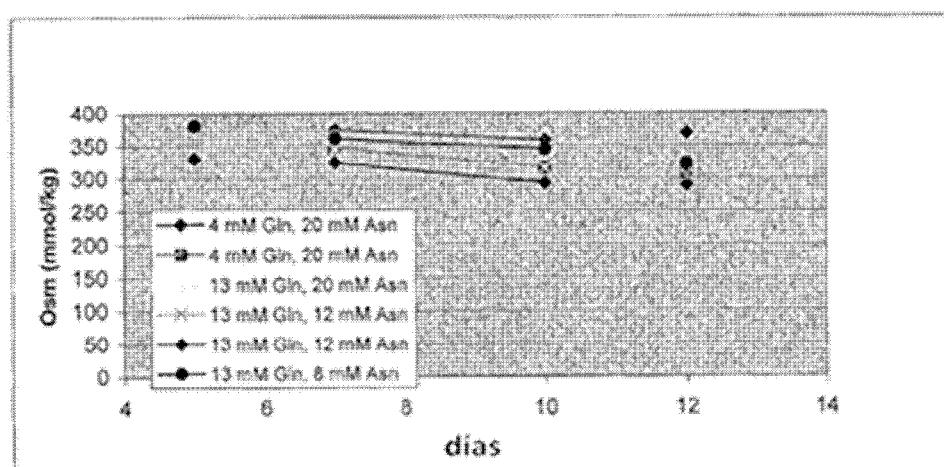


Figura 41. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

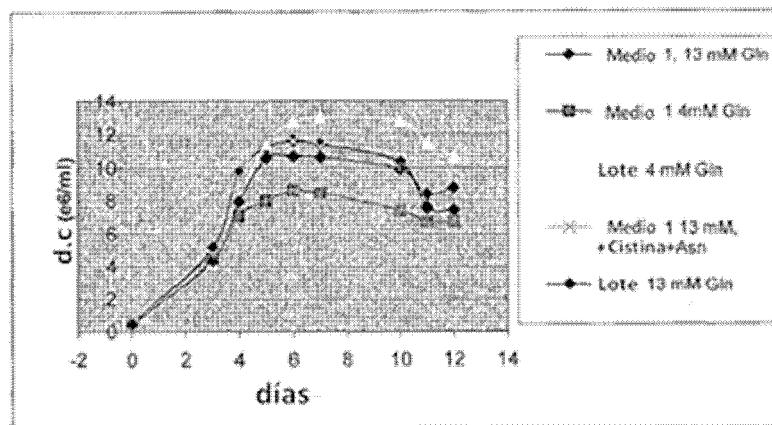


Figura 42. Niveles de lactato en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

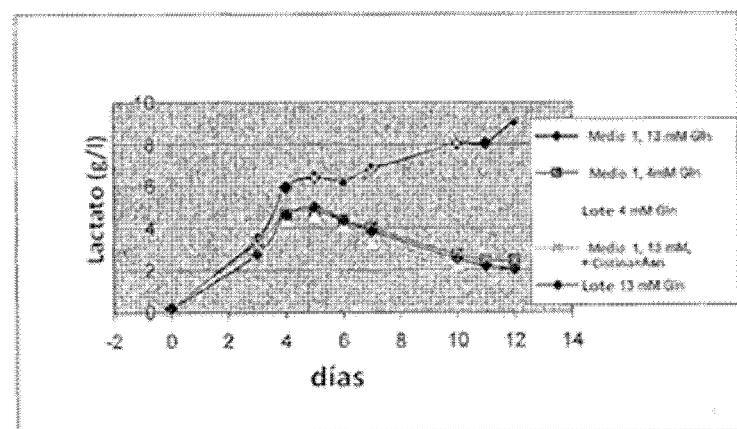


Figura 43. Niveles de amonio en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

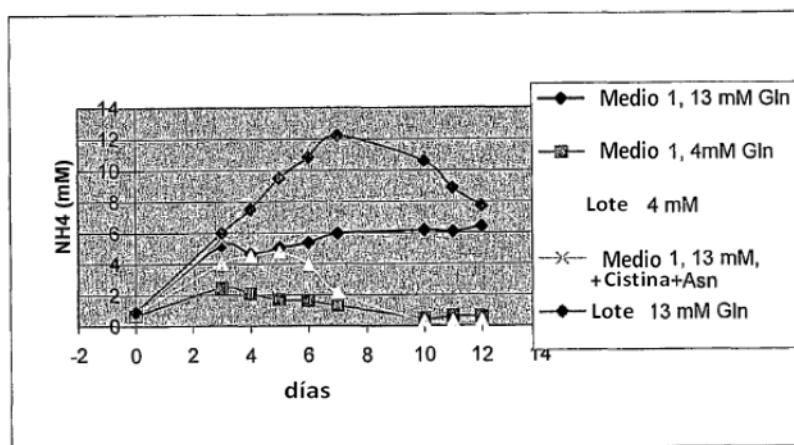


Figura 44. Niveles de glutamina en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

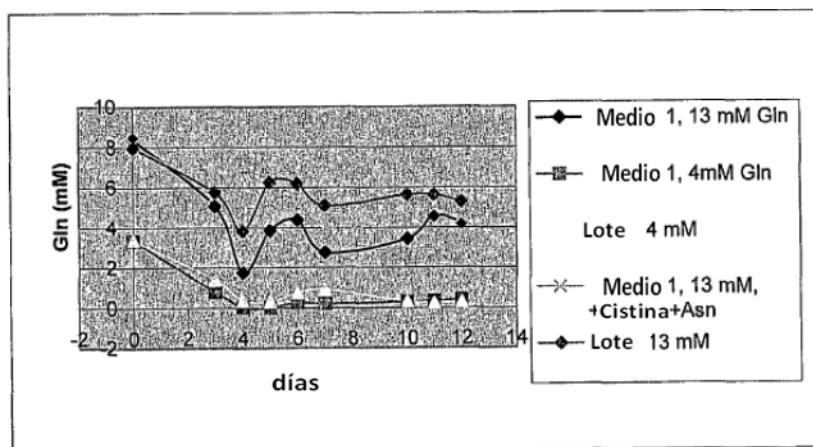


Figura 45. Niveles de glutamato en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

