(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 613 269**

(51) Int. CI.:

C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2010 PCT/US2010/051552**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO2011044180**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10765714 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2486048**

(54) Título: **Métodos para la producción de glucoproteínas en cultivos de células de mamífero usando glucocorticoides**

(30) Prioridad:

06.10.2009 US 278343 P
05.10.2010 US 897857

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2017

(73) Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

(72) Inventor/es:

JING, YING;
LI, ZHENGJIAN y
QIAN, YUEMING

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Métodos para la producción de glucoproteínas en cultivos de células de mamífero usando glucocorticoides

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos nuevos para cultivar células CHO que producen una molécula de CTLA4 soluble. La realización de los procedimientos de cultivo celular da como resultado una viabilidad celular elevada y también puede dar como resultado una calidad de producto y una productividad elevadas, una prolongación de la fase de crecimiento y la reducción de la tasa de mortalidad en la fase de muerte.

Antecedentes de la invención

El cultivo de células animales, en particular el cultivo de células de mamífero, se usa preferentemente para la expresión de proteínas glucosiladas producidas de forma recombinante, para aplicaciones terapéuticas y/ profilácticas. Los patrones de glucosilación de glucoproteínas recombinantes son importantes porque las cadenas laterales de oligosacáridos de las glucoproteínas afectan a la función proteica, así como a las interacciones intramoleculares entre diferentes regiones de una proteína. Dichas interacciones intramoleculares están implicadas en la conformación proteica y en la estructura terciaria de la glucoproteína. (Véase, por ejemplo, A. Wittwer et al., 1990, *Biochemistry*, 29:4175-4180; Hart, 1992, *Curr. Op. Cell Biol.*, 4:1017-1023; Goochee et al., 1991, *Bio/Technol.*, 9:1347-1355; y R.B. Parekh, 1991, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1:750-754). Además, los oligosacáridos pueden actuar dirigiendo un polipéptido particular a determinadas estructuras basadas en receptores de carbohidratos celulares específicos. (M.P. Bevilacqua et al., 1993, *J. Clin. Invest.*, 91:379-387; R.M. Nelson et al., 1993, *J. Clin. Invest.*, 91:1157-1166; K.E. Norgard et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1068-1072; e Y. Imai et al., 1993, *Nature*, 361-555-557).

Se sabe que el componente ácido siálico terminal de una cadena lateral de oligosacáridos de una glucoproteína tiene un efecto sobre numerosos aspectos de propiedades de una glucoproteína, incluidos absorción, solubilidad, estabilidad térmica, semivida en suero, eliminación del suero, así como sobre su estructura/comportamiento físico y químico y su inmunogenicidad. (A. Varki, 1993, *Glycobiology*, 3:97-100; R.B. Parekh, *Id.*, Goochee et al., *Id.*, J. Paulson et al., 1989, *TIBS*, 14:272-276 y A. Kobata, 1992, *Eur. J. Biochem.*, 209:483-501; E.Q. Lawson et al., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.*, 220:572-575; y E. Tsuda et al., 1990, *Eur. J. Biochem.*, 188:405-411).

La cantidad de ácido siálico en glucoproteínas se ve afectada por dos procesos opuestos: la adición intracelular de ácido siálico mediante la actividad de la sialiltransferasa y la eliminación extracelular de ácido siálico mediante escisión por sialidasa.

La adición intracelular de ácido siálico es la última etapa del proceso de glucosilación que tiene lugar en el trans-Golgi. Esto implica la transferencia enzimática de ácido siálico desde el precursor de azúcar del nucleótido, CMP-ácido siálico, a una galactosa disponible en la estructura glucano emergente que está unida a una proteína recién sintetizada. Posibles limitaciones de este proceso que pueden causar la sialilación incompleta incluyen la disponibilidad de CMP-ácido siálico, la actividad de la enzima sialiltransferasa, la cantidad de galactosa en la estructura glucano emergente y la actividad de la enzima galactosiltransferasa. Una serie significativa de investigaciones se ha centrado en maximizar la sialilación mediante la sobreexpresión génica y la potenciación de la actividad enzimática de la sialiltransferasa y de la glucosiltransferasa. Zhang et al. (Biochim Biophys Acta 1425(3):1998, 441-52) han indicado que la expresión de α-2,6-sialiltransferasa humana en células CHO con la producción de activador del plasminógeno hístico (tPA) potencia la α-2,6-sialilación de tPA. Weikert et al. (Nat Biotechnol 17(11):1999, 1116-21) han reseñado que la coexpresión de α-2,3-sialiltransferasa y β-1,4-galactosiltransferasa se traduce en una sialilación superior al 90 % de TNK-tPA y TNFR-IgG. Además, la suplementación con la cantidad apropiada de manganeso (Mn^{2+}), un cofactor para la β-1,4-galactosiltransferasa, disminuyó en gran medida la cantidad de rHuEPO en la fracción sialilada inferior, aumento la ocupación del sitio carbohidrato y redujo la ramificación del carbohidrato (Zhang et al. 1998) a estructuras biantenarias en dichas especias sialiladas inferiores (Crowell et al. Biotechnol Bioeng 96(3):538-49,2007).

La cantidad de ácido siálico en glucoproteínas se ve afectada también por la eliminación extracelular de ácido siálico mediante escisión por sialidasa. Gramer y Goochee (Biotechnol Prog 9(4):366-73,1993) han demostrado un aumento de lactato deshidrogenasa (LDH), que se traduce en un aumento de la lisis celular, asociado a un aumento de la actividad de sialidasa extracelular in cultivos en perfusión de CHO. Gu et al.(Biotechnol Bioeng 55(2):390-8, 1997) ilustran también una pérdida notable de ácidos siálicos terminales de interferón-γ (IFN-γ) junto con una disminución de viabilidad celular en células CHO y el aumento concomitante de células muertas en todo el cultivo en lotes a largo plazo.

En consecuencia, es esencial retrasar la aparición de muerte celular y mejorar la viabilidad celular para reducir o evitar el efecto de degradación.

En general, los niveles de expresión de proteínas en sistemas basados en cultivos de células de mamíferos son

considerablemente inferiores que en los sistemas de expresión microbiana, por ejemplo, sistemas de expresión bacteriana o de levaduras. No obstante, las células bacterianas y de levadura están limitadas en su capacidad para expresar de forma óptima productos proteicos de alto peso molecular, plegar apropiadamente una proteína que tiene una estructura estérica compleja y/o proporcionar las modificaciones postraduccionales necesarias para madurar una glucoproteína expresada, afectando, por consiguiente, la inmunogenicidad y la tasa de eliminación del producto.

Como consecuencia de las limitaciones del cultivo de células animales o de mamíferos, en particular de células animales o de mamíferos que producen productos recombinantes, se ha investigado la manipulación de varios parámetros, incluidos el empleo de recipientes de cultivo a gran escala, la alteración de las condiciones básicas de cultivo, tales como la temperatura de incubación, la concentración de oxígeno disuelto, el pH y similares, el uso de diferentes tipos de medios y de aditivos de los medios y el aumento de la densidad de las células cultivadas. Además, el desarrollo del proceso de cultivo de células de mamífero se beneficiaría de los avances en la capacidad para prolongar los tiempos de ejecución para aumentar la concentración final de producto mientras se mantiene una calidad alta de producto. Un parámetro importante de calidad del producto es el grado y la completación de la estructura de glucosilación de un producto polipeptídico, usándose comúnmente como medida de la calidad de glucoproteínas el contenido de ácido siálico.

Los tiempos de ejecución de los procesos de cultivo celular, en particular los procesos no continuos, están limitados generalmente por la viabilidad remanente de las células, que disminuye habitualmente con el transcurso del proceso. Se desea, por lo tanto, la máxima prolongación posible de las viabilidades celulares altas. Las consideraciones sobre la calidad del producto ofrecen también una motivación para minimizar disminuciones en la densidad celular viable y mantener una viabilidad celular alta, ya que la muerte celular puede liberar sialidasas al sobrenadante del cultivo, lo que puede reducir el contenido de ácido siálico de la proteína expresada. Las consideraciones sobre la purificación proteica ofrecen también otra motivación para minimizar disminuciones en la densidad celular viable y mantener una viabilidad celular alta. La presencia de desechos celulares y el contenido de células muertas en el cultivo pueden influenciar negativamente en la capacidad para aislar y/o purificar el producto proteico al final del proceso de cultivo. Manteniendo células viables en cultivo durante un periodo más largo, existe, por lo tanto, una reducción concomitante de la contaminación del medio de cultivo debida a proteínas y enzimas celulares, por ejemplo, proteasas y sialidasas celulares que pueden provocar la degradación y la reducción última de la calidad de las glucoproteínas deseadas producidas por las células.

Se han investigado diversos parámetros para lograr una viabilidad celular alta en cultivos celulares. Un parámetro implicó una disminución única de la temperatura del cultivo después de un cultivo inicial a 37 ºC (por ejemplo, Roessler et al., 1996, *Enzyme and Microbial Technology*, 18:423-427; documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.705.364 y 5.721.121 por T. Etcheverry et al., 1998; documento de patente de Estados Unidos n.º 5.976.833 por K. Furukawa et al., 1999; documento de patente de Estados Unidos n.º 5.851.800 por L. Adamson et al.; documentos WO 99/61650 y WO 00/65070 por Genentech, Inc.; documento WO 00/36092 por Biogen, Inc.; y documento de patente de Estados Unidos n.º 4.57.22 por Girard et al.).

Otros parámetros investigados implicaron la adición de componentes al cultivo. Se demostró que el inhibidor del factor de crecimiento suramina previene la apoptosis durante el crecimiento exponencial de células CHO K1:CycE (Zhangi et al., Biotechnol. Prog. 2000, 16, 319-325). No obstante, la suramina no protegió frente a la apoptosis durante la fase de muerte. Como resultado, la suramina fue capaz de mantener una viabilidad alta durante la fase de crecimiento, pero no provocó un prolongamiento de la longevidad del cultivo. Los mismos autores informan que para la línea celular CHO 111-10PF, el sulfato de dextrano y el sulfato de polivinilo podrían, similarmente a la suramina, aumentar la densidad celular viable y la viabilidad relativa al cultivo de control en el día 3. No obstante, no se informó del efecto del sulfato de dextrano o del sulfato de polivinilo durante la fase de muerte. También se informó que la suramina, el sulfato de dextrano y el sulfato de polivinilo son eficaces en la prevención de la agregación celular.

M. Xia et al. (1999, CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences, 55:1649-1656) han descubierto que la dexametasona potencia la expresión de CTLA4 durante la activación de células T en cultivos de esplenocitos de ratón.

C.M. Coughlan et al. (1997, FEBS Letters, 413:389-393) han estudiado las consecuencias bioquímicas de la inducción de sialiltransferasa por dexametasona en la expresión de sialoglucoproteínas en la línea celular de hepatoma de rata H411e.

V. Vandamme et al. (1993, Eur. J. Biochem., 211:135-140) describen la inducción de la transcripción de β-galactósido α-2,6-sialiltransferasa en fibroblastos de rata por dexametasona.

M.L. Lipscomb et al. (2004, Biotechnol. Prog., 20:1402-1407) describen la sobreexpresión de una glucoproteína, es decir, fosfatasa alcalina secretada, SEAP, a partir de un promotor inducible por glucocorticoides en células de ovario de hámster chino (CHO) recombinantes cultivadas en un sistema de biorreactor en perfusión de alta densidad.

Los efectos de suplementar los medios de cultivo de células de insectos con dexametasona o N-acetilmanosamina sobre proteínas de glucosilación complejas, incluida la adición de residuos terminales de ácido siálico a

oligosacáridos unidos a N, preparados mediante el sistema vector de expresión de baculovirus (BEVS) se da a conocer en el documento de patente de Estados Unidos n.º 6.472.175 por Boyce Thompson Institute For Plant Research, Inc. (Ithaca, NY, EEUU), 2002.

El documento AU 2004 201 287 A1 se refiere a una molécula de CTLA4 soluble y a un método para producir esta proteína que comprende cultivar un sistema de vector huésped en una célula hospedadora eucariota.

P.S. Linsley et al. (1992, Science, 257:792-795) describen que la inmunosupresión se logra *in vivo* mediante tratamiento de CTLA4Ig. El CTLA4Ig se produjo a partir de células CHO transfectadas de manera estable y se describe como una forma soluble del dominio extracelular de CTLA4.

Los productos terapéuticos proteicos son inherentemente heterogéneos debido a su tamaño, complejidad de estructura y la naturaleza de producción biológica (Chirino y Mire-Sluis, *Nat Biotechnol*. 2004; 22:1383-1391). Incluso en el solución proteica "pura", estarán presentes algunos porcentajes de fragmentos de peso molecular bajo, especies de peso molecular alto y varios grados de modificaciones químicas. La formación de especies de alto peso molecular se debe generalmente a la agregación de proteínas, lo que es un problema común que se presenta durante la fabricación de productos biológicos. Habitualmente, la presencia de agregados se considera no deseable, debido al problema de que los agregados pueden provocar una reacción inmunógena o pueden causar reacciones adversas sobre la administración (Cromwell et al., *AAPS J*. 2006; 8:E572-579). Aunque algunos tipos de agregados de productos biológicos pueden actuar con normalidad, es también importante mantener la consistencia en la calidad del producto ya que la consistencia del producto es un prerrequisito para la aprobación regulatoria.

Los agregados de proteínas pueden generarse por medio de varios mecanismos y tener lugar en cada etapa durante el proceso de fabricación. En cultivo celular, las proteínas secretadas pueden exponerse a condiciones desfavorables para la estabilidad proteica, pero más frecuentemente, la acumulación de altas cantidades de proteína puede provocar la agregación intracelular debido bien a las interacciones de proteínas no plegadas o bien al reconocimiento ineficaz de la cadena peptídica incipiente por chaperones responsables del plegamiento apropiado (Cromwell et al, *AAPS J*. 2006; 8:E572-579). En el retículo endoplásmico (RE) de las células, se forman enlaces disulfuro en proteínas recién sintetizadas en un ambiente oxidante. En condiciones normales, los sulfhidrilos proteicos se oxidan de forma reversible dando disulfuros y ácidos sulfénicos proteicos, pero los estados oxidados más elevados tales como las formas de ácido sulfínico o sulfónico de cisteínas proteicas son irreversibles (Thomas y Mallis, *Exp Gerontol.* 2001; 36:1519-1526). Las proteínas hiperoxidadas pueden contener enlaces disulfuro incorrectos o tener enlaces disulfuro mixtos con otras proteínas RE luminales, en cuyo caso provocan el plegamiento inapropiado y la agregación de las proteínas. Por lo tanto, es crucial mantener un ambiente oxidante controlado de forma apropiada en el RE. A este respecto, Cuozzo y Kaiser (*Nat Cell Biol.* 1999;1:130-135) demostraron inicialmente que, en levaduras, el glutatión actuaba como tampón frente a la hiperoxidación del RE y más adelante Chakravarthi y Bulleid (*J Biol Chem*. 2004; 279:39872-39879) confirmaron que, en células de mamífero, también se precisaba de glutatión para regular la formación de enlaces disulfuro nativos dentro de proteínas que entran en la ruta de secreción.

Con el aumento de la concentración del producto en el cultivo, puede observarse en los procesos de cultivo celular que la calidad del producto disminuye, tal como se determina por el contenido de ácido siálico medido en la glucoestructura de oligosacáridos. Generalmente, existe un límite inferior para un contenido de ácido siálico aceptable, tal como determinan los estudios de eliminación de fármacos. Una gran abundancia de una proteína producida por células en cultivo está acompañada óptimamente por una calidad alta de la proteína que se recupera en última instancia para el uso pretendido.

Los productos proteicos producidos de manera recombinante que están apropiadamente glucosilados se están volviendo médica y clínicamente importantes de forma creciente para uso como agentes terapéuticos, de tratamiento y profilácticos. Por lo tanto, el desarrollo de procesos fiables de cultivo celular que logren económica y eficazmente un aumento en la concentración final de producto proteico, junto con un nivel elevado de calidad del producto, tal como se determina por el contenido de ácido siálico, cumple el objetivo deseado y requerido en la técnica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procesos nuevos para la producción de moléculas de CTLA4 solubles, preferentemente moléculas de CTLA4 solubles recombinantes, por medio de cultivos de células CHO. Estos procesos nuevos logran aumentar la densidad celular viable en la fase tardía, la viabilidad celular, la productividad y el contenido de ácido siálico y disminuir la agregación de proteínas.

De acuerdo con la invención, se añaden niveles no tóxicos de glucocorticoides a los medios. Los procesos de cultivo celular de la presente invención pueden lograr ventajosamente una potenciación de la productividad específica, por ejemplo, una molécula de CTLA4 soluble, así como una potenciación del contenido de la molécula de CTLA4 soluble producida por las células cultivadas. Mas específicamente, de acuerdo con la presente invención, la adición de glucocorticoides durante el periodo de cultivo celular mantiene una viabilidad celular alta de las células del cultivo y puede proporcionar una cantidad alta y una calidad elevada de producto producido a lo largo de toda la realización

del cultivo. La adición de glucocorticoides a los procesos de cultivo puede conducir, ventajosamente, a la prolongación de la fase de producción del cultivo. Durante la fase de producción prolongada, se aumenta la valoración del producto deseado; la calidad del producto, caracterizada por el contenido de ácido siálico, se mantiene a un nivel elevado, el nivel de agregación de proteínas se mantiene a niveles inferiores y la viabilidad celular se mantiene también a un nivel elevado. Además, la fase de producción prolongada asociada a los procesos de cultivo de la presente invención permite una producción de producto que excede lo que se produce durante una fase de producción estándar.

La presente invención proporciona un proceso (o método) en el que se potencia la productividad específica, el nivel de agregación de proteínas se reduce y el contenido de ácido siálico de la molécula de CTLA4 producida es superior, mediante la adición de glucocorticoides. El compuesto glucocorticoide es preferentemente dexametasona. De acuerdo con este aspecto particular, la adición de glucocorticoides mantiene una viabilidad celular alta del cultivo, permitiendo, por lo tanto, una fase de producción prolongada, durante la que la valoración del producto, preferentemente el producto recombinante, se aumenta y la calidad del producto, caracterizada por el contenido de ácido siálico, se mantiene a un nivel elevado. La adición de glucocorticoides puede minimizar la relación de correspondencia predominante entre la valoración de las proteínas y el contenido de ácido siálico en la producción de producto durante el proceso de cultivo celular. De este modo, la adición de glucocorticoides proporciona un efecto positivo sobre la potenciación de un parámetro de realización importante del proceso de cultivo, es decir, el producto matemático de “valoración final” x “ácido siálico final” X “contenido de monómeros” (“valoración final x ácido siálico final” x “contenido de monómeros final”).

En un aspecto de la presente invención, el compuesto glucocorticoide se añade a un cultivo en el momento de la inoculación o en un momento posterior a la inoculación anterior al comienzo de la fase de muerte inicial, o durante la fase de crecimiento inicial o durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial, o al final o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial. De acuerdo con este aspecto de la invención, la fase de crecimiento se prolonga y/o la aparición de la fase de muerte se retrasa durante un periodo tal como varios días.

En otro aspecto preferente de la presente invención y tal como se describe posteriormente en el presente documento, los procesos de cultivo celular recién desarrollados que implican la adición de un compuesto corticoide, son especialmente adecuados para producir moléculas CTLA4 solubles y moléculas mutantes de CTLA4 solubles, tales como CTLA4Ig y L104EA29YIg, por células hospedadorasCHO diseñadas genéticamente para expresar y producir estas proteínas. Realizaciones preferentes de la presente invención abarcan el cultivo de células que producen CTLA4Ig y L104EA29YIg que implica la adición de un compuesto corticoide durante la realización del cultivo para lograr grandes cantidades de productos CTLA4Ig y L104EA29YIg de calidad alta, tal como se determina por la medición de ácido siálico y/o la baja agregación de proteínas en los productos finales.

Otros aspectos, características y ventajas de la presente invención se apreciarán con una lectura de la descripción detallada de la invención y una observación de los dibujos/figuras.

Descripción de los dibujos/figuras

La Fig. 1 muestra las expresiones de β-1,4-galactosiltransferasa (1A) y α-2,3-sialitransferasa (1B) aumentadas, en general, con concentración de dexametasona (DEX) en las células CHO tratadas con DEX, tal como se describe en el Ejemplo 1. La DEX se añadió el segundo día después de la incoculación a los cultivos a concentraciones de desde 0,1 a 10 10 μM. El quinto día después de la inoculación se recogieron muestras celulares y se prepararon lisados celulares completos, se separaron sobre un gel de gradiente 4-15 % y se examinaron con el anticuerpo para cada glucotransferasa. La mancha se volvió a examinar con el anticuerpo beta-actina para evaluar la igualdad de carga.

La Fig. 2 muestra el efecto citoprotector de DEX que se traduce en una reducción de la actividad de sialidasa en el sobrenadante del cultivo tal como se describe en el Ejemplo 1. La figura muestra la viabilidad celular (2A) y los perfiles de absorbancia del ensayo de actividad de sialidasa en el sobrenadante (2B) a lo largo del periodo de cultivo entre cultivos tratados con DEX y cultivos no tratados. Los tratamientos con DEX a concentraciones 1 μM se iniciaron el día 2. Los valores reflejan la desviación media y típica de datos de cinco experimentos.

La Fig. 3 muestra mejoras en la sialilación de glucoproteínas en los cultivos tratados con análogos de glucocorticoides, hidrocortisona (HYC) y prednisolona (PRD) tal como se describe en el Ejemplo 1. El contenido normalizado de ácido siálico total (3A) y la fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N de cultivos tratados con DEX, HYC y PRD, respectivamente. El tratamiento se inició el segundo día después de la inoculación a una concentración 0,1, 1 y 10 μM en el medio para cada compuesto. Se dan valores de cada parámetro como media ± diferencia/2 (n = 2).

La Fig. 4 muestra que la potenciación de la sialilación con DEX se bloqueó mediante el antagonista de glucocorticoides RU-486 tal como se describe en el Ejemplo 1. Contenido normalizado de ácido siálico total (4A) y fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N (4B) en presencia y ausencia de RU-486. El RU-486, a concentración 0 o 1 μM, se introdujo en una suspensión de cultivo celular 48 horas después de la inoculación. Después se añadió DEX a concentración 0,1, 1 y 10 μM al cultivo 24 horas más tarde. Se dan valores de cada parámetro como media ± diferencia/2 (n = 2).

La Fig. 5 muestra que los cultivos semicontinuos de células CHO tratadas con DEX en biorreactores de 5 litros

dieron como resultado un aumento del contenido de ácido siálico y fracciones de especies sialiladas tal como se describe en el Ejemplo 1. Contenido normalizado de ácido siálico total (5A) y fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N (5B) de cultivos no tratados y tratados a lo largo de los cultivos. Se dan valores de cada parámetro como media ± desviación típica (n = 3). El valor normalizado es el valor real dividido entre un valor arbitrario.

La Fig. 6 muestra la capacidad de DEX para mejorar la sialilación de glucoproteína en biorreactores de 7, 10 y 20 litros de escala tal como se describe en el Ejemplo 1. Se resume la relación molar de ácido siálico total final normalizada frente a la fracción sialilada normalizada de cultivos tratados con DEX y no tratados de diferentes ejecuciones. El valor normalizado es el valor real dividido entre un valor arbitrario.

La Fig. 7 muestra el porcentaje reducido de especies de alto peso molecular (HMW) en las proteínas de fusión IgG mediante células CHO tratadas con dexametasona (DEX) tal como se describe en el Ejemplo 2. 7A: todas las células se cultivaron inicialmente juntas en el mismo matraz de agitación durante dos días y después se dividieron en dos grupos, recibiendo la mitad de ellas una dosis única de DEX a una concentración final de 1 μM en medio basal. Los sobrenadantes se recogieron el día 10 y se purificaron antes del análisis SEC-HPLC para determinar porcentajes de especies HMW. Los puntos de datos son medias (± D.T.) de los resultados de cinco matraces de agitación en un único experimento. **P < 0,01 en comparación con el control. (CON). 7B: se añadió DEX a varias concentraciones a los cultivos de células CHO el día 2 y se recogieron sobrenadantes el día 10. Los puntos de datos son medias de los resultados obtenidos de matraces por duplicado. 7C: todos los cultivos se iniciaron al mismo tiempo, pero se añadió DEX 1 μM en diferente día, dando tiempos de incubación diferentes tal como se ha indicado, cuando las células se recolectaron al mismo tiempo el día 10. Los puntos de datos son medias de los resultados de matraces por duplicado.

La Fig.8 muestra el aumento de expresión de glutatión reductasa en las células CHO tratadas con dexametasona (DEX) tal como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió DEX a varias concentraciones a los cultivos celulares el día de la inoculación y las muestras celulares se recolectaron el día 5. Los lisados celulares completos se separaron sobre un gel de gradiente 4-15 %. Después de la detección de glutatión reductasa, se usó la misma mancha para detectar la β-actina para la comparación de carga de muestra.

La Fig. 9 muestra el porcentaje reducido de especies HMW en las proteínas de fusión IgG incubadas con GSH *in vitro* tal como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió glutatión reducido (GSH) a concentraciones finales 0,1 y 3 mM a la solución tamponada Tris-acetato (pH de 7,5) de proteínas de fusión IgG purificadas y la mezcla de GSH y proteínas se incubó a 37 °C durante 1 h antes del análisis SEC-HPLC. Los puntos de datos son medias (± D.T.) de cuatro determinaciones a partir de dos experimentos. *P < 0,05 en comparación con el control (GSH 0 mM).

La Fig. 10 muestra los efectos atenuados de dexametasona (DEX) en presencia del antagonista del receptor de los glucocorticoides RU-486 tal como se describe en el Ejemplo 2. 10A: se prepararon lisados celulares completos a partir de HepG-2 no tratado y células CHO y se separaron sobre un gel de gradiente 4-15 %. La muestra de HepG-2 se usó como control de origen humano con propósitos de validación del anticuerpo primario. 10B: se introdujo RU-486 a concentración 1 μM en el cultivo un día después de la inoculación (día 1) y las células CHO pretratadas con RU-486 se dividieron el día 2, recibiendo la mitad de las mismas una dosis única de DEX a una concentración final 0,1 μM en medio basal. Las muestras celulares se recogieron el día 10; todos los otros procesos fueron similares a los de la Fig. 2. 10C: se introdujo RU-486 a concentración 1 μM en el cultivo el día 1 y después se añadió DEX a los cultivos pretratados con RU-486 a una concentración final bien 0,1 μM o bien 1 μM el día 2. Los sobrenadantes se recogieron el día 10. Los puntos de datos son medias de los resultados a partir de recipientes por duplicado.

La Fig. 11 muestra que la muerte celular se inhibe mediante DEX en cultivos de células CHO en medio exento de suero tal como se describe en el Ejemplo 3. Las curvas de dosis-respuesta del efecto de DEX sobre la densidad celular viable (11A) y la viabilidad (11B) con tratamientos comenzaron el día 2. Las curvas tiempo-transcurso del proceso del efecto de DEX sobre la densidad celular viable (11C) y la viabilidad (11D) con una concentración de tratamiento 1 μM. Cada valor es la media de los datos obtenidos en los experimentos realizados por duplicado.

La Fig. 12 muestra que la velocidad de crecimiento específico de células CHO disminuye mientras aumenta la productividad específica celular mediante DEX tal como se describe en el Ejemplo 3. Los efectos de DEX sobre la velocidad de crecimiento específico de células CHO (12A), la productividad volumétrica normalizada (12B) y la productividad específica celular normalizada (12B). Los tratamientos con DEX comenzaron el día 2. Los valores reflejan la media y la desviación típica de datos procedentes de cinco experimentos. El valor normalizado es el valor real dividido entre un valor arbitrario.

La Fig. 13 muestra que la regulación al alza del gen GILZ antiapoptótico en las células CHO tratadas con DEX se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de inmunotransferencia, tal como se describe en el Ejemplo 3. (13A) Se añadió DEX a los cultivos por triplicado el segundo día después de la inoculación en una concentración final de 0 y 1 μM, respectivamente. Las muestras de ARNm se extrajeron el 5º y 8º día después de la inoculación. Los valores de cada parámetro se dieron como media ± desviación típica (n = 3). (13B) Se añadió DEX a los cultivos por triplicado el 2º día después de la inoculación a una concentración final de 0 y 1 μM, respectivamente. Las muestras de células se recogieron y los lisados celulares completos se prepararon el 5º y el 8º día después de la inoculación.

La Fig.14 muestra que la actividad de supresión de muerte de la dexametasona implica a GILZ y el receptor de glucocorticoides, tal como se describe en el Ejemplo 3: El aumento de porcentaje (en comparación con el tratamiento no DEX) de viabilidad final (14A), el cambio de pliegue de la expresión del gen GILZ (14B) y la expresión de proteína GILZ inducida por DEX (14C) en presencia y ausencia de RU-486. Se introdujo RU-486, 0

o 1 μM, en la suspensión de cultivo celular 48 después de la inoculación y 24 horas después, se añadió a los cultivos DEX 0, 0,1 y 1 μM. Se recogieron células para los análisis de viabilidad, PCR cuantitativa a tiempo real y de inmunotransferencia Cada valor indicado en el panel A es la media de datos obtenidos de experimentos realizados por duplicado. Cada valor indicado en el panel B es la media y la desviación típica de datos obtenidos a partir de experimentos realizados por triplicado.

La Fig. 15 muestra que los cultivos semicontinuos de células CHO tratadas con DEX en biorreactores de 10 litros dieron como resultado una mejora en la VCD, viabilidad, valoración y relación molar de ácido siálico tal como se describe en el Ejemplo 3. Los perfiles de la densidad celular viable (15A), la viabilidad (15B), y la valoración normalizada (15C) de cultivos no tratados y cultivos tratados por tratamiento con DEX comenzaron el día 2 y el día 7. El valor normalizado es el valor real dividido por un valor arbitrario.

La Fig. 16 muestra los efectos de DEX sobre el crecimiento celular del cultivo celular CHO con secreción de CTLA4Ig. Las curvas dosis-respuesta del efecto de DEX sobre la densidad celular viable (16A) y la viabilidad (16B) de los cultivos tratados con DEX a una concentración final 0, 0,001, 0,01, 0,1,1 y 10 μM, respectivamente. El tratamiento se inició el segundo día después de la inoculación y cada valor es la media de datos obtenidos a partir de experimentos realizados por duplicado.

La Fig. 17 muestra los efectos de DEX sobre la relación molar de ácido siálico y los niveles HMW de CTLA4Ig. La figura muestra la relación molar de ácido siálico total final (17A) y las especies HMW (17B) de cultivos tratados con DEX a una concentración final 0, 0,001, 0,01, 0,1,1 y 10 μM, respectivamente. El tratamiento se inició el segundo día después de la inoculación y cada valor es la media de datos obtenidos a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores indicados en el panel A son valores normalizados, que son el valor real dividido por un valor arbitrario.

La FIG. 18 muestra la factibilidad de incluir DEX en la producción de glucoproteína recombinante a gran escala, tal como se describe en el Ejemplo 5. La figura muestra la densidad celular viable (18A), la viabilidad (18B), la valoración normalizada (18C) y el contenido normalizado de ácido siálico (18D) de la glucoproteína recombinante producida a escalas de 7 l (n = 16) y 500 l (n = 6) y 5.000 l (n = 3), respectivamente. Los valores reflejan la media y la desviación típica de datos procedentes de múltiples experimentos realizados a cada escala. El valor normalizado es el valor real dividido por un valor arbitrario. Se utilizó el mismo divisor para la normalización en todas las escalas.

La FIG. 19 representa una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) y una secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID NO:2) de una CTLA4Ig que tiene un péptido de señalización, una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4, que comienza en metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124 o comienza en alanina en la posición –1 hasta ácido aspártico en la posición +124, y una región Ig.

La FIG. 20 representa una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:3) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) de una molécula mutante de CTLA4 (L104EA29YIg) que tiene un péptido de señalización, un dominio extracelular mutante de CTLA4, que comienza en metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124 o comienza en alanina en la posición –1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, y una región Ig.

La FIG. 21 representa una secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:5) y una secuencia de aminoácidos completa codificada (SEQ ID NO:6) del receptor CTLA4 humano (denominado como CTLA4 de “tipo silvestre” en el presente documento) fusionado con el péptido de señalización de la oncostatina M (posición -26 a -2). (Documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.434.131 y 5.844.095.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe procesos nuevos para la producción de glucoproteínas específicas, a saber, moléculas de CTLA4 solubles, preferentemente moléculas de CTLA4 solubles recombinantes, en cultivos de células CHO. Estos procesos logran aumentar la densidad celular viable, la viabilidad celular, la productividad y el contenido de ácido siálico y disminuyen la agregación de proteínas.

La invención está dirigida a proceso de cultivo celular tal como se define en las reivindicaciones. También se divulga en el presente documento un proceso de cultivo celular que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir un compuesto glucocorticoide al cultivo celular.

De acuerdo con la invención, los compuestos glucocorticoides incluyen, pero sin estar limitados a, hidrocortisona (disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), prednisona (disponible en Sigma-Aldrich), prednisolona (disponible en Sigma-Aldrich), metilprednisolona (disponible en Sigma-Aldrich), dexametasona (disponible en Sigma-Aldrich), betametasone (disponible en Sigma-Aldrich), triamcinolona (disponible en Sigma-Aldrich), acetato de fludrocortisona (disponible en Sigma-Aldrich). Los compuestos están fácilmente disponibles en las fuentes enumeradas o se pueden obtener fácilmente por medios conocidos por un experto en la técnica.

Los compuestos glucocorticoides preferentes incluyen, pero no están limitados a, hidrocortisona, prednisolona, betametasona y dexametasona. El más preferente es la dexametasona.

En una realización de la invención, el compuesto glucocorticoide se añade en la inoculación o puede ser un componente del medio basal. La inoculación tiene lugar el día 0.

En una realización de la invención, el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación, es decir, no está presente en el medio basal y no está presente en la inoculación. Preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade el día 1 del cultivo o posteriormente.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto glucocorticoide puede añadirse al cultivo celular una vez, dos veces, tres veces o cualquier número de veces durante un periodo específico. Pueden usarse conjuntamente uno o más compuestos glucocorticoides. Es decir, cualquier adición única dada de un compuesto glucocorticoide puede incluir la adición de uno o más compuestos glucocorticoides adicionales. De modo similar, si se produce más de una adición de un compuesto glucocorticoide, pueden añadirse diferentes compuestos glucocorticoides en adiciones diferentes. Pueden añadirse al cultivo compuestos y sustancias adicionales, incluidos compuestos glucocorticoides, antes, con o después de la adición del compuesto glucocorticoide, bien durante o bien fuera del periodo especificado. En una realización preferente, se produce una adición única, es decir, una vez, de compuesto glucocorticoide. En una realización preferente, se añade un compuesto glucocorticoide.

De acuerdo con la invención, puede añadirse el compuesto glucocorticoide al cultivo celular por cualquier medio. Los medios de adición del compuesto glucocorticoide incluyen, pero no están limitados a, disuelto en DMSO, disuelto en un disolvente orgánico, disuelto en agua, disuelto en un medio de cultivo, disuelto en medio nutriente, disuelto en un medio adecuado, en la forma en que se obtiene o en cualquier combinación de los mismos.

Preferentemente, la DEX se añade en forma de una solución en la que la DEX está disuelta en etanol y después se diluye con agua para su uso posterior (es decir, tal como se añade la DEX al medio nutriente).

De acuerdo con la invención, el compuesto glucocorticoide se añade para llevar la concentración en el cultivo a un nivel apropiado. Como ejemplos no limitantes, el compuesto glucocorticoide se añade a una concentración 1 nM – 1 mM. Preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade a una concentración de cantidades objetivo 1 nM – 0,1 μM o 0,1 μM – 10 μM; de modo más preferentemente aproximadamente 5 nM – 15 nM o 0,5 μM – 5 μM; de modo más preferente aproximadamente 10 nM o 1 μM.