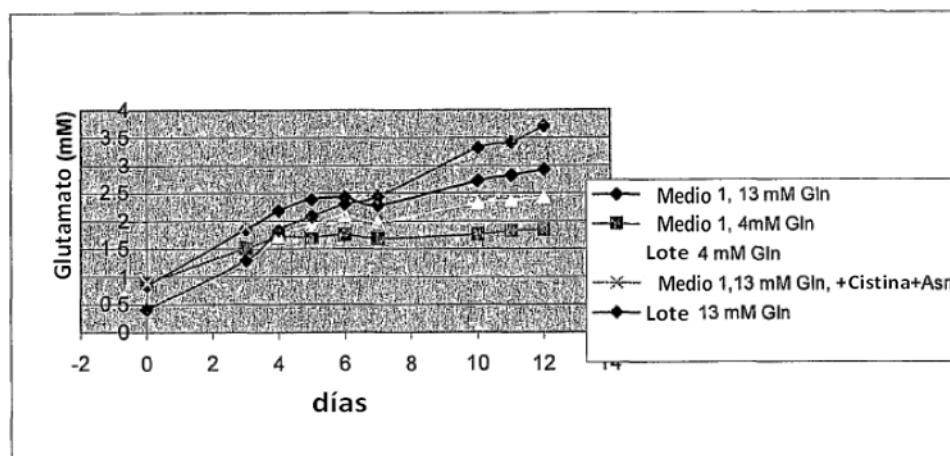


Figura 46. Título de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

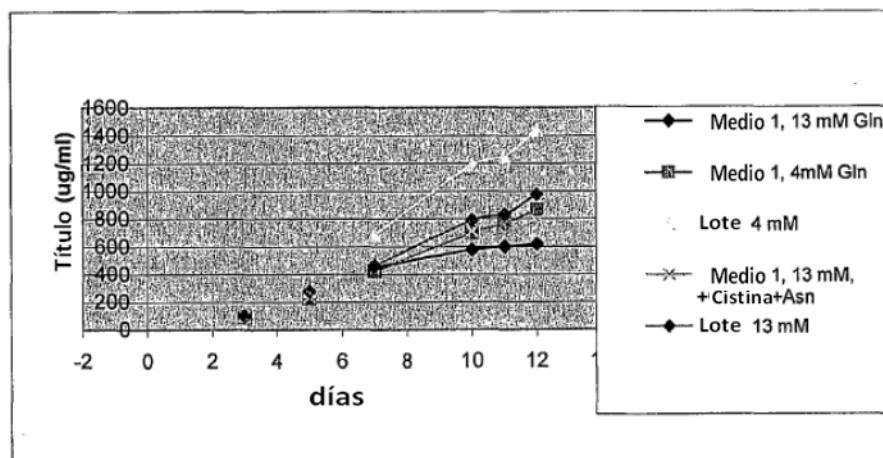


Figura 47. Osmolaridad en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de asparagina y cisteína

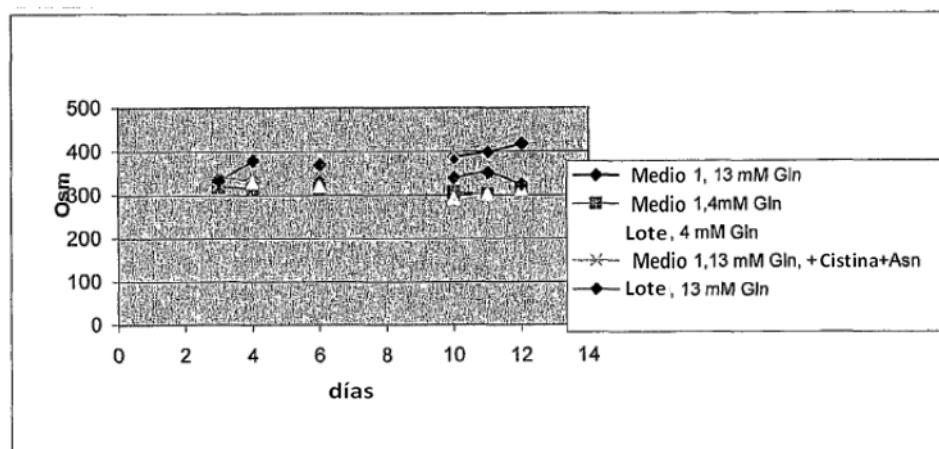


Figura 48. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas

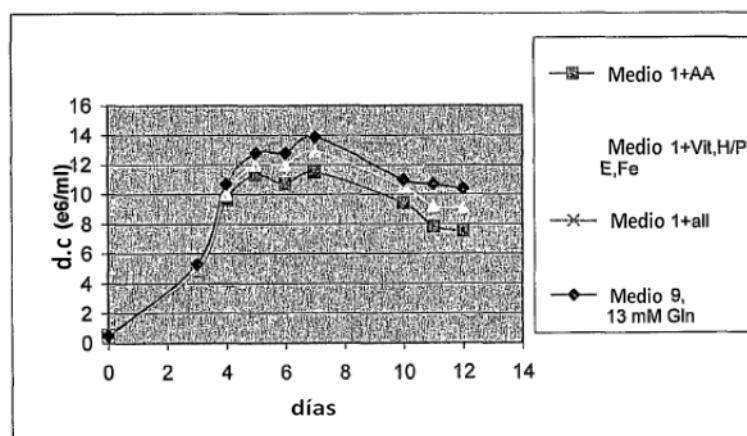


Figura 49. Niveles de lactato en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas

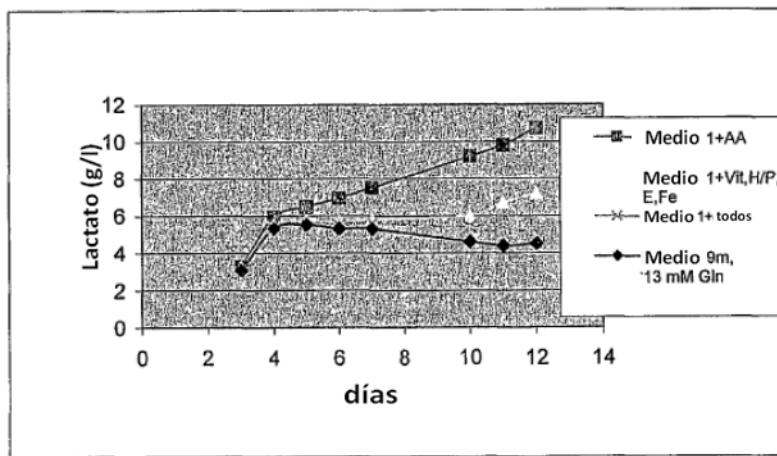


Figura 50. Niveles de amonio en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas

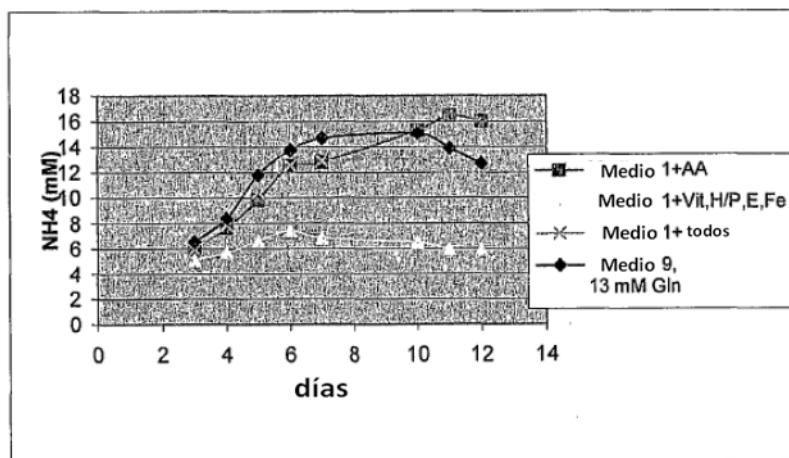


Figura 51. Niveles de glutamina en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas

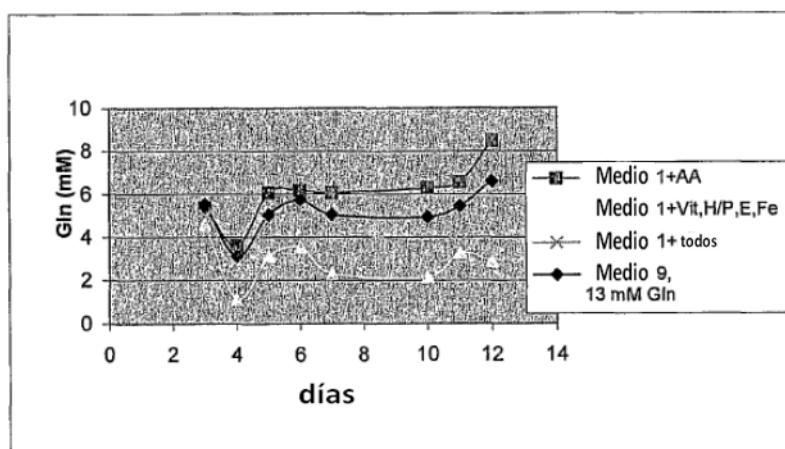


Figura 52. Titulo de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de aminoácidos y vitaminas

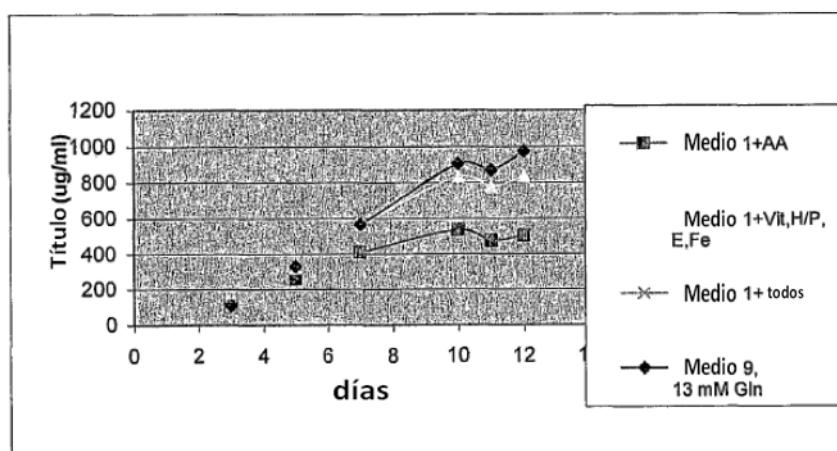


Figura 53. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro

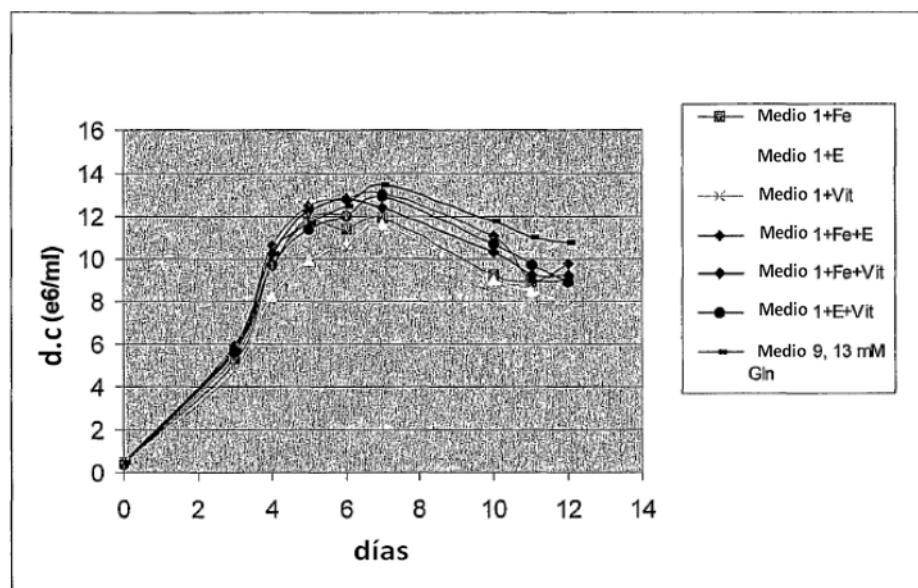


Figura 54. Niveles de lactato en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro

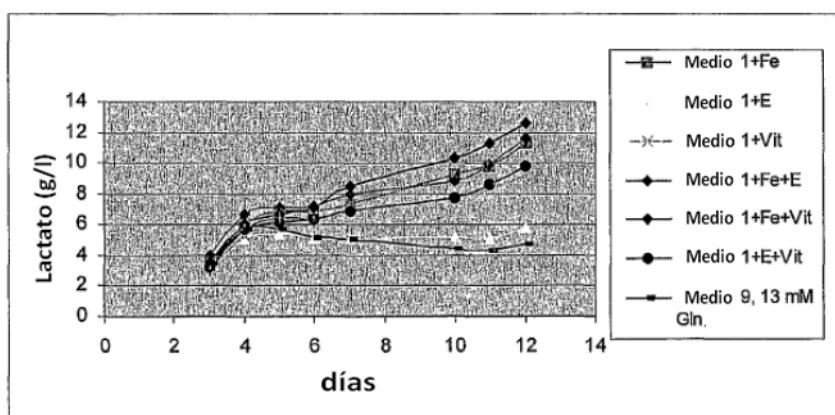


Figura 55. Niveles de amonio en cultivos de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro

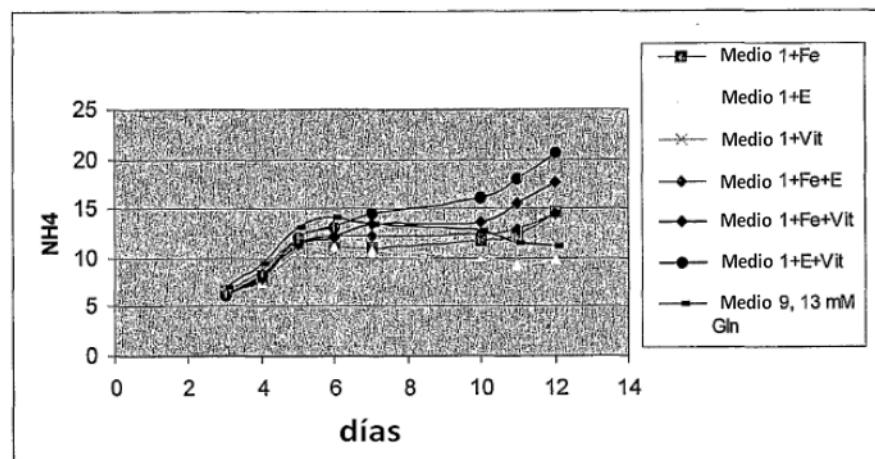


Figura 56. Título de anti-GDF-8 en medios que contienen distintos niveles de vitaminas, elementos traza E y hierro