De acuerdo con la invención, el cultivo puede realizarse durante un periodo de cualquier longitud después de la adición del compuesto glucocorticoide. El tiempo de ejecución del cultivo puede determinarlo un experto en la técnica, sobre la base de factores relevantes tales como la cantidad y calidad de la proteína recuperable y el nivel de especies celulares contaminantes (por ejemplo, proteínas y ADN) en el sobrenadante resultantes de la lisis celular, lo que complicará la recuperación de la proteína de interés.

En realizaciones particulares del proceso de cultivo celular y del proceso de aumento de la viabilidad celular de la invención, el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación, que es anterior al comienzo de la fase de muerte inicial. Preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación durante la fase de crecimiento inicial. Más preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial. Más preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade en o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial.

La fase de crecimiento inicial se refiere a la fase de crecimiento que se observa en ausencia de la adición específica del compuesto glucocorticoide. La fase de muerte inicial se refiere a la fase de muerte que se observa en ausencia de la adición específica del compuesto glucocorticoide.

La fase de crecimiento inicial puede finalizar cuando comienza la fase de muerte inicial o existe una fase estacionaria de cualquier longitud entre la fase de crecimiento inicial y la fase de muerte inicial.

Por ejemplo, en un cultivo celular en el que la fase de crecimiento inicial es del día 0 al día 6 y la fase de muerte inicial comienza el día 7. En una realización particular el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación y antes del día 7. En una realización específica, el compuesto glucocorticoide se añade después de la inoculación y alrededor del día 6. En una realización específica, el compuesto glucocorticoide se añade entre los días 1 y 6. En otra realización específica, el compuesto glucocorticoide se añade con el medio nutriente los días 3 a 6. En otras realizaciones específicas, el compuesto glucocorticoide se añade aproximadamente el día 2 o el día 2.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 3) que cuando se lleva a cabo la presente invención, la viabilidad del cultivo celular se prolonga. Una condición, tal como la adición de compuesto glucocorticoide, provoca la prolongación de la viabilidad celular si la viabilidad celular en el cultivo es superior durante un periodo en presencia de la condición que en ausencia de la condición.

De este modo, también se divulgan (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para prolongar la viabilidad celular en un cultivo que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se prolonga la viabilidad celular del cultivo celular.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 3) que cuando se añade compuesto corticoide en un momento posterior a la

inoculación y anterior al comienzo de la fase de muerte inicial, la tasa de muerte de la fase de muerte puede reducirse, a un nivel inferior que la de la fase de muerte observada en ausencia de la adición de compuesto glucocorticoide.

De este modo, también se divulgan (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular en un momento posterior a la inoculación que sea anterior al comienzo de la fase de muerte inicial; en el que se reduce la tasa de muerte de la fase de muerte. Más en particular, la presente divulgación está dirigida a (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular en un momento posterior a la inoculación que sea durante el comienzo de la fase de crecimiento inicial; en el que se retrasa la tasa de muerte de la fase de muerte. Más en particular, la presente divulgación está dirigida a (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial; en el que se reduce la tasa de muerte de la fase de muerte. En otras realizaciones particulares, la presente divulgación está dirigida a un proceso para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular al final o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial; en el que se retrasa la tasa de muerte de la fase de muerte.

El Ejemplo 3 también demuestra que la hidrocortisona (HYC), la prednisolona (PRD) y la dexametasona (DEX) muestran todas ellas un efecto citoprotector dependiente de la dosis en cultivos celulares tratados en comparación con cultivos celulares no tratados. No obstante, se precisaron concentraciones superiores de HYC y PRD para alcanzar el mismo nivel de efecto citoprotector, lo que es coherente con sus diferencias de potencia (es decir, la HYC y la PRD tienen solamente el 5 % y el 20 % de potencia de la DEX)

Los tiempos de ejecución de los procesos de cultivo celular, en particular los procesos no continuos, están limitados, generalmente, por la densidad celular viable remanente, que disminuye durante la fase de muerte. Tiempos de ejecución más largos pueden permitir que se logren valoraciones del producto superiores. Los problemas respecto a la calidad del producto también ofrecen una motivación para reducir la tasa de muerte, ya que la muerte celular puede liberar sialidasas al sobrenadante del cultivo, lo que puede reducir el contenido de ácido siálico de la proteína expresada. Los problemas respecto a la purificación de la proteína ofrecen todavía otra motivación para retrasar o detener la fase de muerte. La presencia de desechos celulares y el contenido de células muertas del cultivo pueden influenciar negativamente la capacidad para aislar y/o purificar el producto proteico al final del proceso de cultivo.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 2), que la adición del compuesto glucocorticoide al cultivo celular reduce la agregación de las proteínas de interés.

De este modo, la presente divulgación también está dirigida a (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para reducir el porcentaje de agregación de proteínas que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se reduce el porcentaje de especies de alto peso molecular.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 1), que la adición del compuesto glucocorticoide al cultivo celular mejora la sialilación de las proteínas de interés potenciando el contenido de ácido siálico total y aumentando el porcentaje de especies sialiladas.

El Ejemplo 1 también demuestra que la hidrocortisona (HYC), la prednisolona (PRD) y la dexametasona (DEX) muestran todas ellas una mejora de la sialilación dependiente de la dosis en cultivos celulares tratados en comparación con cultivos celulares no tratados. No obstante, se precisó una concentración alta de HYC y PRD para lograr el mismo nivel de mejora, lo que es coherente con sus diferencias de potencia.

De este modo, la presente divulgación también está dirigida a (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para aumentar el porcentaje de especies sialiladas que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una proteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se aumenta el porcentaje de especies sialiladas.

De este modo, la presente divulgación también está dirigida a (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para aumentar el contenido de ácido siálico que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una glucoproteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se aumenta el contenido de ácido siálico.

De este modo, la presente divulgación también está dirigida a (1) un proceso de cultivo celular y (2) un proceso para reducir la tasa de desialilación de glucoproteínas en cultivos celulares que comprende: cultivar células hospedadoras que expresan una glucoproteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se

reduce la tasa de desililación.

Técnicas y métodos relacionados con la purificación y análisis de glucoproteínas

En los procesos de cultivo que abarca la presente invención, la proteína producida por las células, normalmente, se recoge, recupera, aísla y/o purifica o se purifica sustancialmente, como se desee, al final del periodo de cultivo celular total usando métodos de aislamiento y purificación tal como se conocen y se llevan a la práctica en la técnica. Preferentemente, la proteína que se segrega a partir del cultivo celular se aísla del medio de cultivo o sobrenadante; no obstante, la proteína también puede recuperarse a partir de las células hospedadoras, por ejemplo, lisados celulares, usando métodos que se conocen y se llevan a la práctica en la técnica y que se describen adicionalmente más adelante.

El carbohidrato complejo que comprende la molécula de CTLA4 producida mediante los procesos de la invención puede analizarse rutinariamente, si se desea, mediante técnicas convenciones de análisis de carbohidratos. Por ejemplo, técnicas tales como análisis mediante electrotransferencia de lectinas, bien conocida en la técnica, revela proporciones de manosa terminal o de otros azúcares tales como la galactosa. La terminación de oligosacáridos bi-, tri- o tetraantenarios mediante ácidos siálicos puede confirmarse por medio de la liberación de azúcares a partir de la proteína usando hidrazina anhidra o procesos enzimáticos y fraccionación de oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño u otros procesos que son bien conocidos en la técnica.

También puede medirse el pI de la molécula de CTLA4, antes y después del tratamiento con neuraminidasa, para eliminar los ácidos siálicos. Un aumento del pI seguido del tratamiento con neuraminidasa indica la presencia de ácidos siálicos en la molécula de CTLA4. Las estructuras carbohidrato tienen lugar normalmente en las proteínas expresadas en forma de carbohidratos ligados a N o ligados a O. Los carbohidratos ligados a N y ligados a O difieren, principalmente, en sus estructuras de núcleo. La glucosilación ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a través de GlcNAc a un residuo de asparagina en la cadena peptídica. Los carbohidratos ligados a N contienen todos una estructura de núcleo común Man1-6(Man1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-R, en la que R en esta estructura de núcleo representa un residuo de asparagina. La secuencia de péptidos de la proteína producida contendrá una asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina.

Por el contrario, los carbohidratos ligados a O se caracterizan por una estructura de núcleo común que está unida a través de GalNAc al grupo hidroxilo de una treonina o serina. De los carbohidratos ligados a N y ligados a O, los más importantes son los carbohidratos ligados a N y ligados a O complejos. Tales carbohidratos complejos contienen varias estructuras antenarias. Las estructuras mono, bi, tri y tetra externas son importantes para la adición de ácidos siálicos terminales. Tales estructuras catenarias externas proporcionan sitios adicionales para los azúcares específicos y enlaces que comprenden los carbohidratos de los productos proteicos.

Los carbohidratos resultantes pueden analizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica varios métodos para el análisis de glucosilación, que son útiles en el contexto de la presente invención. Estos métodos proporcionan información relacionada con la identidad y la composición del oligosacárido unido al péptido producido. Los métodos para análisis de carbohidratos útiles en relación con la presente invención incluyen, pero no están limitados a, cromatografía de lectina, HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico de intercambio aniónico a pH alto para separar oligosacáridos sobre la base de la carga; PMN; espectroscopía de masas; HPLC; GPC; análisis de la composición de monosacáridos y digestión enzimática secuencial.

Además, se conocen y se llevan a la práctica en la técnica métodos para liberar oligosacáridos. Estos métodos incluyen 1) métodos enzimáticos, que se realizan comúnmente usando péptido-N-glucosidasa F/endo-β-galactosidasa; 2) métodos de eliminación β, usando un ambiente fuertemente alcalino para liberar principalmente estructuras ligadas a O; y 3) métodos químicos que usan hidrazina anhidra para liberar los oligosacáridos enlazados a N y enlazados a O. El análisis puede realizarse mediante las etapas siguientes: 1. Diálisis de la muestra frente a agua desionizada para eliminar todas las sales de tampón, seguido de liofilización. 2. Liberación de cadenas intactas de oligosacárido con hidrazina anhidra. 3. Tratamiento de cadenas intactas de oligosacárido con HCl metanólico anhidro para liberar monosacáridos individuales como derivados de O-metilo. 4. N-acetilación de todos los grupos amino primarios. 5. Derivatización para obtener glucósidos de per-O-trimetilsilil metilo. 6. Separación de estos derivados por cromatografía por capilaridad gas-líquido (GLC) en una columna CP-SIL8. 7. Identificación de derivados de glucósido individuales mediante el tiempo de retención de la GLC y espectroscopía de masas, en comparación con los patrones conocidos. 8. Cuantificación de los derivados individuales por FID con un patrón interno (13-O-metil-D-glucosa).

Pueden determinarse azúcares neutros y amino mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento combinada con detección amperométrica de pulsos (sistema de carbohidratos por HPAE-PAD; Dionex Corp.). Por ejemplo, pueden liberarse azúcares por hidrólisis en ácido trifluoroacético al 20 % (v/v) a 100 °C durante 6 horas. Después, los hidrolizados se secan por liofilización o con un Speed-Vac (Savant Instruments). Después, los residuos se disuelven en solución de acetato de sodio trihidratado al 1 % y se analizan en una columna de HPLC-AS6 (tal como se describe por Anumula et al., 1991, *Anal. Biochem.*, 195:269-280).

Alternativamente, se realiza el análisis de carbohidratos por inmunotransferencia. En este método, los carbohidratos unidos a proteína se detectan usando un sistema de detección de glucano comercial (Boehringer), que está basado en el método de inmunotransferencia oxidativa descrito por Haselbeck et al. (1993, *Glycoconjugate J.*, 7:63). Se sigue el protocolo de coloración recomendado por el fabricante excepto en que la proteína se transfiere a una membrana de difluoruro de polivinilideno en vez de a una membrana de nitrocelulosa y los tampones de bloqueo contienen albúmina de suero bovino al 5 % en tampón Tris 10 mM, pH de 7,4, con cloruro de sodio al 0,9 %. La detección se realiza con anticuerpos antidigoxigenina unidos con un conjugado de fosfato alcalino (Boehringer), 1:1000 de dilución en solución salina tamponada con Tris usando sustratos de fosfatasa, cloruro de 4-nitroazul de tetrazolio, al 0,03 % (p/v) y fosfato de 5-bromo-4 cloro-3-indoilo al 0,03 % (p/v) en tampón de Tris 100 mM , pH 9,5, que contiene cloruro de sodio 100 mM y cloruro de magnesio 50 mM. Las bandas de proteína que contienen carbohidratos se visualizan generalmente en aproximadamente 10 a 15 minutos.

Los carbohidratos asociados con proteínas también pueden analizarse por digestión con peptido-N-glucosidasa F. De acuerdo con este método, el residuo se suspende en 14 µL de un tampón que contiene SDS al 0,18 %, beta-mercaptoetanol al 18 mM, fosfato 90 mM, EDTA 3,6 mM, en un pH de 8,6, y se calienta a 100 °C durante 3 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, la muestra se divide en dos partes iguales. Una parte, que no se trata adicionalmente, sirve como control. La otra parte se ajusta a aproximadamente un 1 % de detergente NP-40, seguido de la adición de 0,2 unidades de péptido-N-glucosidasa F (Boehringer). Ambas muestras se calientan a 37 °C durante 2 horas y después se analizan por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Además, se evalúa el contenido de ácido siálico del producto de CTLA4 soluble usando métodos convencionales. Por ejemplo, el ácido siálico puede determinarse por separado mediante un método colorimétrico directo (Yao et al., 1989, *Anal. Biochem.*, 179:332-335), usando preferentemente muestras por triplicado. Otro método de determinación de ácido siálico implica el uso de ácido tiobarbitúrico (TBA), tal como se describe por Warren et al.(1959, *J. Biol. Chem.*, 234:1971-1975). Otro método más implica cromatografía de alto rendimiento, tal como se describe por H.K. Ogawa et al. (1993, *J. Chromatography*, 612:145-149).

De forma ilustrativa, para la recuperación, el aislamiento y/o la purificación de la molécula de CTLA4, el medio de cultivo celular o el lisado celular se centrifuga para retirar las células particuladas y los desechos celulares. El producto polipeptídico deseado se aísla o purifica lejos de proteínas y polipéptidos contaminantes solubles usando técnicas de purificación adecuadas. Los métodos siguientes proporcionan métodos a modo de ejemplo de purificación de proteínas, pero no limitantes: separación o fraccionamiento por inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico; precipitación de etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre una resina, tal como sílice o resina de intercambio iónico, por ejemplo, DEAE; cromatografía de enfoque; SDS-PAGE; precipitación de sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75, sefarosa; cromatografía en proteína A sefarosa para la eliminación de contaminantes de inmunoglobulina. Pueden usarse otros aditivos, tales como inhibidores de proteasa (por ejemplo, PMSF o proteinasa K) para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. El experto en la técnica entenderá que los procesos de purificación para un polipéptido de interés dado pueden requerir modificaciones que permitan cambios en el polipéptido expresado de forma recombinante en el cultivo celular. Estos procesos de purificación que pueden seleccionarse para carbohidratos y enriquecerse para ácido siálico son particularmente preferentes, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico en gel blando o HPLC usando resinas de intercambio catiónico o aniónico, en los que se recoge(n) la(s) fracción/fracciones más ácida(s).

Células, proteínas y cultivos celulares

En los procedimientos de cultivo celular de la presente invención, las células pueden mantenerse en varios medios de cultivo celular, por ejemplo, medio de cultivo basal, como se sabe convencionalmente en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos se pueden aplicar en el uso de volúmenes grandes de células mantenidas en medio de cultivo celular, que pueden suplementarse con nutrientes y similares. Normalmente, “medio de cultivo celular” (también denominado “medio de cultivo”) es un término que el profesional de la técnica entiende y que es conocido para referirse a una solución de nutrientes en la que se cultivan células, preferentemente células animales o de mamífero y que generalmente proporciona al menos uno o más componentes de entre los siguientes: una fuente de energía (generalmente en forma de un carbohidrato tal como glucosa), todos los aminoácidos esenciales, y generalmente los veinte aminoácidos básicos, más cisteína; vitaminas y/u otros compuestos orgánicos que se precisan normalmente en bajas concentraciones; lípidos o ácidos grasos libres, ácido linoleico y oligoelementos, por ejemplo, compuestos inorgánicos o elementos naturales que se requieren normalmente en bajas concentraciones, generalmente en el intervalo micromolar. El medio de cultivo celular también puede suplementarse para contener varios componentes opcionales, tales como hormonas y otros factores de crecimiento, por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, suero y similares; sales, por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato y tampones, por ejemplo HEPES; nucleósidos y bases, por ejemplo, adenosina, timidina, hipoxantina; e hidrolizados de proteínas y de tejidos, por ejemplo, proteína animal hidrolizada (peptonas o mezclas de peptonas, que pueden obtenerse a partir de subproductos animales, gelatina purificada o material vegetal); antibióticos, por ejemplo gentamicina y agentes protectores de células, por ejemplo el poliol Pluronic (Pluronic F68). Es preferente un medio de nutrición celular exento de suero y de productos o ingredientes de origen animal.

El profesional aprecia que las células animales o de mamífero se cultivan en un medio adecuado para las células

particulares que se cultivan y que puede determinarlo un experto en la técnica sin una excesiva experimentación. Se pueden utilizar los medios comercialmente disponibles, por ejemplo, medio esencial mínimo (MEM, Sigma, St. Louis, MO, EEUU); medio F10 de Ham (Sigma); medio eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma); medio RPMI-1640 (Sigma); medio de cultivo celular HyClone (HyClone, Logan, UT); y medio definido químicamente (CD), que está formulado para tipos de células particulares, por ejemplo, medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). A los medios puestos como ejemplos anteriormente se pueden añadir los componentes o ingredientes suplementarios descritos anteriormente, incluidos componentes adicionales, en concentraciones o cantidades apropiadas, como sea necesario o se desee, y tal como conocerían y pondrían en práctica los expertos en la técnica usando habilidades rutinarias.