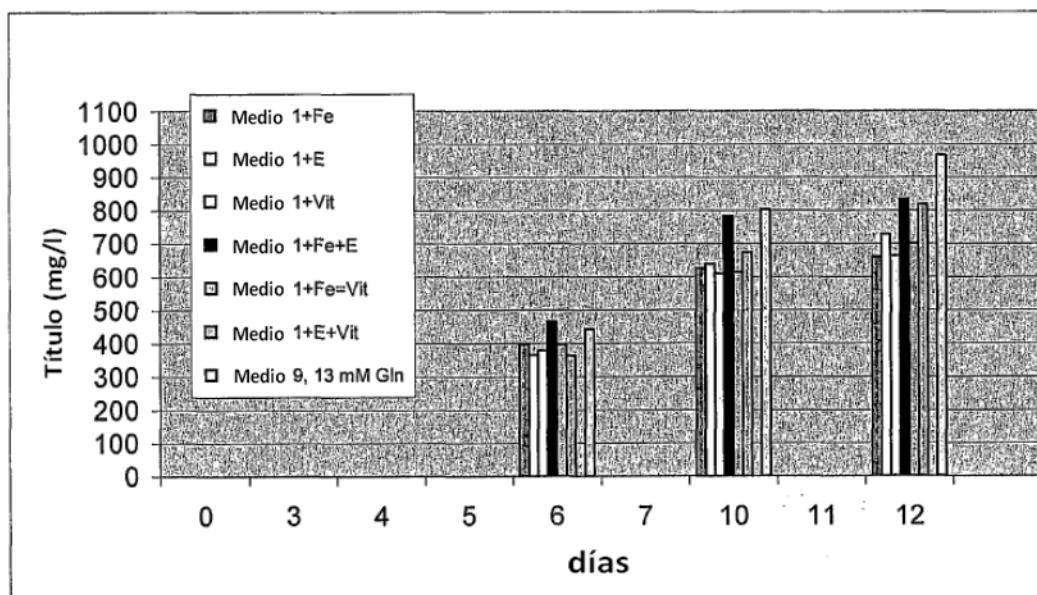


Figura 57. Crecimiento celular de células anti-GDF-8 en Medios 1, 3 y 9

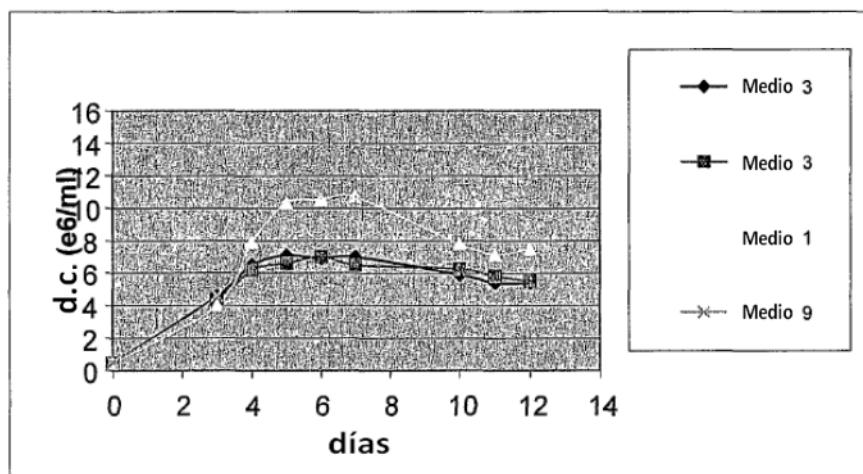


Figura 58. Título de anti-GDF-8 en Medios 1, 3 y 9

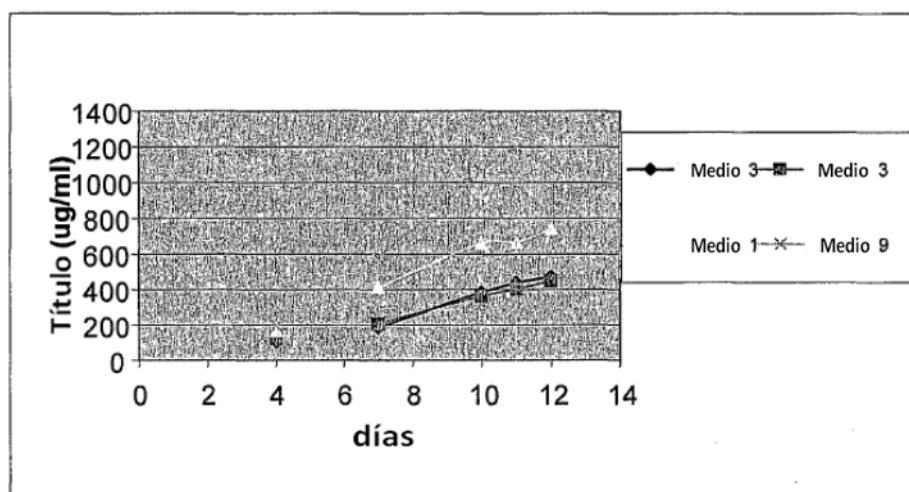


Figura 59. Titulos de anti-GDF-8 extrapolados para distintos niveles de glutamina sola y glutamina y asparagina totales combinadas

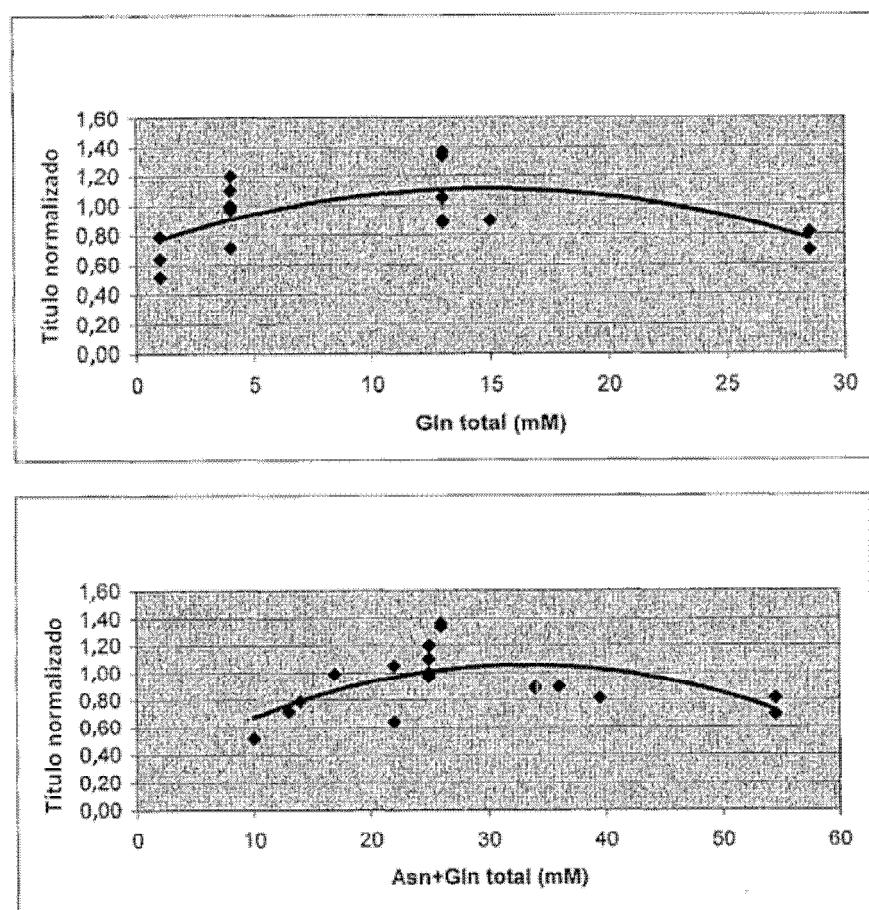


Figura 60. Crecimiento de células anti-ABeta en distintas condiciones de medio ensayadas