Además, las condiciones adecuadas de cultivo celular para los procedimientos de la presente invención son las que se usan normalmente y se conocen por cultivo de células por lotes, semicontinuo y continuo, con atención al pH, por ejemplo, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, oxígeno disuelto (O_2), por ejemplo, entre aproximadamente el 5 y el 90 % de saturación de aire y dióxido de carbono (CO_2), agitación y humedad, además de la temperatura. Como ejemplo ilustrativo, pero no limitante, un medio de cultivo celular adecuado para los procedimientos semicontinuos de la presente invención comprende un medio CD-CHO modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). También puede usarse un medio nutriente, tal como medio ERDF modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Es preferente un medio de cultivo que también contenga glucocorticoides, por ejemplo, dexametasona.

Células animales, células de mamífero, células cultivadas, células hospedadoras animales o de mamífero, células hospedadoras, células recombinantes, células hospedadoras recombinantes y similares son normalmente líneas celulares obtenidas o derivadas de mamíferos y son capaces de crecer y sobrevivir cuando se las coloca bien en un cultivo monocapa o en un cultivo de suspensión en un medio que contiene los nutrientes y/o los factores de crecimientos apropiados. Los factores de crecimiento y nutrientes que son necesarios para el crecimiento y mantenimiento de cultivos celulares particulares pueden determinarse de manera sencilla empíricamente por un experto en la técnica pertinente, tal como se describe, por ejemplo, por Barnes y Sato, (1980, *Cell*, 22:649); en *Mammalian Cell Culture*, Ed. J.P. Mather, Plenum Press, NY, 1984; y en la patente de Estados Unidos n.º 5.721.121.

Las células CHO se cultivan de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. Además, en el presente documento se divulgan células que son normalmente, células animales o de mamífero que pueden expresar y secretar, o que pueden diseñarse molecularmente para expresar y secretar, grandes cantidades de una proteína particular, más particularmente una glucoproteína de interés, en un medio de cultivo. Se entenderá que la glucoproteína producida por una célula hospedadora puede ser endógena u homóloga a la célula hospedadora. La glucoproteína puede ser heteróloga, es decir, extraña, para la célula hospedadora, por ejemplo, una glucoproteína humana producida y secretada por una célula hospedadora de ovario de hámster chino (CHO). Se consiguen glucoproteínas de mamífero, es decir, las obtenidas originalmente o derivadas de un organismo mamífero, usando los procedimientos de la presente divulgación y son secretadas, preferentemente, por las células presentes en el medio de cultivo.

Ejemplos de glucoproteínas de mamífero que pueden producirse de forma ventajosa usando los procedimientos de la presente divulgación incluyen, sin limitación, citocinas, receptores de citocina, factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, HER-2, FGF-α, FGF-β, TGF-α, TGF-β, PDGF, IGF-1, IGF-2, NGF, NGF-β); receptores de factores de crecimiento, incluidas proteínas de fusión o quiméricas. Otros ejemplos no limitantes incluyen hormonas del crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento bovina); insulina (por ejemplo, cadena A de la insulina y cadena B de la insulina), proinsulina; eritropoyetina (EPO); factores estimulantes de colonias (por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, M-CSF); interleucinas (por ejemplo IL-1 a IL-12); factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGF-R); interferones (por ejemplo, IFN-α, β, o γ); factor de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF-α y TNF-β) y sus receptores, TNFR-1 y TNFR-2; trombopoyetina (TPO); trombina; péptido natriurético cerebral (BNP); factores de coagulación (por ejemplo, el factor VIII, el factor IX, factor de von Willebrand y similares); factores anticoagulación; activador del plasminógeno hístico (TPA), por ejemplo, uroquinasa u orina humana o tejido tipo TPA; hormona estimulante del folículo (FSH); hormona luteinizante (LH); calcitonina; proteínas CD (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD28, CD19,etc.); proteínas CTLA (por ejemplo, CTLA4); proteínas receptoras de linfocitos T y linfocitos B; proteínas morfogénicas óseas (BNP, por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, etc.); factores neurotróficos, por ejemplo, factores neurotróficos derivados de huesos (BDNF); neurotrofinas, por ejemplo, 3-6; renina; factor reumatoide; RANTES; albúmina; relaxina; proteínas inhibidoras de macrófagos (por ejemplo, MIP-1, MIP-2); proteínas o antígenos víricos; proteínas de superficie de membrana; proteínas del canal iónico; enzimas; proteínas reguladoras; anticuerpos; proteínas inmunomoduladoras, (por ejemplo, HLA, MHC, la familia B7); receptores de localización; proteínas de transporte; superóxido dismutasa (SOD); proteínas del receptor acoplado a proteína G (GPCR); proteínas neuromoduladoras; proteínas y péptidos asociados a la enfermedad de Alzheimer, (por ejemplo A-beta) y otras tal como se conocen en la técnica. Las proteínas y polipéptidos de fusión, proteínas y polipéptidos quiméricos, así como fragmentos y porciones o mutantes, variantes o análogos de cualquier proteína o polipéptido mencionado anteriormente están también incluidos entre las proteínas, polipéptidos y péptidos adecuados que pueden producirse mediante los procedimientos de la presente invención.

Ejemplos no limitantes de células hospedadoras animales o de mamífero adecuadas para alojar, expresar y producir proteínas para aislamiento y/o purificación incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), cultivadas en el

proceso de cultivo reivindicado, tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; y Kolkekar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909), línea celular Tet-On CHO-K1 (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), CHO clon 13 (GEIMG, Genova, Italia), CHO clon B (GEIMG, Genova, Italia), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), células CHO negativas en dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216) y células dp12.CHO (documento de patente de Estados Unidos n.º 5.721.121). Los ejemplos de dichas células hospedadoras incluyen también células que no están abarcadas por las células CHO cultivadas en el proceso de cultivo celular reivindicado, por ejemplo, células CV1 renales de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células renales embrionarias humanas (por ejemplo, células 293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL-10); células renales de mono (CV1, ATCC CCL-70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL-34); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); células MCR 5; células FS4. Las células CHO se cultivan en el proceso de cultivo reivindicado, particularmente, las células CHO/-DHFR.

Las células adecuadas para cultivar en los procedimientos y procesos de la presente invención pueden contener vectores de expresión (constructos) introducidos, por ejemplo, por transformación, transfección, infección o inyección, tales como plásmidos y similares, que alojan secuencias de codificación, o porciones de las mismas, que codifican las proteínas para su expresión y producción en los procedimientos de cultivo. Tales vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Pueden usarse procedimientos que son bien conocidos y llevados a la práctica por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y los polipéptidos producidos, así como los elementos de control transcripcional y transduccional apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas están descritas en J. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (EEUU) y en F.M. Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (EEUU).

Elementos de control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y su especificidad. En función del sistema vectorial y de la célula hospedadora que se utiliza, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos promotores constitutivos e inducibles. En sistemas celulares de mamíferos, son preferentes los promotores de genes de mamífero o de virus de mamíferos. Los constructos para usar en sistemas de expresión proteica se diseñan para contener al menos un promotor, una secuencia potenciadora (opcionalmente, para sistemas de expresión de mamíferos) y otras secuencias tal como se necesitan o se desean para una transcripción y regulación adecuada de la expresión génica (por ejemplo, secuencias de iniciación y terminación transcripcional, origen de sitios de replicación, secuencias de poliadenilación, por ejemplo, la secuencia poli A de la hormona del crecimiento bovina (BGH)).

Como se apreciará por los expertos en la técnica, la selección del vector apropiado, por ejemplo, un plásmido, componentes para una transcripción, expresión y aislamiento apropiados de proteínas producidas en sistemas de expresión eucariótico (por ejemplo, mamíferos) es conocida y los expertos en la técnica la determinan y la llevan a la práctica rutinariamente. La expresión de proteínas por las células cultivadas de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, puede situarse bajo el control de promotores tales como promotores víricos, por ejemplo, citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV), fosfoglicerol quinasa (PGK), timidina quinasa (TK) o el promotor de la α-actina. Además, los promotores regulados confieren inducibilidad mediante compuestos o moléculas particulares, por ejemplo, el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) se induce por glucorticoides (V. Chandler et al., 1983, *Cell*, 33:489-499). También pueden usarse promotores o elementos reguladores específicos de tejidos (G. Swift et al., 1984, *Cell*, 38:639-646), si se necesita o se desea.

Pueden introducirse constructos de expresión en las células mediante varios procedimientos de transferencia génica conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, procedimientos convencionales de transfección génica, tales como coprecipitación con fosfato de calcio, transfección liposómica, microinyección, electroporación e infección o transducción vírica. La elección del procedimiento está dentro de la competencia del experto en la técnica. Para un experto en la técnica, será aparente que uno o más constructos que portan secuencias de ADN para su expresión en células pueden transfectarse a las células de modo que los productos de expresión se producen a continuación en las células y/o se obtienen a partir de las mismas.

En un aspecto particular, los sistemas de expresión de mamíferos que contienen secuencias de control y reguladoras apropiadas son preferentes para usar en las células de mamífero que expresan proteínas de la presente

invención. Las secuencias de control eucarióticas que se usan comúnmente para su uso en vectores de expresión de mamíferos incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero tales como, por ejemplo, el promotor (vector CDM8) del citomegalovirus (CMV) y del virus del sarcoma aviar (ASV), (πLN). Otros promotores que se usan comúnmente incluyen los promotores tempranos y tardíos del virus del simio 40 (SV40) (Fiers et al., 1973, *Nature*, 273:113), u otros promotores víricos tales como los derivados de polioma, adenovirus 2 y virus del papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin et al., 1982, *Nature*, 299:797-802).

Ejemplos de vectores de expresión adecuados para células hospedadoras eucarióticas incluyen, pero no están limitados a, vectores para células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene), vectores retrovíricos (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pcDNA-3 (Invitrogen), vectores adenovíricos; Adeno-vectores de virus adenoasociados, vectores de bacilovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)) o formas modificadas de cualquiera de los precedentes. Los vectores pueden contener también secuencias de potenciadores cadena arriba o cadena abajo de las secuencias de la región promotora para optimizar la expresión génica.

También puede usarse un marcador seleccionable en un vector recombinante (por ejemplo, un plásmido) para conferir resistencia a las células que alojan (preferentemente, que tienen integrado de forma estable) el vector que permite su selección en un medio de selección apropiado. Puede usarse una serie de sistemas de selección, incluidos pero no limitados a, genes de timidina quinasa del virus del herpes simplex (HSV TK), (Wigler et al., 1977, *Cell*, 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT), (Szybalska y Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 1980, *Cell*, 22:817), que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt (APRT), respectivamente.

También puede usarse resistencia antimetabolito como base de selección para los ejemplos no limitantes siguientes de genes marcadores: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357; y O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418 (*Clinical Pharmacy*, 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy*, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science*, 260:926-932; Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-21; mayo, 1993, *TIB TECH*, 11(5):155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984, *Gene*, 30:147). Pueden aplicarse rutinariamente procedimientos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar los clones de células recombinantes deseados y dichos procedimientos están descritos, por ejemplo, en Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds*), Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981. *J. Mol. Biol.*, 150:1.

Además, los niveles de expresión de una molécula proteica expresada pueden aumentarse mediante amplificación de vectores (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, “The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning”, Vol. 3, Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa una proteína es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de células hospedadoras aumentará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada está asociada con el gen que codifica la proteína, la producción de la proteína aumentará concomitantemente (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.*, 3:257).

Los vectores que alojan glutamina sintasa (GS) o dihidrofolato reductasa (DHFR) que codifican ácidos nucleicos como marcadores seleccionables pueden amplificarse en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotraxato, respectivamente. Una ventaja de vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (por ejemplo, la línea celular de mieloma murino, NSO) que son negativas a glutamina sintasa. También pueden funcionar sistemas de expresión de glutamina sintasa en células de expresión de glutamina sintasa (por ejemplo, células CHO) que proporcionan un inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno.

Los vectores que expresan DHFR como marcador seleccionable incluyen, pero no están limitados a, el plásmido pSV2-dhfr (Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1:854 (1981). Los vectores que expresan la glutamina sintasa como marcador seleccionable incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión pEE6 descrito en Stephens y Cockett, 1989, *Nucl. Acids. Res.*, 17:7110. Un sistema de expresión de glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: W087/04462; W086/05807; W089/01036; W089/10404 y W091/06657. Además, los vectores de expresión de glutamina sintasa que pueden usarse de acuerdo con la presente invención están disponibles comercialmente en proveedores, por ejemplo, Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH).

En una realización particular, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula STLA4 soluble o una molécula mutante de CTLA4 soluble puede insertarse en un vector diseñado para expresar secuencias extrañas en un hospedador eucariota. Los elementos regulatorios del vector pueden variar de acuerdo con la célula CHO particular. Los vectores que expresan la CTLA4 soluble o la mutante de CTLA4 soluble en células CHO puede incluir

secuencias de potenciadores para optimizar la expresión de la proteína.

Tipos de cultivos celulares

Con fines de comprensión, aunque sin limitación, el experto apreciará que los cultivos celulares y la realización del cultivo para la producción de proteínas puede incluir tres tipos generales; es decir, cultivo en continuo, cultivo en lotes y cultivo semicontinuo. En un cultivo en continuo, por ejemplo, el suplemento del medio de cultivo fresco (es decir, el medio nutriente) se proporciona a las células durante el periodo de cultivo, mientras que el medio de cultivo viejo se retira diariamente y el producto se recoge, por ejemplo, diariamente o de forma continua. En un cultivo en continuo, el medio nutriente puede añadirse diariamente y puede añadirse en continuo, es decir, por goteo o por infusión. Para el cultivo en continuo, las células pueden permanecer en cultivo tanto tiempo como se desee, mientras que las células permanezcan vivas y se mantengan las condiciones ambientales y de cultivo.

En el cultivo en lotes, las células se cultivan inicialmente en un medio y este medio ni se retira, ni se reemplaza, ni se suplementa, es decir, las células no se “alimentan” con nuevo medio, durante o antes del final del proceso de cultivo. El producto deseado se recolecta al final del proceso de cultivo.

Para cultivos semicontinuos, el tiempo de ejecución del cultivo se aumenta suplementando el medio de cultivo una o más veces al día (o en continuo) con medio fresco durante el proceso, es decir, las células se “alimentan” con nuevo medio (“medio nutriente”) durante el periodo de cultivo. Los cultivos semicontinuos incluyen varios regímenes y tiempos de alimentación, por ejemplo, diariamente, en días alternos, cada dos días, etc., más de una vez al día, o menos de una vez al día y así sucesivamente. Además, los cultivos semicontinuos pueden alimentarse continuamente con medio nutriente.

Después, el producto deseado se recolecta al final del proceso de cultivo/producción. La presente invención abarca, preferentemente, los cultivos celulares semicontinuos en los que el compuesto glucorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación.

De acuerdo con la presente invención, puede llevarse a cabo un cultivo de células CHO y las células pueden producir moléculas de CTLA4 solubles, en condiciones para la producción a gran o pequeña escala de proteínas, usando recipientes de cultivo y/o aparatos de cultivo que se emplean de forma convencional para el cultivo de células animales o de mamífero. Como aprecia el experto en la técnica, las placas de cultivo de tejido, los recipientes de cultivo de tejidos y los recipientes de agitación se usan normalmente a escala de laboratorio. Para el cultivo en gran escala, (por ejemplo, 500 litros, 5.000 litros y similares, por ejemplo, tal como se describe en los documentos de patente de titularidad compartida de Estados Unidos n.º 7.541.164 y n.º 7.332.303 y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 12/086786 , presentada el 19 de diciembre del 2006) pueden usarse procedimientos que incluyen, pero no están limitados a, un biorreactor de lecho fluidizado, un biorreactor de fibra hueca, un cultivo en botella rotatoria o sistemas de biorreactores de tanque agitado. Pueden usarse o pueden no usarse microportadores con la botella de cultivo rotatoria o los sistemas de biorreactores de tanque agitado. Los sistemas pueden operarse en lotes, en continuo o en modo discontinuo. Además, el aparato o sistema de cultivo puede o no estar equipado con un separador celular que usa filtros, gravedad, fuerza centrífuga y similares.

Fases del cultivo celular y parámetros asociados

El término “inoculación” se refiere a la adición de células del medio de iniciación al comienzo del cultivo.

La “fase de crecimiento” de un cultivo es la fase durante la que la densidad celular viable en cada punto temporal es superior a la que se tenía en cualquier punto temporal anterior.

La “fase estacionaria” de un cultivo es la fase durante la que la densidad celular viable es aproximadamente constante (es decir, dentro del error de medición) durante un periodo de cualquier duración.

La “fase de muerte” de un cultivo es la fase que viene después de la fase de crecimientos o después de la fase de crecimiento y la fase estacionaria, y durante la que la densidad celular viable en cualquier punto temporal es inferior a la de cualquier punto temporal anterior durante esa fase.

En un proceso de cultivo “asociado al crecimiento”, tal como casos en los que un compuesto glucocorticoide provoca una prolongación de la fase de crecimiento, la fase de producción puede comenzar durante la fase de crecimiento prolongada.

En un proceso de cultivo asociado a “no crecimiento”, la fase de producción del cultivo celular puede ser la fase estacionaria.

Preferentemente, el medio de cultivo se suplementa (“alimenta”) durante la fase de producción para mantener la producción en continuo de proteínas, en particular en una fase de producción prolongada, y para alcanzar amplias cantidades de producto de CTLA4 soluble de alta calidad (tal como se ejemplifica y/o se determina por un nivel alto

en contenido final de ácido siálico tras la recuperación de la proteína. La alimentación puede tener lugar sobre una base diaria, o de acuerdo con otros esquemas para apoyar la viabilidad celular y la producción de proteínas

El proceso de cultivo de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado más de una célula viable superviviente hasta el final del periodo de cultivo. En consecuencia, en algunas realizaciones, cuantas más células sobrevivan, más células producirán el producto deseado. Esto, a su vez, se traduce en una cantidad acumulada superior de producto al final del proceso de cultivo, permaneciendo igual la tasa de producción de proteína por células individuales, es decir, la productividad específica celular. La productividad específica celular o la tasa específica celular, tal como se conoce en la técnica, se refiere normalmente a la tasa de expresión específica de producto producido por célula, o por medida de masa o de volumen celular. La productividad específica celular se mide en gramos de proteína producida por célula por día, por ejemplo, y puede medirse de acuerdo con un procedimiento integral que implica las fórmulas siguientes:

$$dP/dt = q_p X, \text{ o bien}$$

$$P = q_p \int_0^t X dt$$

en las que q_p es la constante de productividad específica celular; X es el número de células o volumen celular o equivalentes de masa celulares; y dP/dt es la velocidad de producción de proteína. De este modo, q_p puede obtenerse a partir de una gráfica de concentración de producto frente a la integral con respecto al tiempo de células viables ($\int_0^t X dt$ "días de células viables"). De acuerdo con esta fórmula, cuando la cantidad de producto de CTLA4 soluble producido se representa frente a los días de células viables, la pendiente es equivalente a la velocidad específica celular. Las células viables pueden determinarse por medio de varias mediciones, por ejemplo, biomasa, velocidad de captación de O_2 (LDH), volumen celular empaquetado o turbidez. (por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.705.364 de T. Etcheverry et al.)

Producción de moléculas CTLA4 solubles y moléculas mutantes de CTLA4 solubles mediante los procedimientos de cultivo de la presente invención

En otras realizaciones que abarca la presente invención, los procedimientos de cultivo celular de la invención se usan para producir una molécula CTLA4 soluble o una molécula mutante de CTLA4 soluble, tal como se describe a continuación. Una molécula CTLA4 soluble es preferentemente una proteína de fusión CTLA4, preferentemente CTLA4Ig. Es más preferente una CTLA4Ig que comprende aminoácidos -1 a 357 o +1 a 357 tal como se muestra en la FIG. 19. Una molécula mutante de CTLA4 es preferentemente la L104EA29YIg que comprende aminoácidos -1 a 357 o +1 a 357 tal como se muestra en la FIG. 20. Los procedimientos de cultivo celular, que implican unas fases de producción prolongada para productos proteicos son especialmente adecuados para generar en cultivo grandes cantidades de moléculas CTLA4 solubles y de moléculas mutantes de CTLA4 solubles con alta calidad, por sus células hospedadoras.

En una realización preferente, la CTLA4Ig se produce por celulas huésped diseñadas de forma recombinante. La proteína de fusión CTLA4Ig puede producir de forma recombinante células CHO transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica la CTLA4Ig. (véase el documento de patente de Estados Unidos n.º. 5.844.095 de P.S. Linsley et al.). La proteína de fusión CTLA4Ig se produce con una calidad alta y se somete a sialilación apropiadamente cuanto se cultiva de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. La invención proporciona la producción de niveles altos de producto proteico recuperable, por ejemplo, producto proteico CTLA4Ig sialilado. En otra realización preferente, la molécula mutante de CTLA4 soluble L104EA29YIg que comprende aminoácidos -1 a 357 o +1 a 357 tal como se muestra en la FIG. 20 se produce mediante procedimientos de cultivo celular de la presente invención.

Un ligando para la CTLA4 es una molécula B7. Tal como se usa en el presente documento, "ligando" se refiere a una molécula que reconoce y se une específicamente a otra molécula. La interacción de una molécula y su ligando puede regularse por los productos de los procedimientos de cultivo de la presente invención. Por ejemplo, la interacción de la CTLA4 con su ligando B7 puede bloquearse mediante la administración de moléculas CTLA4Ig. Como otros ejemplos, la interacción del factor de necrosis tumoral (TNF) con su ligando, el receptor TNF (TNFR), puede bloquearse mediante la administración de etanercept u otras moléculas de bloqueo TNF/TNFR.

La CTLA4 de tipo silvestre o “CTLA4 no mutada” tiene la secuencia de aminoácidos de CTLA4 de cadena completa natural, tal como se muestra en la FIG. 20 (y también se describe en los documentos de patente de Estados Unidos n.º. 5.434.131, 5.844.095 y 5.851.795), o cualquier porción de la misma que reconoce y se une a una molécula B7, o interfiere con una molécula B7, de tal forma que uniéndose a CD28 y/o a CTLA4 (por ejemplo, CD28 endógeno y/o CTLA4) se bloquea. La CTLA4 de tipo silvestre comprende porciones particulares, que incluyen, por ejemplo, el dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre que comienza con metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre que comienza con alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en la posición +124 tal como se muestra en la FIG. 21.

La CTLA4 de tipo silvestre natural es una proteína de superficie celular que tiene un dominio extracelular N-terminal,

un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico C-terminal. El dominio extracelular se une a una molécula diana, tal como una molécula B7. En una célula, la proteína CTLA4 de tipo silvestre natural se traduce como un polipéptido inmaduro que incluye un péptido de señalización en el extremo amino o N-terminal. El polipéptido inmaduro experimenta un procesamiento postraduccional que incluye la escisión y eliminación del péptido de señalización para generar un producto de escisión de CTLA4 que tiene un extremo N-terminal recién generado y que difiere del extremo N-terminal de la forma inmadura. Un experto en la técnica apreciará que puede tener lugar un procesamiento postraduccional que elimine uno o más de los aminoácidos del extremo N-terminal recién generado del producto de escisión de CTLA4. La proteína CTLA4 madura puede comenzar en la metionina de la posición +1 o la alanina de la posición -1. La forma madura de la molécula CTLA4 incluye el dominio extracelular o cualquier porción del mismo que se une a B7.

Una molécula CTLA4 mutante, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende la CTLA4 de tipo silvestre tal como se muestra en la FIG. 21, o cualquier porción o derivado de la misma, en la secuencia de CTLA4 de tipo silvestre, preferentemente en el dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre, y se une a B7. Una molécula CTLA4 mutante tiene una secuencia que es similar, pero no idéntica, a la secuencia de la molécula CTLA4 de tipo silvestre, pero que también se une a B7. Las mutaciones pueden incluir uno o más restos de aminoácidos sustituidos con un aminoácido que tiene estructura o propiedades químicas, deleciones, adiciones, cambios de fase o truncaciones de aminoácidos conservativas (por ejemplo, una leucina sustituida por una isoleucina) o no conservativas (por ejemplo, una leucina sustituida por un triptófano).

Las moléculas mutantes de CTLA4 pueden incluir una molécula no-CTLA4 en la misma o unida a la misma, es decir, proteínas de fusión de mutante de CTLA4 . Las moléculas mutantes son solubles (es decir, en circulación). Las moléculas mutantes de CTLA4 incluyen la L104EA29YIg y las descritas en las solicitudes de patente de Estados Unidos números de serie 60/214.065 y 60/287.576; en el documento WO 01/92337 A2; en los documentos de patente de Estados Unidos n.º 6.090.914, 5.844.095, 7.094.874 y 5.773.253; y como se describen en R.J. Peach et al., 1994, *J Exp Med*, 180:2049-2058.) Independientemente del alcance específico del proceso reivindicado, en el presente documento se divulga también que las moléculas mutantes de CTLA4 pueden producirse sintéticamente o de forma recombinante.

La CTLA4Ig es una proteína de fusión soluble que comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre, o una porción del mismo que se une a B7, unido a una molécula de inmunoglobulina (Ig) o a una porción de la misma. El dominio extracelular de CTLA4 o una porción del mismo se une a un resto Ig que comprende toda o una porción de la molécula de inmunoglobulina, preferentemente toda o una porción de una región constante de la inmunoglobulina, tal como toda o una porción de IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCépsilon), proporcionando la molécula de fusión soluble. El resto Ig puede incluir los dominios bisagra, CH2 y CH3 y los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de las regiones constantes mencionadas anteriormente u otras regiones constantes. Preferentemente, el resto Ig es humano o de mono y comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3. Del modo más preferente, el resto Ig comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgCγ1 humano, o está constituido por los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgCγ1 humano. En un resto Ig de la CTLA4Ig, la región constante Ig o una porción de la misma puede mutarse, dando como resultado una reducción de sus funciones efectoras (véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.637.481, 5.844.095 y 5.434.131. Tal como se usan en el presente documento, los términos resto Ig, región constante Ig, dominio Ig C(constante), IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCépsilon), incluyen tanto las secuencias nativas como las que han sido mutadas, tales como, por ejemplo, secuencias que tienen mutaciones en la región constante que reducen la función efectora.

Una realización particular relacionada con la CTLA4 comprende el dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre que comienza en la metionina en la posición +1 y termina en el ácido aspártico en la posición +124, o comienza en la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124; un residuo de aminoácido de unión glutamina en la posición +125; y una porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 a través de una lisina en la posición +357, tal como se muestra en la FIG. 19. El ADN que codifica la CTLA4Ig se depositó el 31 de mayo de 1991 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, EEUU 20110-2209, conforme a lo dispuesto en el Tratado de Budapest y se le ha asignado el número de referencia ATCC 68629; P. Linsley et al., 1994, Immunity 1:793-80. Una línea celular CHO que expresa la CTLA4Ig se depositó el 31 de mayo de 1991 en la ATCC con el número de identificación CRL-10762. Las moléculas CTLA4Ig solubles producidas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento pueden o no incluir una secuencia peptídica de señalización (directora). La FIG 19 y la FIG 20 incluyen una ilustración de una secuencia peptídica de señalización (directora). Normalmente, las moléculas no incluyen una secuencia peptídica de señalización.

La L104EA29YIg es una proteína de fusión que es una molécula mutante de CTLA4 soluble que comprende un dominio extracelular de de CTLA4 de tipo silvestre con cambio de aminoácidos A29Y (un resto de aminoácido tirosina que sustituye a una alanina en la posición 29) y L104E (un residuo de aminoácido ácido glutámico que sustituye a una leucina en la posición +104) unidos a una cola Ig. La FIG. 20 ilustra la L104EA29YIg. La secuencia

de aminoácidos de L104EA29YIg comprende la alanina en la posición aminoacídica -1 hasta la lisina en la posición aminoacídica +357 tal como se muestra en la FIG. 20. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos de L104EA29YIg comprende metionina en la posición aminoacídica +1 hasta lisina en la posición aminoacídica +357 tal como se muestra en la FIG. 20. La L104EA29YIg comprende un residuo de aminoácidos de unión a glutamina en la posición +125 y una porción Ig que comprende ácido glutámico en la posición +126 a través de la lisina de la posición +357. El ADN que codifica la L104EA29YIg se depositó en junio del 2000 en la American Type Culture Collection (ATCC), conforme a lo dispuesto en el Tratado de Budapest y se le ha asignado el número de referencia ATCC PTA-2104. La 104EA29Y-Ig se describe en las solicitudes de patente de Estados Unidos codependientes con los números de serie 09/579.927, 60/287.576 y 60/214.065 y en el documento WO/01/923337 A2. Las moléculas L104EA29YIg solubles producidas mediante los procedimientos de cultivo de la presente invención pueden incluir o no una secuencia peptídica de señalización. Normalmente, las moléculas producidas de acuerdo con la invención no incluyen una secuencia peptídica de señalización.

Tal como se usa en el presente documento, el término “soluble” se refiere a cualquier molécula o fragmento de la misma que no está unido o enlazado a una célula, es decir, en circulación. Por ejemplo, la CTLA4 puede hacerse soluble uniendo un resto Ig al dominio extracelular de CTLA4. Alternativamente, una molécula tal como la CTLA4 puede volverse soluble eliminando su dominio transmembrana. Normalmente, las moléculas solubles producidas de acuerdo con la invención no incluyen una secuencia de señalización (o directora).

Una molécula CTLA4 soluble se refiere a una molécula no unida a la superficie celular (es decir, en circulación) que comprende CTLA4 de tipo silvestre o cualquier porción o derivado que se une a B7, incluidos, pero no limitados a, proteínas de fusión CTLA4 solubles; proteínas de fusión CTLA4 solubles tales como proteínas de fusión CTLA4Ig (por ejemplo, ATCC 68629), en las que el dominio extracelular de CTLA4 está fusionado con un resto Ig, que es una molécula Ig completa o una porción de la misma, preferentemente toda una región constante Ig o una porción de la misma, tal como toda IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCépsilon) o una porción de las mismas, volviendo la molécula de fusión soluble; las proteínas de fusión CTLA4 solubles en las que el dominio extracelular está fusionado a o unido con una porción de una proteína biológicamente activa o químicamente activa tal como el producto génico E7 del virus del papiloma (CTLA4-E7), el antígeno asociado a melanoma p97 (CTLA4-p97) o la proteína env del VIH (CTLA4-env gp120), tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.844.095; proteínas de fusión (quiméricas) híbridas tales como la CD28/CTLA4Ig tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.434.131; moléculas CTLA4 con el dominio transmembrana eliminado para volverlas solubles (véase, por ejemplo, M.K. Oaks et al., 2000, *Cellular Immunology*, 201:144-153, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad); la molécula CTLA4 mutante L104EA29YIg.

Una molécula CTLA4 también puede ser una molécula mutante de CTLA4 soluble. Las moléculas CTLA4 solubles producidas de acuerdo con la presente invención pueden incluir o no una secuencia peptídica de señalización (directora). El péptido de señalización puede ser cualquier secuencia que permitirá la secreción de la molécula, incluido el péptido de señalización de oncostatina M (Malik et al., 1989, *Molec. Cell. Biol.*, 9:2847-2853) o CD5 (N.H. Jones et al., 1986, *Nature*, 323:346-349) o el péptido de señalizacion de cualquier proteína extracelular. La molécula CTLA4 soluble producida mediante los procedimientos de cultivo de la invención puede incluir el péptido de señalizacion de oncostatina M unido al extremo N terminal del dominio extracelular de la CTLA4. Normalmente, en la invención, las moléculas no incluyen una secuencia peptídica de señalización.

“Proteína de fusión CTLA4” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre, o una porción del mismo que se une a B7, fusionado con un resto no-CTLA4 que vuelve la molécula CTLA4 soluble, tal como un resto Ig. Por ejemplo, una proteína de fusión CTLA4 puede incluir el dominio extracelular de CTLA4 fusionado con toda, o una porción de, la región constante Ig. Ejemplos de dominios constantes Ig (o porciones del mismo) que pueden fusionarse con CTLA4 incluyen todos, pero no están limitados a, los enumerados anteriormente en el presente documento. Una proteína de fusión CTLA4 puede ser también una molécula CTLA4 mutante.

Tal como se usa en el presente documento, “resto no-CTLA4” se refiere a una molécula o porción de la misma que no se une a CD80 y/o CD86 y no interfiere en la unión de la CTLA4 a su ligando. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, un resto Ig que es toda, o una porción de, una molécula Ig, una porción de una proteína biológicamente o químicamente activa tal como un producto génico E7 del virus del papiloma (CTLA4-E7), el antígeno p97 asociado a melanoma (CTLA4-p97) o la proteína env del VIH (CTLA4-env gp120) (tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos n.º de serie 5.844.095). Los ejemplos de restos Ig incluyen todo, o una porción del dominio constante de la inmunoglobulina, tal como IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCépsilon). El resto Ig puede incluir los dominios bisagra, CH2 y CH3 o los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de las regiones constantes mencionadas anteriormente u otras regiones constantes. Preferentemente, el resto Ig es humano o de mono e incluye los dominios bisagra, CH2 y CH3. Del modo más preferente, el resto Ig comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgCγ1 humano, o es los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgCγ1 humano. En un resto Ig, la región constante Ig, o una porción de la misma, puede mutarse, dando como resultado una reducción de

sus funciones efectoras (véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.637.481, 5.844.095 y 5.434.131.

El dominio extracelular de CTLA4 se refiere a cualquier porción de CTLA4 de tipo silvestre que reconoce y se une a B7. Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (FIG. 21). Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende alanina en la posición -1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (FIG. 21).

Tal como se usa en el presente documento, el término “mutación” se refiere a un cambio en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la molécula de tipo silvestre, por ejemplo, un cambio en el ADN y/o en las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre. Una mutación en el ADN puede cambiar un codón, provocando un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada. Un cambio en el ADN puede incluir sustituciones, deleciones, inserciones, ayuste alternativo o truncaciones. Un cambio de aminoácidos puede incluir sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones, truncaciones o errores de procesamiento o escisión de la proteína. De modo alternativo, las mutaciones en una secuencia de aminoácidos puede dar como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, como se entiende bien en la técnica. Como se entiende, también, que determinados codones de nucleótidos codifican el mismo aminoácido. Los ejemplos incluyen los codones de nucleótidos CGU, CGG, CGC y CGA, que codifican el aminoácido arginina (R); o los codones GAU y GAC, que codifican el aminoácido ácido aspártico (D).

De este modo, una proteína puede codificarse mediante uno o más moléculas de ácidos nucleicos que difieren en sus secuencias de nucleótidos, pero que aún así codifican moléculas de proteína que tienen secuencias idénticas. La molécula mutante puede tener una, o más de una, mutación. La secuencia de aminoácidos siguiente se presenta como guía:

Aminoácido	**Símbolo**	**Símbolo de una letra**	**Codones**
Alanina	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cisteína	Cys	C	UGU, UGC
Ácido aspártico	Asp	D	GAU, GAC
Ácido glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUU, UUC
Glicina	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidina	His	H	CAU, CAC
Isoleucina	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lisina	Lys	K	AAA, AAG
Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAU, AAC
Prolina	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Treonina	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valina	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Triptofano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

Tal como se usa en el presente documento, un “fragmento o porción” es una parte o segmento de una molécula. Para CTLA4 o CD28, un fragmento o porción es preferentemente el dominio extracelular de CTLA4 o CD28, o una parte o segmento del mismo, que reconoce y se une a B7 o interfiere con una B7 de modo que bloquea la unión a CD28 y/o CTLA4. También, tal como se usa en el presente documento, “que corresponde” significa que comparte identidad secuencial.