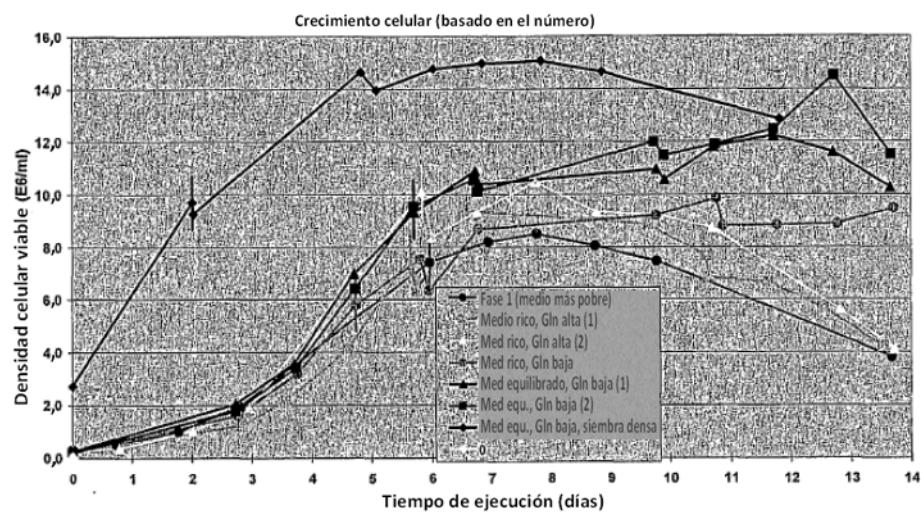


Figura 61. Viabilidad de células anti-ABeta en distintas condiciones ensayadas

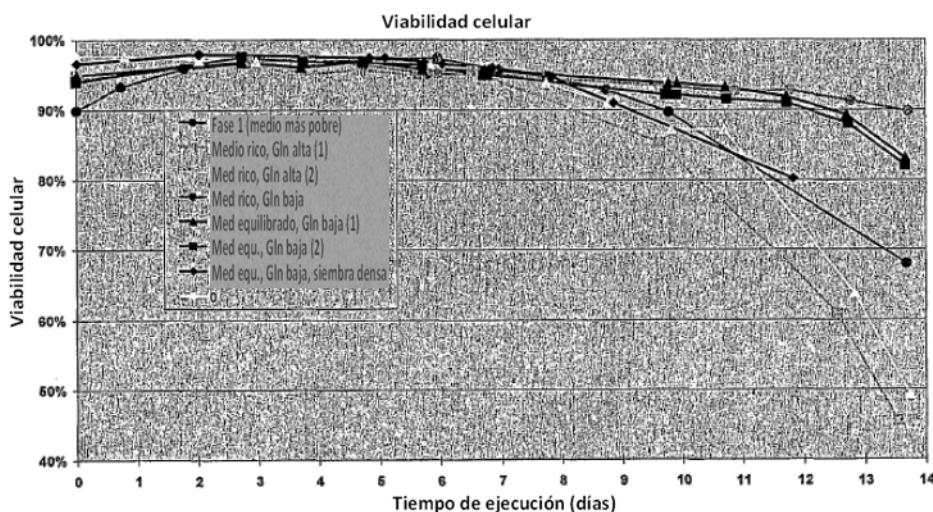


Figura 62. Niveles de lactato de cultivos de anti-ABeta en distintas condiciones de medio ensayadas

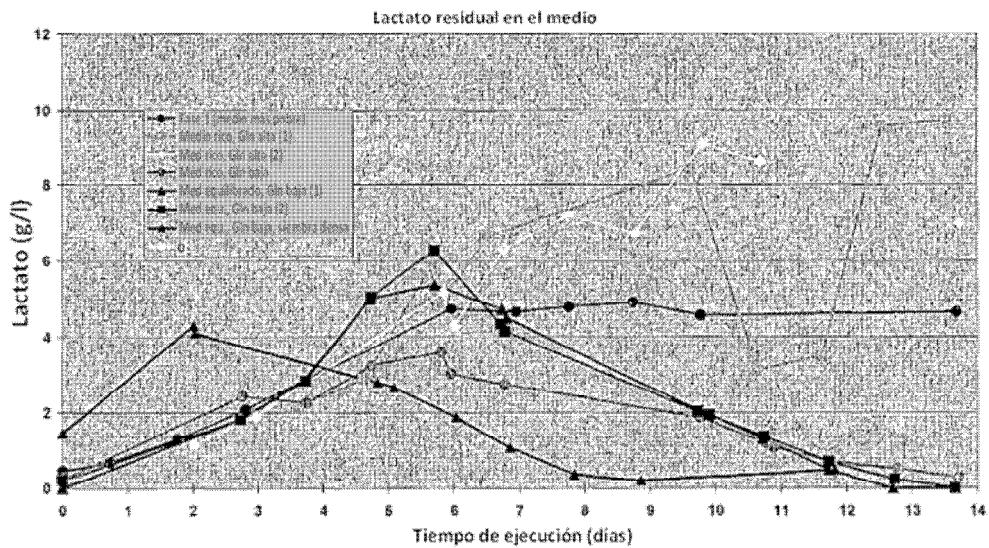


Figura 63. Niveles de amonio de cultivos de anti-ABeta en distintas condiciones de medio ensayadas