Tal como se usa en el presente documento, un “derivado” es una molécula que comparte la similaridad secuencial y la actividad de su molécula progenitora. Por ejemplo, un derivado de CTLA4 incluye una molécula CTLA4 soluble que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % similar al dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre, y que reconoce y se une a B7, por ejemplo, CTLA4Ig o la molécula mutante de CTLA4 soluble L104EA29YIg. Un derivado significa cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos y/o calidad química del aminoácido, por ejemplo, análogos de aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, “regular una respuesta inmunitaria” es activar, estimular, regular al alza, inhibir, bloquear, reducir, atenuar, regular a la baja o modificar la respuesta inmunitaria. Pueden tratarse varias enfermedades, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, regulado una respuesta inmunitaria regulando, por ejemplo, de forma funcional interacciones de células positivas a CTLA4 y/o CD28 con células positivas a B7. Por ejemplo, un procedimiento de regulación de una respuesta inmunitaria comprende poner en contacto células positivas a B7 con una molécula CTLA4 soluble, tal como las que se producen de acuerdo con la invención, para formar complejos CTLA4/B7 solubles, en los que la molécula CTLA4 interfiere con la reacción de una molécula CTLA4 y/o CD28 endógena con la molécula B7. “Bloquear” o “inhibir” un receptor, señal o molécula, tal como se denomina en el presente documento, significa interferir con la activación del receptor, señal o molécula, tal como se detecta mediante un ensayo reconocido en la técnica. El bloqueo o la inhibición puede ser total o parcial.

Tal como se usa en el presente documento, "que bloquea la interacción de B7" se refiere a que interfiere en la unión de B7 a sus ligandos, tales como CD28 y/o CTLA4, obstruyendo, por consiguiente, las interacciones de linfocitos T y células positivas a B7. Los ejemplos de agentes que bloquean las interacciones de B7 incluyen, pero no están limitadas a, moléculas tales como un anticuerpo (o porción del mismo) que reconoce y se une a cualquiera de las moléculas CTLA4, CD28 o B7 (por ejemplo, B7-1, B7-2); una forma soluble (o una porción de la misma) de las moléculas tales como la CTLA4 soluble; un fragmento peptídico u otra molécula pequeña diseñada para interferir con la señal celular a través de la interacción mediada por CTLA4/CD28/B7. El agente bloqueante puede ser una molécula CTLA4 soluble, tal como CTLA4Ig (ATCC 68629) o L104EA29YIg (ATCC PTA-2104); una molécula CD28 soluble, tal como CD28Ig (ATCC 68628); una molécula B7 soluble, tal como B7-Ig (ATCC 68627); un anticuerpo monoclonal anti-B7 (por ejemplo, ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 y anticuerpos monoclonales tal como se describen en el documento de patente de Estados Unidos n.º 6.113.898 o en Yokochi et al., 1982, *J. Immunol.*, 128(2):823-827); un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 (por ejemplo, ATCC HB-304, y anticuerpos monoclonales tal como se describen en las referencias 82-83); y/o un anticuerpo monoclonal anti-CD28 (por ejemplo, ATCC HB 11944 y MAb 9.3, tal como se describen en Hansen et al., 1980, *Immunogenetics*, 10: 247-260 o Martin et al., 1984, *J. Clin. Immunol.*, 4(1):18-22). El bloqueo de las interacciones de B7 puede detectarse usando análisis reconocidos en la técnica tales como la determinación de la reducción síntomas asociados a la enfermedad inmunitaria (por ejemplo, enfermedad reumática), la determinación de una reducción de las interacciones linfocito T / célula B7 o la determinación de una reducción en la interacción de B7 con CTLA4/CD28. El bloqueo puede ser parcial o total.

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz de una molécula se refiere a una cantidad que bloquea la interacción de la molécula con su ligando. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es la cantidad de la molécula que, cuando se une a moléculas B7 o células positivas a B7, inhibe que las moléculas B7 se unan a ligandos endógenos tales como CTLA4 y CD28. De modo alternativo, una cantidad eficaz de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es la cantidad de la molécula que, cuando se une a moléculas CTLA4 y/o CD28 en linfocitos T, inhibe que las moléculas B7 se unan a ligandos endógenos tales como CTLA4 y CD28. La inhibición o bloqueo puede ser parcial o completo.

Para protocolos clínicos, es preferente que el resto Ig de una proteína de fusión, tal como CTLA4Ig o CTLA4Ig mutante, no facilite una respuesta inmunitaria perjudicial en un sujeto. El resto preferente es toda, o una porción de, la región constante Ig, incluidas las regiones constantes de Ig humana o de primate no humana. Los ejemplos de regiones de Ig adecuadas incluyen IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCépsilon), incluidos los dominios bisagra, CH2 y CH3 o los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, que están implicados en funciones efectoras tales como la unión a receptores Fc, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o citotoxidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). El resto Ig puede contener una o más mutaciones, (por ejemplo, en el dominio CH2 para reducir las funciones efectoras tales como CDC o ADCC) en las que la mutación modula la capacidad del Ig para unirse a su ligando aumentando o disminuyendo la capacidad del Ig para unirse a receptores Fc. Por ejemplo, las mutaciones en el resto Ig pueden incluir cambios en cualquiera o todos los restos cisteína del dominio bisagra. Por ejemplo, las cisteínas de las posiciones +130, +136, y +139 se sustituyen por serina. El resto Ig también puede incluir la prolina en la posición +148 sustituida con una serina. Además, las mutaciones en el resto Ig pueden incluir que tenga la leucina en la posición +144 substituida por fenilalanina; la leucina en la posición +145 sustituida por ácido glutámico; o la glicina en la posición +147 sustituida por alanina.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos exponen aspectos específicos de la invención ilustrando la invención y proporcionan una descripción de los presentes procedimientos para aquellos de habilidad en la técnica. Los Ejemplos no deberían interpretarse como que limitan la invención, ya que los Ejemplos simplemente proporcionan metodología y ejemplificación que son útiles en la comprensión y práctica de la invención y sus diversos aspectos.

Los Ejemplos 1-5 según se expone más adelante describen experimentos relativos a procedimientos de cultivo celular que implican adición de glucocorticoides durante la actividad del cultivo.

Ejemplo 1

En este estudio, se estudiaron los efectos intracelulares de dexametasona (DEX) en el procedimiento de glucosilación celular de CHO y los efectos intracelulares debidos a la actividad de sialidasa. Aquí se demuestra por primera vez que DEX fue capaz de mejorar la sialilación de una glucoproteína de condensación recombinante producida por CHO. Los efectos netos de DEX en promover sialilación incrementada probada en cultivos de matraz de agitación se confirmaron después exitosamente en biorreactores controlados y dieron como resultado contenido de ácido siálico potenciado, así como velocidades de de-sialilación reducidas en los cultivos semicontinuos.

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originalmente a partir de células parentales DG44 y se cultivó en un medio de crecimiento libre de proteínas patentado.

Experimentos de matraz de agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de agitación de 250 ml (VWR international) con volúmenes de partida de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6×10^5 células/ml. Los cultivos se situaron en una plataforma agitadora (VWR international) a 150 rpm y se mantuvieron a 37°C y CO_2 al 6 % durante diez días. Los cultivos se muestraron diariamente y el pH se ajustó según se necesitó usando carbonato de sodio 1M y se alimentaron con glucosa y glutamina cada dos días con el fin de mantenerlas a niveles adecuados. Se midieron la densidad y la viabilidad celulares fuera de línea usando un contador celular automatizado Cedex (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania). El pH de los cultivos y las concentraciones para glucosa y glutamina se midieron fuera de línea usando un Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).

Operación de biorreactores

Los experimentos de biorreactores se llevaron a cabo en biorreactores de 5 l (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) con volúmenes de trabajo de 1,5 l. La agitación, el pH y el oxígeno disuelto se controlaron a 150 rpm, 7,05 y saturación del aire al 50 %, respectivamente. La temperatura se controló inicialmente a 37°C, pero se cambió a una temperatura más baja durante el cultivo prolongando la viabilidad del cultivo. Los biorreactores se operaron en modo semicontinuo y se alimentaron diariamente comenzando en el día 3 con el medio nutriente patentado manteniendo concentraciones adecuadas para glucosa y otros nutrientes. Se tomaron muestras durante el proceso de cultivo celular y se analizaron para densidad celular, viabilidad celular, sustratos y metabolitos.

Análisis de inmunotransferencia de α2,3-sialiltransferasa (α2,3-ST) y β1,4-galactosiltransferasa (β1,4-GT)

Aproximadamente 10^7 células CHO se lavaron con Solución Salina Tamponada con Fosfato 1X (PBS), se lisaron con 1 ml de tampón de muestra de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA), después se desnaturalizaron a 90 °C durante 5 minutos. Los lisados de células completas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 4-15 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA), y se exploraron con anticuerpos primarios y secundarios. Los anticuerpos primarios fueron anticuerpos policlonales de conejo α2,3-ST anti-humanos y anticuerpos policlonales de conejo β1,4-GT anti-humanos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). El anticuerpo secundario fue anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las membranas se retiraron y se re-exploraron con un anticuerpo de β-actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo secundario antirratón conjugado con HRP. La inmunodetección se llevó a cabo usando un sistema de detección de análisis de inmunotransferencia de quimioluminiscencia potenciada (GE Healthcare) y se visualizó con un Sistema de Formación de Imágenes VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA).

Medida de actividad sialidasa en sobrenadante

La actividad sialidasa se analizó usando el Kit de Ensayo de Neuraminidasa (Sialidasa) Amplex Red (Invitrogen, Carlsbad, CA). Brevemente, la neuraminidasa en la muestra se usó desialilando fetuina. Este ensayo utiliza Amplex Red detectando H_2O_2 generado por oxidación de los residuos de galactosa desialilada en la fetuina por galactosa oxidasa. El H_2O_2, en presencia de HRP, reacciona estequiométricamente con el reactivo de Amplex Red generando el producto de oxidación rojo-fluorescente, resorufina 5, que se analiza después bien fluorométricamente o bien espectrofotométricamente. En cada ensayo, se añadieron 50 µl de solución de trabajo (Amplex Red 100 µM, 0,2 u/ml de HRP, 4 u/ml de galactosa oxidasa y 500 µg/ml de fetuina) dentro de cada pocillo de microplaca conteniendo 50 µl de sobrenadante de cultivo celular diluido. Después de incubación de 30 minutos a 37 °C, se analizaron muestras para absorbancia a 560 nm usando un lector de microplaca.

Ensayo de ácido siálico

El ácido siálico para la proporción molar de proteína recombinante se calculó determinando las concentraciones de ácido siálico y de proteína recombinante. El ácido siálico (SA), incluyendo N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido N-

glicolilneuramínico (Neu5Gc), se liberó por hidrólisis de ácido parcial. Los derivados se separaron después por HPLC en fase reversa determinando contenido de ácido siálico. Las concentraciones proteicas se determinaron por absorbancia UV a 280 nm. El contenido de ácido siálico se indica en forma de proporciones molares, que son los moles totales de Neu5Ac y de Neu5Gc por mol de glucoproteína recombinante. Los contenidos de ácido siálico se dan como valores normalizados, que son los valores reales divididos por un valor arbitrario. En los estudios de los que se informa en el presente documento se usó el mismo divisor para normalizar todos los datos de contenido de ácido siálico.

Medida de oligosacáridos N-ligados

Se usó cromatografía de intercambio aniónico a pH alto con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD) para el trazado de perfiles de oligosacáridos N-ligados (Basa and Spellman 1990; Townsend and Hardy 1991) proporcionando información en glucosilación N-ligada específica de sitio. Los oligosacáridos N-ligados se escindieron de la proteína y se separaron en HPAEC-PAD en cuatro dominios basados en la cantidad de ácido siálico presente. El dominio I representa las especies asialo. Los dominios II, III y IV son especies sialiladas y representan especies monosialiladas, disialiladas y tri- y tetra-sialiladas, respectivamente. La fracción de especies sialiladas unidas a N se da como el porcentaje de especies sialiladas unidas a N dentro del total de especies de oligosacáridos unidos a N total, lo que incluye tanto las especies asialo como las sialiladas. Las fracciones de especies sialiladas unidas a N se dan como valores normalizados, que son los valores reales divididos por un valor arbitrario. En los estudios de los que se informa en el presente documento se usó el mismo divisor para normalizar todos los datos de la fracción de especies sialiladas unidas a N.

Medida de oligosacáridos O-ligados

La glucosilación O-ligada se caracterizó por análisis de masa intacta de un estándar de referencia y de muestras purificadas de Proteína A de la proteína de condensación (Referencia). Las muestras se diluyeron en Tris 100 mM, NaCl 25 mM, pH 7,6 y se incubaron con PNGasa F durante toda una noche eliminando enzimáticamente todos los oligosacáridos N-ligados. Las muestras se inyectaron después para análisis de masa intacta después de mezclar con un estándar interno de insulina. El contenido de ácido siálico O-ligado se comunica en forma de proporciones molares, que son los moles de ácido siálico O-ligado por mol de glucoproteína recombinante.

Resultados

La dexametasona aumenta el contenido de ácido siálico y el porcentaje de especies sialiladas en oligosacáridos N-ligados

La línea celular DG44 de CHO que expresa la glucoproteína de condensación se trató con diversos niveles de DEX evaluando si DEX afectó el contenido de ácido siálico y los porcentajes de las diferentes especies sialiladas. Este estudio se llevó a cabo en matraces de agitación de 250 ml duplicados usando las condiciones de cultivo como se describen anteriormente. En el segundo día después de la inoculación, se añadió DEX a cultivos de células CHO a concentraciones finales que varían desde DEX 0,01 µM hasta DEX 10 µM. Los cultivos se recogieron en el día 10 y la proteína de condensación se purificó usando una columna de proteína A y se analizó para contenido de ácido siálico total, para contenido de ácido siálico O-ligado total y para el perfil de N-ligado. La sialilación se incrementó en los cultivos tratados con DEX en una manera dependiente de concentración (Tabla 1).

Tabla 1

Tratamiento de DEX (µM)	Incremento en porcentaje de ácido siálico (%)	Incremento en porcentaje de N-enlace asialo- (%)	Incremento en porcentaje de N-enlace-Mono- (%)	Incremento en porcentaje de N-enlace-Di- (%)	Incremento en porcentaje de N-enlace-Tri y tetra- (%)	Incremento en porcentaje de ácido siálico de O-enlace (%)
0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01	9,3	-8,6	6,6	13,9	4,5	0,0
0,1	13,0	-9,6	7,3	13,9	13,6	0,5
1,0	13,0	-10,0	4,3	19,4	15,9	0,9
10	20,4	-15,6	7,3	24,3	20,5	0,0

Concentraciones de DEX desde 0,01 µM hasta 10 µM dieron como resultado incremento en 9,3 % al 20,4 % en el contenido de ácido siálico, con un efecto máximo a 10 µM. Comparados con el control, los cromatógrafos de oligosacáridos N-ligados para cultivos con tratamiento de DEX mostraron fracciones monosialiladas, disialiladas y las fracciones trisialiladas más tetrasialiladas del 4,3 % al 7,3 %, 13,9 % al 24,3 % y 4,5 % al 20,5 %, respectivamente. A la inversa, hubo una reducción 8,5 % al 15,6 % comparada con el control en fracciones asialo en las distribuciones de oligosacáridos para los cultivos suplementados con DEX. Los cromatogramas N-ligados también mostraron el efecto máximo a DEX 10 µM. Estos resultados indican sialilación incrementada en los cultivos tratados con DEX. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las proporciones molares de ácido siálico O-ligado a partir de las muestras tratadas con DEX.

DEX promueve la expresión de β1,4-galactosiltransferasa (β1,4-GT) y α2,3-sialiltransferasa (α2,3-ST)

Se empleó el análisis de inmunotransferencia dilucidando los mecanismos potenciales de DEX sobre sialilación estudiando la expresión de dos enzimas, β1,4-GT y α2,3-ST, que están implicadas en las rutas de adición de ácido siálico. En este experimento, se añadió DEX el segundo día después de la inoculación a cultivos a concentraciones desde 0,1 μM hasta 100 μM y las células se recogieron para análisis de inmunotransferencia después de tres días. La proteína doméstica β-actina se usó comparando la carga de muestras. Como se muestra en las Figuras 1A y 1B, la expresión de niveles de β1,4-GT y de α2,3-ST se incrementó sustancialmente en los cultivos tratados con DEX comparados con los cultivos sin tratamiento con DEX. La intensidad de expresión para ambas enzimas se incrementó, en general, con la concentración de DEX. Estos resultados demostraron que DEX fue capaz de estimular expresión de las sialiltransferasas β1,4-GT y α2,3-ST en células CHO.

Efecto citoprotector de los resultados de DEX en actividad sialidasa reducida en el sobrenadante de cultivo

En el Ejemplo 3, se mostró que el tratamiento de DEX incrementaba la expresión de la proteína anti-apoptótica GILZ dando como resultado aparición retardada de muerte celular y viabilidad potenciada de los cultivos celulares de CHO. Para determinar si el incremento en viabilidad celular debido a DEX podría disminuir el efecto degradador de las sialidasas en la proteína de condensación recombinante, se inició un estudio de matraz de agitación comparando viabilidad celular y perfiles de actividad sialidasa de sobrenadantes de cultivos con o sin DEX 1 μM. Como se muestra en la Figura 2A y en la Fig. 2B, la actividad sialidasa incrementada estaba asociada con las viabilidades celulares disminuidas tanto en los cultivos tratados con DEX como en los cultivos no tratados. La viabilidad celular disminuyó desde el 98,0 ± 0,1 % en el día 4 hasta el 85,0 ± 2,7 % en el día 10 en los cultivos tratados con DEX comparada con una viabilidad en el día 10 del 70,2 ± 4,6 % para el control. La medida de absorbancia de actividad sialidasa se incrementó desde el 0,006 ± 0,002 en el día 4 hasta el 0,024 ± 0,003 en el día 10 en los cultivos tratados con DEX comparada con un valor del día 10 de 0,047 ± 0,004 en el control. Así, la velocidad a la que los cultivos tanto declinaron en viabilidad celular, así como se incrementaron en actividad sialidasa fueron significativamente más bajas en los cultivos tratados con DEX. Estos resultados sugieren que DEX fue capaz de inhibir liberación de sialidasa por su efecto citoprotector.

Comparación de dexametasona con otros dos glucocorticoides, hidrocortisona y prednisolona

Se evaluaron también compuestos glucocorticoides adicionales, hidrocortisona (HYC) y prednisolona (PRD) determinando si el efecto de DEX en incrementar sialilación en las células CHO podría extenderse a otros compuestos glucocorticoides. DEX, HYC y PRD se añadieron en el medio de cultivo celular en el segundo día después de inoculación en las concentraciones finales 0, 0,1, 1 y 10 μM. La Fig 3A y la Fig 3B muestran el contenido normalizado de ácido siálico total y la fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N después del cultivo de 10 días para las diferentes condiciones de glucocorticoides. El contenido de ácido siálico total en concentraciones de glucocorticoide entre 0,1 y 10 μM fue 14,0 ± 0,5 para DEX, de 11,2 ± 0,1 a 13,0 ± 0,2 para HYC y de 11,8 ± 0,2 a 13,4 ± 0,8 para PRD, en comparación con 10,2 ± 0,2 para el control. La fracción de especies sialiladas unidas a N en concentraciones de glucocorticoides entre 0,1 y 10 μM fue 85,6 ± 1,6 a 88,8 ± 0,9 para DEX, 79,8 ± 1,6 a 89,6 ± 0,1 para HYC y 83,7 ± 0,1 a 89,0 ± 0,2 para PRD, en comparación con 77,1 ± 0,7 para el control. Así, de forma similar a DEX, tanto HYC como PRD mostraron también incrementos en sialilación y el efecto máximo se observó a 10 μM para todos los tres compuestos glucocorticoides dentro del intervalo de concentración estudiado. Sin embargo, las concentraciones más altas de HYC y PRD se requirieron para lograr el mismo nivel de potenciación de la sialilación como DEX.

Mecanismo para potenciación de sialilación por dexametasona implica el receptor de glucocorticoides

Con el fin de determinar si la mejora de sialilación a partir de adición de DEX estuvo mediada por el receptor de glucocorticoides (GR), el antagonista de GR mifepristona (RU-486) se añadió al medio de cultivo celular antes de tratamiento con DEX. Específicamente, se añadió 1 μM de RU-486 48 horas después de inoculación y DEX, a concentraciones de 0,1, 1 y 10 μM, se añadió después 24 horas más tarde. DEX se añadió también a cultivos sin RU-486 como controles. Para condiciones con o sin RU-486, el contenido normalizado de ácido siálico total y la fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N inducidas por DEX se muestran en la Fig. 4A y en la Fig. 4B, respectivamente. La capacidad de DEX para potenciar la sialilación del producto se redujo sustancialmente en presencia de 1 μM de RU-486 y fue lo más evidente para la condición de DEX 0,1 μM. El contenido de ácido siálico total y la fracción de especies sialiladas unidas a N para las condiciones de DEX 0,1 μM disminuyó de 15,1 ± 0,1 y 92,2 ± 2,0 (sin RU-486) hasta 2,7 ± 0,1 y 81,5 ± 0,8 (con RU-486 1 μM), respectivamente. Estos resultados indican que el mecanismo por el que DEX incrementó sialilación era dependiente de GR, dado que RU-486 compite con DEX por el dominio de unión a ligando del GR (Raux-Demay et al. 1990).

Aplicación de DEX en cultivo de biorreactor semicontinuo

El efecto de DEX en el aumento de la sialilación de proteína de condensación encontrada en los matraces de agitación se probó después en cultivos semicontinuos usando biorreactores de 5 l controlados. Los biorreactores se operaron como describe la sección de procedimientos. Se observó un contenido de ácido siálico total (Fig. 5A) y una

fracción de especies sialiladas ligadas a N (Fig. 5B) más elevados en los cultivos con la adición de un bolo de DEX 1 µM. El contenido de ácido siálico total con DEX fue 16,5 ± 0,1 en comparación con 14,2 ± 0,1 para el control (16,2 % de aumento). De forma similar, la fracción de las especies sialiladas con DEX fue 90,2 ± 1,3 en comparación con 77,9 ± 1,6 para el control (5,8 % de aumento). . De acuerdo con la observación en estudios de actividad de sialidasa en matraces de agitación (Fig. 3A y Fig. 3B), los contenidos de siálicos totales decrecieron entre los días 8 a 14 de 17,9 ± 0,1 a 16,5 ± 0,1 (-7,8 %) con DEX en comparación con de 16,3 ± 0,1 a 14,2 ± 0,1 (-12,9 %) para el control. De forma similar, el porcentaje de la fracción sialilada entre los días 8 a 14 disminuyó de 97,7 ± 0,9 a 90,2 ± 1,3 (-7,7 %) con DEX en comparación con de 91,3 ± 0,9 a 77,9 ± 1,6 (-14,7 %) para el control.

El incremento en sialilación de glucoproteínas por DEX se confirmó adicionalmente a diversas escalas de biorreactores. El contenido de ácido siálico final normalizado y el porcentaje normalizado de fracciones sialiladas a partir de diferentes funcionamientos se resumen en la Figura 6. Dentro de estos funcionamientos, la condición de DEX incluyó funcionamientos con DEX añadida como un bolo o incluida en el medio nutriente. Como se indica en la Figura 6, DEX mostró mejora en sialilación significativa con contenido de ácido siálico final potenciado (valor de $p < 0,001$ por prueba t) y fracción de especies sialiladas finales (valor de $p < 0,001$ por prueba t).

Conclusión

La adición de dexametasona a un cultivo de CHO que produce una glucoproteína de condensación recombinante dio como resultado sialilación incrementada. Este estudio fue el primero en demostrar que la dexametasona fue capaz de incrementar la expresión de las glucosiltransferasas α2,3-ST y β1,4-GT y que el efecto de dexametasona estaba mediado por receptores de glucocorticoides. En conjunto el efecto de la dexametasona en mejorar la sialilación implicó tanto efectos intracelulares por las glucosiltransferasas así como efectos extracelulares por prolongar la viabilidad de cultivos que disminuye la presencia de sialidasas liberadas dentro del sobrenadante del cultivo a través de lisis celular. Se encontró que dexametasona es un procedimiento conveniente para mejora de sialilación.

Ejemplo 2

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originalmente a partir de células parentales DG44 y se cultivó en un medio de crecimiento patentado libre de proteínas. Las células hospedadoras se modificaron mediante ingeniería genética para segregar una proteína de condensación de IgG bajo el control de promotor de CMV.

Experimentos de matraz de agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de agitación de 250 ml (VWR international) con volúmenes de partida de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6×10^5 células/ml. Los matraces de agitación se situaron en una plataforma agitadora (VWR international) a velocidad de rotación de 150 rpm. Las células se cultivaron en condición humidificada estándar a 37°C y a CO_2 al 6 %, para una duración de diez días con ajuste de pH diario usando carbonato de sodio 1 M y se alimentaron con glucosa y glutamina cada dos días con el fin de mantenerlas a cierto nivel. La densidad celular, la viabilidad celular y los sustratos/metabolitos se analizaron fuera de línea por un sistema de recuento celular automatizado Cedex (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania) y un Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). El sobrenadante de cada cultivo se recogió para análisis de SEC.

Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)

El análisis de SEC se llevó a cabo según el procedimiento previamente publicado (Perico et al., 2008) con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras purificadas de Proteína-A se sometieron a funcionamiento en un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) en columna Tosoh Bioscience TSK-Gel G3000 SWxl (7,8 DI x 30 cm, partículas de 5 µm). La fase móvil contenía Solución Salina Tamponada con Fosfato 1 x (PBS) a pH 7,4. El caudal fue 0,5 ml/minuto y la temperatura en columna se controló a 25 °C. La señal se sometió a control por absorbancia a longitud de onda de 280 nm.

Análisis de inmunotransferencia de glutatión reductasa y de receptor de glucocorticoides

Después de lavarse con PBS 1 x, se lisaron aproximadamente 10^7 células CHO con 1 ml de tampón de muestras de Laemmli (Bio-Rad Laboratories) y se desnaturalizaron a 90 °C durante 5 minutos. Los lisados de células completas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 4-15 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories), y se exploraron con anticuerpos primarios y secundarios. El anticuerpo primario para detección de glutatión reductasa fue el anticuerpo monoclonal desarrollado contra los aminoácidos 391-510 que mapean cerca del extremo C-terminal de la glutatión reductasa de origen humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Aunque el origen de hámster chino no se enumeró por el fabricante para la detección de glutatión reductasa usando este anticuerpo, un experimento preliminar mostró que hubo solo una banda detectada en los lisados tanto de células CHO como de células HL60 de origen humano con un tamaño molecular aparente idéntico en la mancha. El anticuerpo primario usado para detección de receptor glucocorticoide fue anticuerpo monoclonal

anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). El anticuerpo secundario fue anticuerpo antirratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las membranas se retiraron y se re-exploraron con un anticuerpo de β-actina (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La inmunodetección se llevó a cabo con el sistema de detección de análisis de inmunotransferencia de quimioluminiscencia potenciada (GE Healthcare) y se visualizó con un Sistema de Formación de Imágenes VersaDoc (Bio-Rad Laboratories).

Resultados

La dexametasona (DEX) reduce la agregación de proteínas de condensación de IgG producidas por CHO en un amplio intervalo de concentraciones

La Figura 7A muestra un porcentaje significativamente reducido de especies de peso molecular alto (HMW) en proteína de condensación de IgG después de tratar células CHO con DEX a una concentración final 1 μM en el medio de cultivo. Los componentes principales de especies HMW fueron dímeros y trímeros formados covalentemente o de forma no covalente y considerados categóricamente como agregados de proteínas. Considerando que se obtuvo un 15 % de reducción de agregación de proteínas en las condiciones de cultivo, que ya se habían optimizado, la mejora fue significativa, en la práctica, en procedimientos de fabricación. Para establecer la curva de respuesta a dosis y el transcurso del tiempo para los efectos de DEX en agregación de proteínas, cultivamos las células bien a concentración diferente de DEX o bien a la misma concentración (1 μM) pero con diferente tiempo de incubación. Como se muestra en la Fig. 7C, la DEX reduce la tasa de agregación de proteínas de forma dependiente del tiempo, lo que es consistente con la dependencia del tiempo de DEX observada previamente sobre la mejora de la viabilidad celular y los perfiles de glucosilación proteica (Tabla 1 y Figura 11). No obstante, la dependencia de la concentración de DEX sobre la reducción del nivel de agregación de proteínas no fue obvia (Figura 7B), lo que sugiere que el efecto antiagregación no fue debido simplemente a la mejora de la viabilidad celular, ya que nuestros resultados previos demostraron que la viabilidad de células CHO aumentó con la concentración de DEX de 0,01 μM a 10 μM en el medio de cultivo

La dexametasona regula al alza la expresión de glutatión reductasa en células CHO

Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia detectando expresión de glutatión reductasa en los lisados celulares completos preparados a partir de las células CHO tratadas con diversas concentraciones de DEX. Como se muestra en la Figura 8, DEX incrementa la expresión de glutatión reductasa, que podría verse incluso cuando el fármaco estaba a 1 nM. Se usó detección de β-actina para comparación de carga de muestras para eliminar la posibilidad de que la potenciación de la banda de glutatión reductasa se debiera a la carga de muestras incrementada coincidentalmente.

GSH reduce la agregación de proteínas de condensación de IgG purificadas *in vitro*

Para determinar si GSH podría afectar por sí misma la agregación de proteínas interaccionando directamente con las proteínas, realizamos un estudio *in vitro* añadiendo GSH a proteínas de condensación de IgG purificadas de Proteína-A que se reconstituyeron en tampón de Tris-acetato, y se analizaron perfiles de SEC. Tal como se muestra en la Figura 9, el porcentaje de especies de alto peso molecular se redujo significativamente, siendo la tasa de reducción del 15,3 % y del 27,3 % en presencia de GSH 1 y 3 mM, respectivamente. Los datos demostraron claramente que GSH podría inhibir directamente la agregación de proteínas de condensación de IgG.

Los efectos de dexametasona están mediados por medio de receptores glucocorticoides

DEX es un potente glucocorticoide con acciones farmacológicas amplias. Determinando si el efecto inhibidor de DEX en agregación proteica de condensación con IgG estuvo mediado específicamente por activación de receptores de glucocorticoides, se confirmó primero que hay expresión endógena de receptores de glucocorticoides (GR) en la línea celular utilizada, que se presenta en la Fig. 10A. Dado que el anticuerpo usado en el análisis de inmunotransferencia se desarrolló contra la región conservada de GR humanos, se cargó también una muestra de lisado celular completo de células HepG-2 como muestra de origen humano para propósito de validación de anticuerpos. Aunque el anticuerpo podría detectar tanto GRα como GRβ, el presente análisis solo mostró una banda individual. Esto podría ser debido a que los pesos moleculares de estas dos isoformas (95 kDa frente a 90 kDa) estuvieron demasiado cerca de separarse en el gel de gradiente del 5-15 % o más probablemente debido a que solo hubo una isoforma presentada en las muestras.

Dado que se encontró que DEX regula al alza la expresión de glutatión reductasa en células CHO (véase Figura 8), se indujo una evaluación adicional determinando si este efecto estuvo inducido por la activación de receptores de GR. La RU-486 es un antagonista de GR y se usa a menudo como un fármaco herramienta en muchos estudios relacionados con GR. El experimento preliminar de los autores de la presente invención mostró que RU-486 no afectó la viabilidad celular de CHO y no afectó los parámetros metabólicos si las concentraciones no eran más altas que 1 μM; a 10 μM, se observó un decrecimiento significativo en viabilidad celular y velocidad de crecimiento celular. En los experimentos subsiguientes, RU-486 se usó por lo tanto a 1 μM o a concentraciones menores y se introdujo

dentro del cultivo pretratando células CHO un día antes de la adición de DEX. La Fig. 10B muestra que en la presencia de RU-486 1 μM, el efecto regulador al alza de DEX en glutatión reductasa se atenuó, confirmando la implicación de GR.

Finalmente, se evaluaron los porcentajes de especies de P.M.A. en proteínas de condensación de IgG producidas por células CHO tratadas con DEX 0,1 μM y su combinación con diferentes concentraciones de RU-486. Consistente con el resultado en la Fig. 7B, el porcentaje de especies de P.M.A. estuvo disminuido en aproximadamente el 16 % cuando el cultivo se trató con DEX 0,1 μM solo y este efecto se disminuyó gradualmente con concentraciones crecientes de RU-486 (Fig. 10C). Con la condición de que se usara igual concentración de DEX y de RU-486, la velocidad de inhibición de especies de P.M.A. fue aproximadamente la mitad de la velocidad obtenida de DEX solo, indicando que DEX como un agonista y RU-486 como un antagonista tuvieron afinidades similares compitiendo la una con la otra por GR en células CHO. Así, tomando todas las tres partes de datos en la Figura 9 conjuntamente, los resultados demostraron claramente que la inhibición de la agregación de proteínas de condensación de IgG estuvo mediada por GR.

Conclusión

Como glucocorticoide económico pero potente y con su tríada benéfica, mejorando la viabilidad celular como se describe en el Ejemplo 3 y la glucosilación como se describe en el Ejemplo 1 e inhibiendo agregación proteica como se describe en el presente documento, la dexametasona puede proporcionar una manera simple, rentable y eficiente para potenciar en conjunto el proceso de cultivo celular.

Ejemplo 3

Este estudio, por primera vez, demostró que la dexametasona es capaz de evitar apoptosis de células CHO en condición libre de suero en una manera dependiente de concentración y de tiempo. DEX induce la expresión génica de células GILZ (cremallera de leucina inducida por glucocorticoides). DEX se usó exitosamente en cultivo de CHO de biorreactor de 10 l mejorando la viabilidad celular y la productividad de proteínas de condensación Fc y el contenido de ácido siálico. Este estudio demostró la aplicación de DEX en cultivo celular industrial mejorando la productividad de proteínas recombinantes y la glucosilación.

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó a partir de células parentales DG44 y se cultivó en un medio de crecimiento químicamente definido patentado.

Experimentos de matraz de agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de agitación de 250 ml (VWR international) con volúmenes de partida de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6×10^5 células/ml. Los cultivos se situaron en una plataforma agitadora (VWR international) a 150 rpm y se mantuvieron a 37°C y CO_2 al 6 % durante diez días. Los cultivos se muestraron diariamente y el ajuste de pH se realizó usando carbonato de sodio 1M y se alimentaron con glucosa y glutamina cada dos días con el fin de mantenerlas a ciertos niveles. La densidad celular y la viabilidad celular se midieron fuera de línea en un Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).

Operación de biorreactores

Los experimentos de biorreactores se llevaron a cabo en biorreactores de 10 l (Sartorius Stedim Biotech, Francia) con volúmenes de trabajo de partida de 5 l. La agitación, el pH y el oxígeno disuelto se controlaron a 150 rpm, 7,05 y saturación del aire al 50 %, respectivamente. La temperatura se controló inicialmente a 37°C, y se cambió a una temperatura más baja durante el cultivo prolongando la viabilidad del cultivo. Los biorreactores se operaron en un modo por lotes y se alimentaron diariamente comenzando en el día 3 con el medio nutriente patentado manteniendo concentraciones adecuadas para glucosa y otros nutrientes. Se tomaron muestras durante el proceso de cultivo celular y se analizaron para densidad celular, viabilidad celular, sustratos y metabolitos.

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real de 5'-nucleasa TaqMan® para verificar la regulación al alza de GILZ por DEX. El ARN total, se purificó a partir de cada cultivo por triplicado con y sin DEX 1 μM usando el kit RNeasy® midi tal como se describe a continuación. El ARN purificado se trató con DNasal (Quiagen) exenta de Rnasa y despuyés se usó como plantilla para sintetizar el ADNc de primera cadena usando el kit RT^2 First Strand (SA Biosciences, Frederick, MD). La expresión de GILZ se determinó cuantitativamente usando la sonda específica de GILZ TaqMan MGB (6-FAM-AGAGGACTTCACGTGT) y cebadores (directo: 5-CCTCCCTCATCTGTCCACTGA-3 e inverso: 5-TGGTGGGTTTGGCATTCAA-3). Se amplificaron 20 ng de ADNc usando cebadores a una concentración 900 nM y sonda a una concentración 250 nM en 1xTaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Carlsbad, CA). Las reacciones se realizaron por triplicado en el APPied Biosystems 7500 Fast Real-Time

PCR System usando los parámetros de ciclación universales (20 s 95 ºC, 40 ciclos de 3 s 95 ºC, 30 s 60 ºC). Se realizaron reacciones paralelas en la misma placa analizando β-actina en cada muestra como control endógeno. El ciclo umbral de cada gen se normalizó frente al ciclo umbral del "gen doméstico" β-actina. Se calcularon los cambios normalizados en la expresión génica con respecto al control usando un procedimiento de ciclo umbral delta-delta (Livak y Schmittgen, 2001).