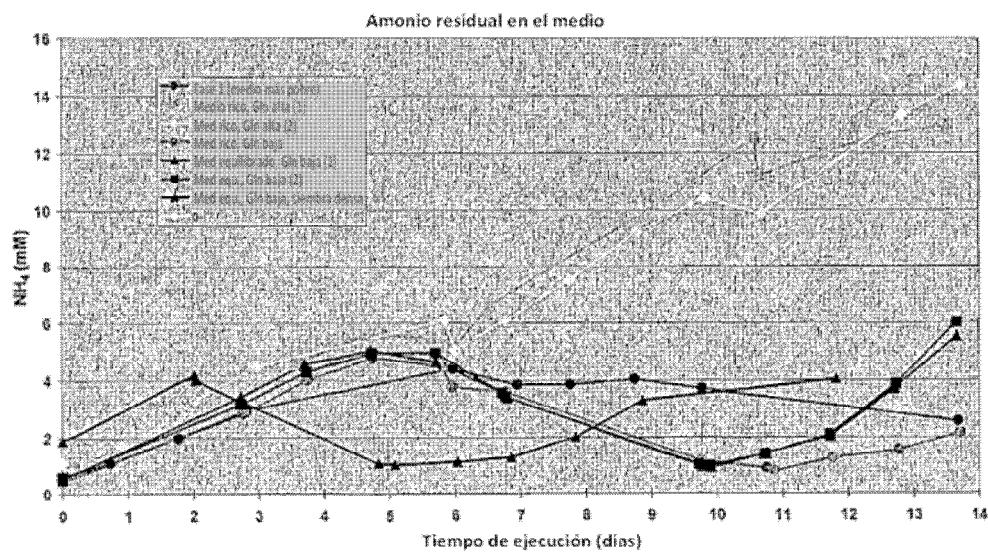


Figura 64. Titulo de anti-ABeta en distintas condiciones de medio ensayadas

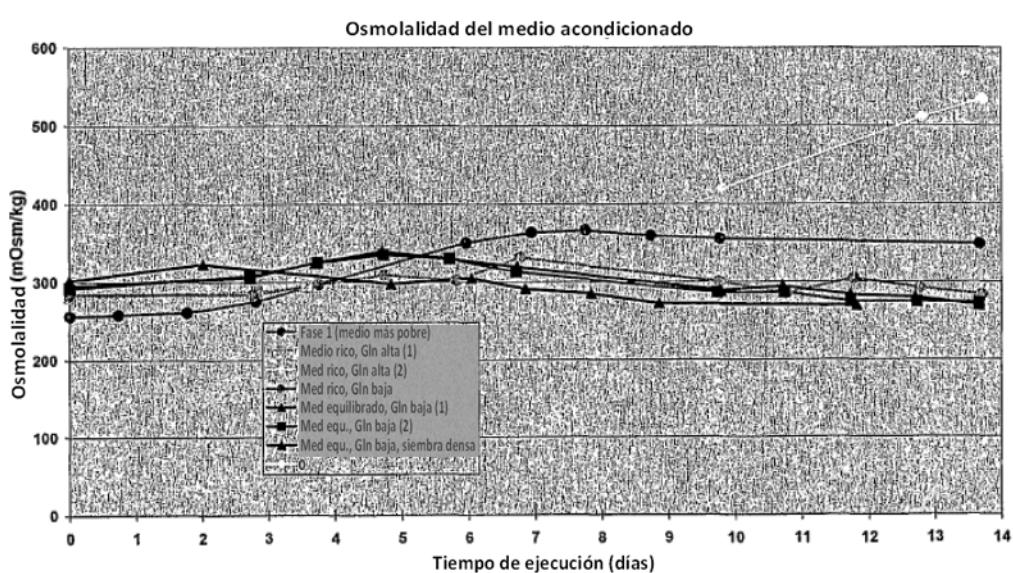
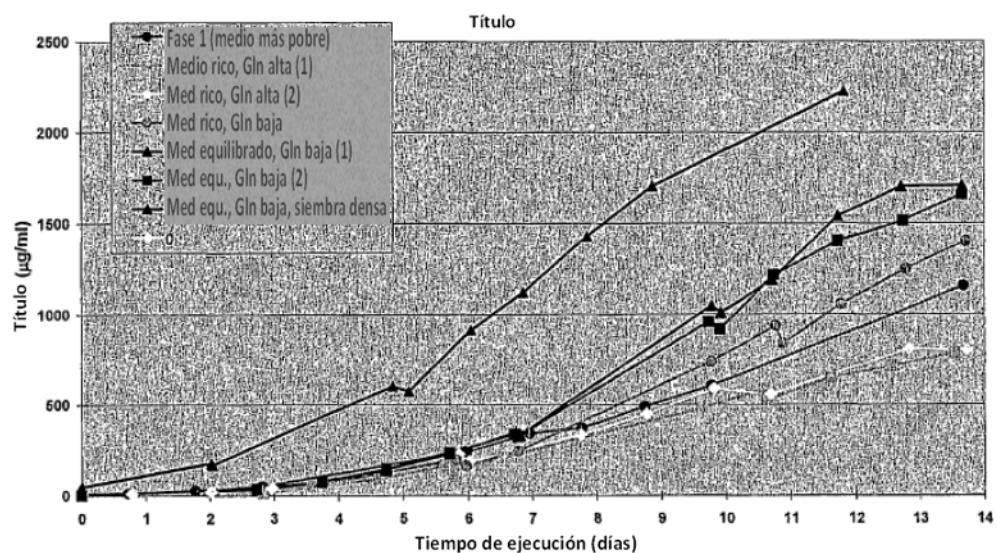


Figura 66. Crecimiento de células que expresan TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales

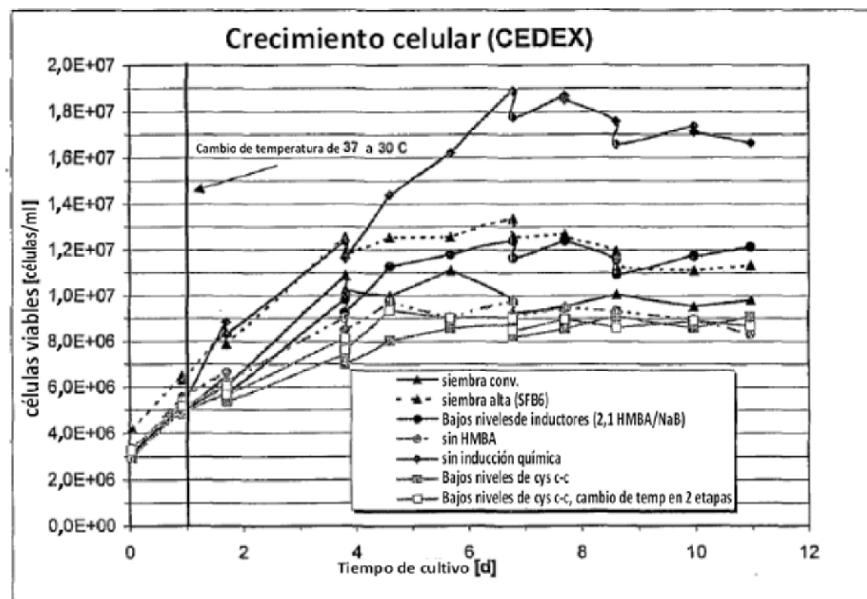


Figura 67. Viabilidad de células que expresan TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales

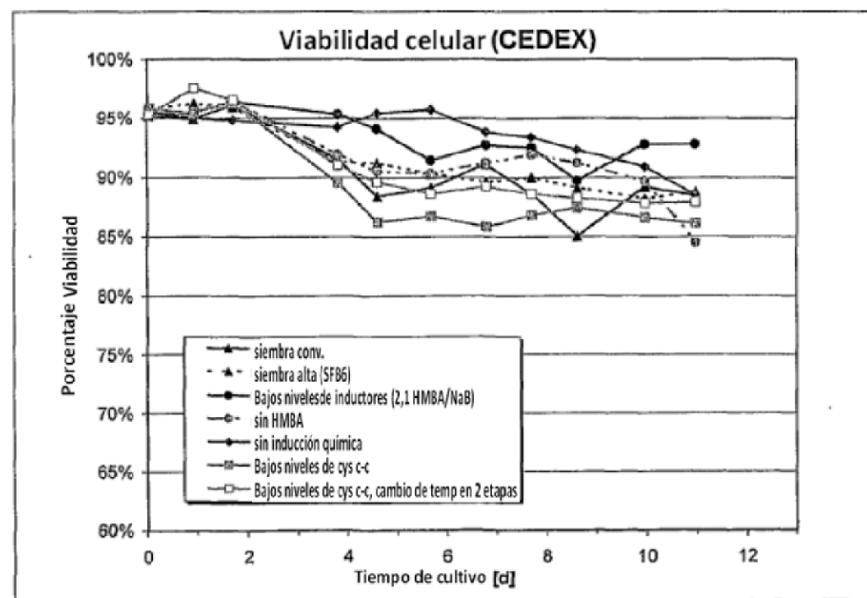


Figura 68. Glucosa residual en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales

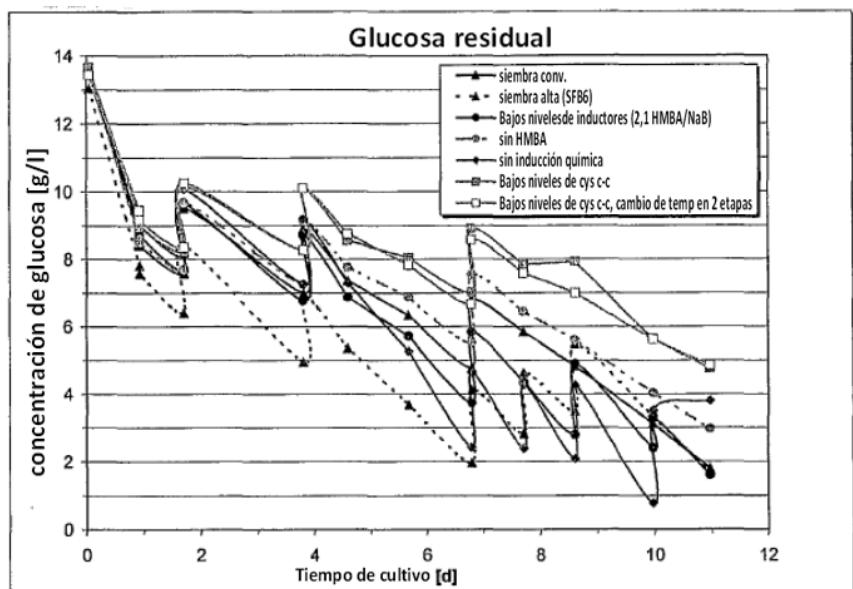


Figura 69. Niveles de glutamina en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales
various experimental conditions.

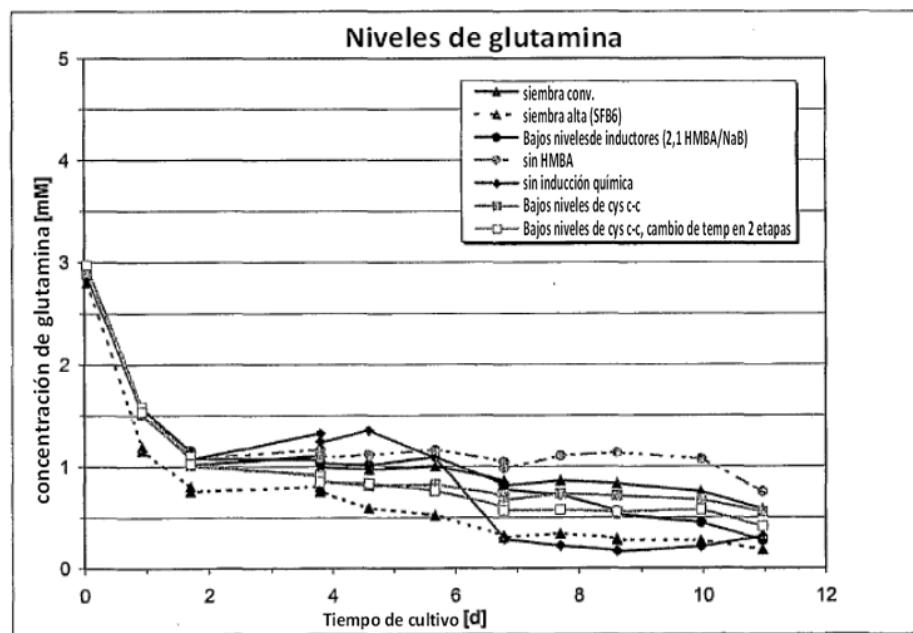


Figura 70. Concentración de lactato en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales

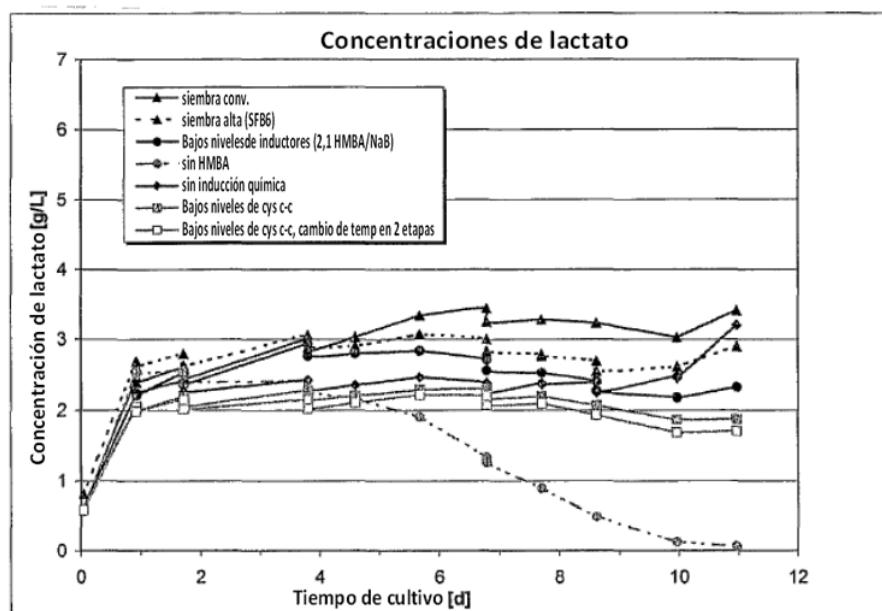


Figura 71. Niveles de amonio en cultivos de células que expresan TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales

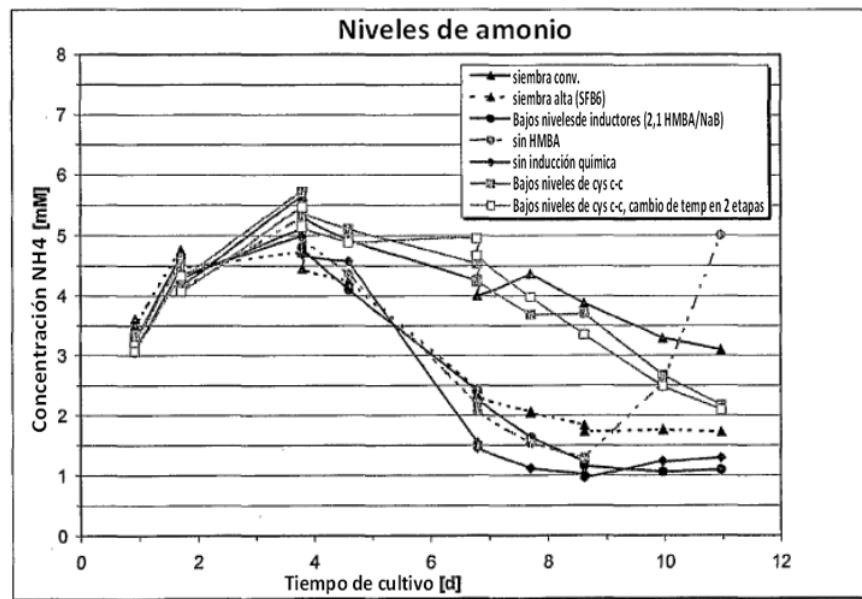


Figura 72. Título relativo de TNFR-Ig en distintas condiciones experimentales

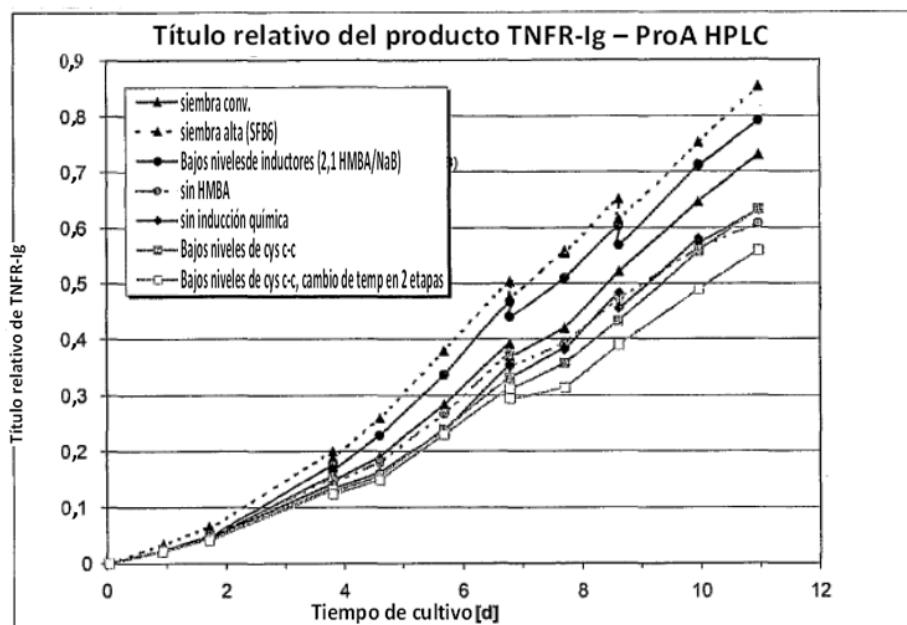


Figura 73. Densidades celulares de células anti-GDF-8 cultivadas en Biorreactores de 1 l y de 6000 l

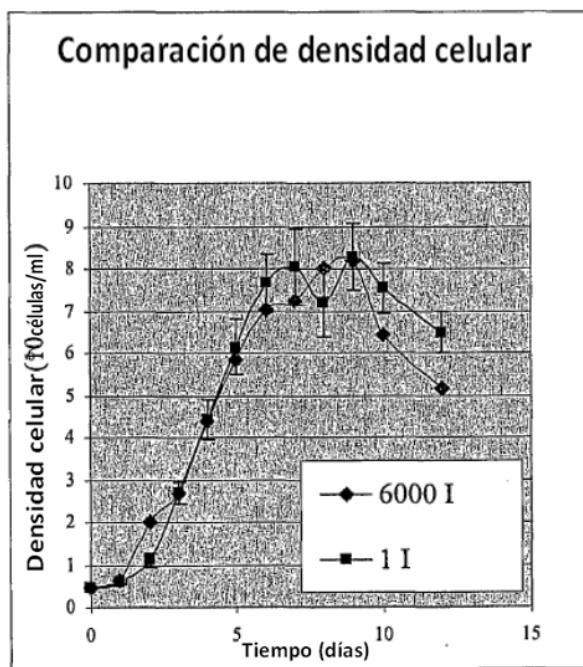


Figura 74. Títulos de células anti-GDF-8 cultivadas en Biorreactores de 1 l y de 6000 l

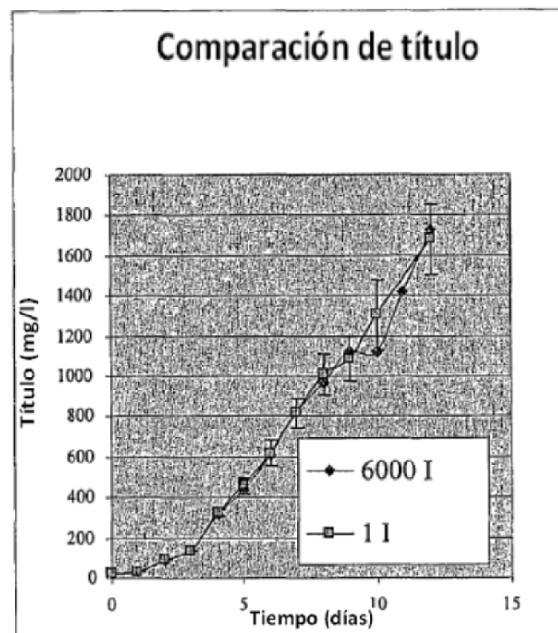


Figura 75. Niveles de lactato de células anti-GDF-8 cultivadas en Biorreactores de 1 l y de 6000 l

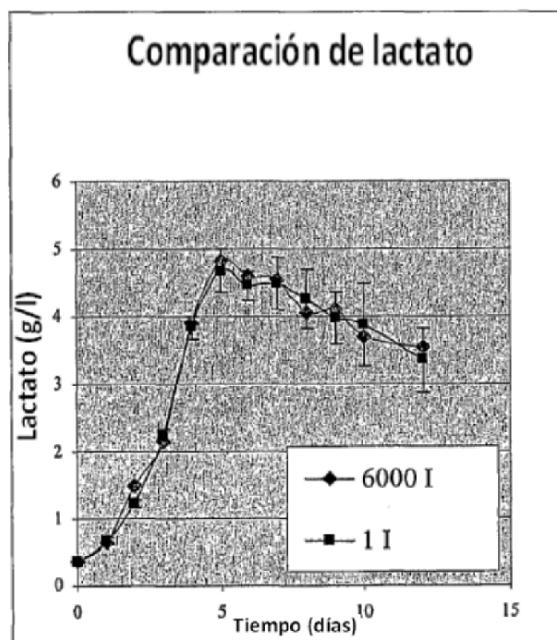


Figura 76. Niveles de amonio de células anti-GDF-8 cultivadas en Biorreactores de 1 l y de 6000 l