Análisis de inmunotransferencia de GILZ

Se lavaron aproximadamente 10^7 células CHO con Solución Salina Tamponada con Fosfato 1X (PBS), se lisaron con 1 ml de tampón de muestra de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA), y después se desnaturalizaron a 90 ºC durante 5 minutos. Los lisados de células completas se separaron en un gel de poliacrilamida al 4-15 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories) y se exploraron con un anticuerpo monoclonal murino primario dirigido a Bcl-2 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguido por anticuerpo secundario anti-murino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se retiraron y se re-exploraron con un anticuerpo de β-actina (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario antimurino conjugado con HRP. La inmunodetección se llevó a cabo con el sistema de detección de análisis de inmunotransferencia de quimioluminiscencia potenciada (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) y se visualizó con un Sistema de Formación de Imágenes VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Ensayo de Valoración

Se determinó valoración por cromatografía de afinidad usando una bomba de HPCL y detección de UV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y columna de Proteína A Poros A/20 de Applied Biosystems (100 x 4,6 mm). La proteína eluida se cuantificó usando una curva estándar de nivel 10.

Resultados

Efecto de la dexametasona sobre el crecimiento de células CHO

La dexametasona glucocorticoide (DEX) se añadió a cultivos de matraces de agitación a concentraciones finales entre 0,01 a 10 µM dos días después de inoculación evaluando los efectos de glucocorticoides en viabilidad celular de CH y el potencial para prolongar el periodo de cultivo celular. El perfil de la densidad celular viable (VCD) en el estudio de respuesta a dosis (Fig. 11A) muestra inhibición incrementante de crecimiento celular que tiene lugar un día después del tratamiento de DEX en una manera dependiente de dosis. El VCD pico alcanzó 8,5 x 10^6 células/ml en el cultivo control no tratado, mientras que el VCD pico fue 6,5 x 10^6 células/ml en los cultivos tratados con DEX 10 µM. La viabilidad celular disminuyó rápidamente después del día 6 (Fig. 11B) y la viabilidad en porcentaje en el día 10 fue solo 42,1 %. Por el contrario, las viabilidades celulares finales con 0,01µM y DEX 10 µM fueron 53,1 % y 64,0 %, respectivamente. La pérdida de viabilidad empezando en el día 6 mejoró en una manera dependiente de la concentración en los cultivos tratados con DEX, con un efecto máximo a 10µM (Figuras 11A y 11B).

Un estudio en el transcurso del tiempo para la adición de DEX se llevó a cabo después en cultivos de matraces de agitación en los que se añadió DEX a una concentración final de DEX de 1 µM y se añadió entre el día de la inoculación hasta el sexto día después de la inoculación. Como se muestra en las Figuras 11C y 11D, la VCD final y la viabilidad celular se incrementaron en todos los cultivos tratados con DEX y tanto VCD como la viabilidad celular mejoraron en una manera dependiente del tiempo con coordinación de adición de DEX más temprana. La viabilidad de cultivos celulares de CHO no tratados disminuyó al 50 % en el día 10, mientras que en los cultivos en los que se añadió DEX en los días 0, 2, 4 y 6 fue el 63, el 68, el 72 y el 74 %, respectivamente.

DEX reduce la velocidad de crecimiento específico pero incrementa la productividad específica de células

La velocidad de crecimiento específica, la productividad volumétrica normalizada y la productividad específica celular normalizada se cuantificaron y compararon entre células tratadas con DEX y no tratadas. Los datos que comparan los perfiles de velocidades de crecimiento celular específicas normalizadas y los perfiles de productividad normalizada con o sin DEX 1 µM se muestran en la Figura 12A y en la 12B (n = 5). Se añadió DEX en el día 2, dando como resultado aproximadamente una reducción del 30 % en velocidades de crecimiento celular con DEX comparado con control el día después de la adición de DEX. Sin embargo, este efecto de inhibición del crecimiento disminuyó con el tiempo de cultivo. Al final del periodo de cultivo, las velocidades de muerte celular fueron menores en cultivos con células tratadas con DEX. Además, la inhibición del crecimiento celular temprana inducida por DEX no afectó a la productividad volumétrica normalizada (6,5 para todos los cultivos); sin embargo, los cultivos con tratamiento de DEX tuvieron significativamente productividad específica más alta que las células no tratadas, con una productividad específica normalizada máxima de (7,0 ± 0,6) x 10^{-9}.

La expresión al alza de GILZ se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de inmunotransferencia

Se analizó GILZ usando PCR cuantitativa a tiempo real para validar los perfiles de expresión génica obtenidos por análisis de micromatrices. Se aplicó la cuantificación de PCR cuantitativa en TaqMan® a muestras de ARN del día 5 y del día 8 para cultivos tratados con DEX y no tratados por triplicado. Se establecieron reacciones paralelas en la misma placa en que se analiza β-actina en cada muestra como control endógeno. Tal como se muestra en la Fig. 13A, los cambios en el perfil de expresión normalizado de GILZ obtenidos por PCR cuantitativa en tiempo real en las muestras del día 5 y del día 8 son 7,66 ± 1,08 y 10,48 ± 2,16, respectivamente.

Se analizaron mediante inmunotransferencia lisados celulares procedentes de cultivos del día 5 con y sin tratamiento con DEX 1 μM para analizar si GILZ estaba sobreexpresada en los cultivos tratados con DEX. La transferencia se volvió a investigar también con el anticuerpo beta-actina como un control evaluando la carga de gel equivalente. Como se muestra en la Fig. 13B, la expresión de proteína GILZ aumentó significativamente en las muestras tratadas con DEX, en comparación con las muestras no tratadas. Además, los cambios en el plegamiento de GILZ causados por DEX son ligeramente superiores en las muestras del día 8 que en las muestras del día 5, lo que está de acuerdo con los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real.

Comparación de dexametasona con otros dos glucocorticoides, hidrocortisona y prednisolona

Experimentos en matraces de agitación probaron después si el efecto protector de DEX en viabilidad celular de CHO se limitaba a DEX o si podría extenderse a otros compuestos glucocorticoides, tales como hidrocortisona (HYC) y prednisolona (PRD). DEX, HYC y PRD (Sigma-Aldrich, San Luís, MO) se añadieron dos días después de inoculación a concentraciones finales de 0, 0,1, 1 y 10 μM para cada uno de estos tres compuestos. VCD pico, VCD final y viabilidad final de células de cultivo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

	Concentración de Tratamiento (μM)	VCD Pico (× 10^6 células/ml)	VCD Final (× 10^6 células/ml)	Viabilidad (%)
Dexametasona (DEX)	0,1	7,99	7,64	72,3
	1	9,02	8,40	75,8
	10	7,49	7,38	82,3
Hidrocortisona (HYC)	0,1	10,06	7,86	60,1
	1	9,51	8,15	65,1
	10	8,44	7,80	75,5
Prednisolona (PRD)	0,1	8,99	8,26	69,4
	1	9,25	8,79	76,8
	10	8,05	8,27	77,5
Control	N/A	8,69	7,56	56,6

Similar a DEX, HYC (viabilidad final del 60,1-75,5 %) y PRD (viabilidad final del 69,4-75,5 %) mostraron también efectos protectores celulares dependientes de dosis. La viabilidad en el día 10 fue del 56,6 % para el control comparado con las viabilidades del día 10 con concentraciones de 0,1 y de 10 μM para DEX del 72,3 % y del 82,3 %; para HYC del 60,1 % y del 75,5 %; y PRD del 69,4 % y del 77,5 %, respectivamente. Así todos los tres compuestos glucocorticoides mejoraron viabilidad de cultivo con efectos máximos a 10 μM para todos los tres compuestos glucocorticoides.

La acción de supresión de la muerte de dexametasona implica a GILZ y al receptor de glucocorticoides.

Con el fin de determinar si la acción mejora de la viabilidad a partir de la adición de DEX estaba mediada por GILZ y el receptor de glucocorticoides (GR), se añadió el antagonista de GR mifepristona (RU-486) al medio de cultivo celular antes del tratamiento con DEX. Para condiciones con y sin RU-486, el aumento en el porcentaje de la viabilidad celular final inducida por DEX se muestra en la Fig. 14. La capacidad de DEX para mejorar la viabilidad celular se redujo sustancialmente en presencia de RU-486 1 μM. El aumento del porcentaje de la viabilidad celular inducida por DEX 0,1 y 1 μM disminuyó del 30,5 % y el 32,6 % (sin RU-486) al 4,7 % y el 5,7 % (con RU-486 1 μM), respectivamente. En el tiempo medio, el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (Fig. 14B) muestra que en presencia de RU-486 1 μM, el efecto de regulación al alza de DEX sobre la expresión de GILZ se atenuó significativamente. El cambio de plegamiento inducido por DEX 0,1 y 1 μM disminuyó de 9,0 ± 1,9 y 11,3 ± 3,0 (sin RU-486) a 1,8 ± 0,9 y 2,3 ± 1,0 (con RU-486 1 μM), respectivamente. El análisis de inmunotransferencia (Fig. 14C) confirmo adicionalmente que la sobreexpresión de la proteína GILZ disminuyó significativamente en presencia de RU-486 1 μM. Estos resultados indican que el mecanismo a través del que DEX disminuye la viabilidad implica a GILZ y es dependiente de GR, ya que RU-486 compite con DEX por el dominio de unión a ligando del GR.

Aplicación de dexametasona en 10 l de cultivo de biorreactor semicontinuo

Los cultivos semicontinuos en biorreactores de 10 l se llevaron a cabo determinando si el efecto de DEX visto en matraces de agitación subiría para biorreactores. La meta en conjunto de DEX fue suprimir la muerte celular, prolongar la longevidad del cultivo y por consiguiente incrementar la producción de glucoproteína para un proceso en

biorreactores. En este estudio, se operaron tres biorreactores usando las mismas condiciones descritas anteriormente; con 1 µM de DEX añadido a dos biorreactores en el día 2 o en el día 7 respectivamente. Diferentes de los funcionamientos de matraces de agitación, los funcionamientos de los biorreactores se prolongan hasta 14 días, la temperatura del cultivo se cambió a una temperatura más baja durante la fase exponencial del cultivo y se usó un medio nutriente patentado en vez de suministrar solo glucosa y glutamina.

Biorreactores con DEX añadidos bien en el día 2 o bien en el día 7 alcanzaron densidades celulares máximas de aproximadamente 8,3 x 10^6 células/ml en el día 8, comparadas con 7,8 x 10^6 células/ml sin DEX (Fig. 15A). La adición de DEX disminuyó la velocidad de muerte celular en los biorreactores. La viabilidad celular fue viabilidad del 94 % para todas las condiciones en el día 6 (Fig. 15B). Por el día 14, la viabilidad en porcentaje disminuyó al 29 % sin DEX, comparada con el 55 % y el 39 % con DEX añadida en los días 2 o 7, respectivamente. Las VCD finales en el día 14 con DEX añadida en los días 2 o 7 fueron 4,1 y 3,5 x 10^6 células/ml respectivamente, comparadas con 2,8 x 10^6 células/ml sin adición de DEX. Las valoraciones de proteínas normalizadas fueron aproximadamente 5,5 en el día 7 antes de la VCD máxima (Fig. 15C). A partir de entonces, la producción de proteínas durante las fases estacionaria y de muerte de los cultivos fue más alta en los biorreactores con adición de DEX. El día 14 valoraciones normalizadas de recogida fueron 12,5 en ambos biorreactores con DEX, comparados con 10,5 g/l sin adición de DEX, un incremento del 20 %.

Conclusión

Nuestros esfuerzos en la optimización del medio nos han conducido a descubrir inesperadamente que los glucocorticoides pueden atenuar significativamente la disminución de la viabilidad celular en cultivos semicontinuos de células CHO. En el estudio del mecanismo de este fenómeno, la implicación de la regulación al alza del gen antiapoptótico GILZ se identificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de inmunotransferencia. Estudiando efectos de análogos y antagonistas de DEX sobre el crecimiento de células CHO, se determinó el papel de GILZ y del receptor de glucocorticoides en la mediación de la actividad de DEX. Los experimentos en biorreactor semicontinuo demostraron que el análogo de glucocorticoide era un compuesto químico eficaz, accesible y rentable para atenuar la disminución de la viabilidad en cultivos celulares.

Ejemplo 4

En este estudio, se estudiaron los efectos de dexametasona (DEX) sobre el crecimiento de células CHO, la sialilación de proteínas y la agregación en otra línea celular CHO con la secreción de una glucoproteína diferente (CTLA4Ig).

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originariamente a partir de células parentales DG44 y se cultivó en un medio de crecimiento definido químicamente registrado.

Experimentos en matraz con agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con agitación (VWR international) con volúmenes iniciales de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6 × 10^5 células/ml. Los cultivos se situaron sobre una plataforma de agitación (VWR international) a 150 rpm y se mantuvieron a 37°C y al 6 % de CO_2 durante diez días. Se tomaron muestras de los cultivos diariamente y se ajustó el pH según se necesitó usando carbonato de sodio 1 M y se alimento con glucosa y glutamina cada dos días, con el fin de mantenerlos a niveles adecuados. Se añadió el glucocorticoide dexametasona (DEX) a concentraciones finales 0,001 – 10 µM el día 2. Se midieron fuera de línea la densidad y la viabilidad celular usando un contador de células automatizado (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania). El pH del cultivo y las concentraciones de glucosa y glutamina se midieron fuera de línea usando un analizador Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, EEUU). Los sobrenadantes procedentes de las recolecciones del cultivo se recogieron para el análisis del contenido de ácido siálico y niveles de especies de alto peso molecular.

Ensayo del contenido de ácido siálico y HMW

El ensayo del contenido de ácido siálico y HMW se realizó tal como se ha descrito en los ejemplos previos.

Resultados

Efecto de la dexametasona sobre el crecimiento de células CHO

El glucocorticoide dexametasona (DEX) se añadió a los cultivos del matraz de agitación a concentraciones finales entre 0,001 y 10 µM dos días después de la inoculación para evaluar los efectos de la DEX sobre la viabilidad de células CHO y el potencial para prolongar el periodo de cultivo celular. El perfil de densidad celular viable (VCD) en el estudio de dosis-respuesta (Fig. 16A) muestra un aumento en la inhibición del crecimiento celular que tiene lugar

después del tratamiento con DEX, aunque la dependencia de la concentración no es obvia en el intervalo del estudio. El pico de VCD alcanzó 13,9 × 10^6 células/ml en el cultivo control no tratado, mientras que el pico de VCD osciló entre 10,6 × 10^6 y 12,7 × 10^6 células/ml en los cultivos tratados con DEX 0,001 a 10 µM. La viabilidad celular para los cultivos no tratados disminuyó rápidamente después del día 6 (Fig. 16B) y el porcentaje de viabilidad el día 10 fue de solo el 64,5 %. Por contra, las viabilidades celulares finales con DEX 0,001 µM y 10 µM fueron del 75,5 % y el 82,3 %, respectivamente.

La dexametasona (DEX) aumenta la sialilación y reduce el nivel de especies de alto peso molecular (HMW) de glucoproteína CTLA4Ig

Además del crecimiento celular, también se evaluaron los efectos de la DEX sobre el contenido de ácido siálico y los niveles de especies de alto peso molecular. Comparando los cultivos no tratados, el porcentaje de aumento del contenido de ácido siálico (Fig. 17A) y el porcentaje de reducción de especies de alto peso molecular (Fig. 17B) inducidos por varias concentraciones de DEX se muestran en la Fig. 17. Es obvio que la DEX es capaz de aumentar la sialilación y reducir las especies de alto peso molecular de glucoproteína, mostrando una mejora en la calidad de las proteínas, incluso a concentraciones 0,001 µM. La dependencia de la concentración de DEX sobre el contenido de ácido siálico y las especies de alto peso molecular no es tan obvio cuando la concentración de DEX es superior a 0,01 µM.

Estos resultados demostraron que las acciones de DEX sobre la mejora de la viabilidad celular, la mejora de la sialilación de glucoproteínas y la reducción de la agregación no están limitadas a una línea celular única ni a un medio de formulación único.

Ejemplo 5

En este estudio, se demuestra la factibilidad de utilizar DEX en el medio de cultivo celular para la producción de glucoproteína recombinante a gran escala en biorreactores a escala de 500 l y 5.000 l.

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó a partir de células parentales y se cultivó en un medio de crecimiento patentado.

Operación en biorreactor

Los experimentos en biorreactor se realizaron en biorreactores de 7 l, 500 l y 5.000 l con volúmenes de trabajo iniciales de aproximadamente 3 l, 300 l y 3.000 l, respectivamente. Todos los biorreactores iniciaron el funcionamiento a 37 ºC y se llevaron a temperaturas inferiores cuando las células entraron en la fase de producción, con el fin de prolongar el periodo de cultivo celular. El pH y el oxígeno disuelto se mantuvieron a 7,05 y al 50 % de saturación del aire. Las velocidades de agitación para las escalas de 7 l, 500 l y 5.000 son 180, 75 y 60 rpm respectivamente. Todos los experimentos en biorreactor se llevaron a cabo en modo semicontinuo con alimentación diaria de medio exento de proteína, con el fin de mantener la glucosa y otros nutrientes a determinados niveles. Se incluyó la mexametasona en el medio nutriente en todas las escalas de producción con el propósito de aumentar la viabilidad celular y la sialilación de la proteína. Las muestras se tomaron durante el proceso de cultivo celular y se analizaron la densidad celular, la viabilidad celular, sustratos y metabolitos.

El ensayo de valoración, contenido de ácido siálico y de HMW se realizó tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Resultados

Las figuras 18A y 18B presentan el rendimiento del biorreactor con respecto al crecimiento y a la viabilidad celular. Se vigiló el crecimiento celular a escala creciente de 7 l a 5.000 l para tener máximos similares de densidades celulares viables de entre 12 y 13 x 10^6 células/ml con barras de error que representan la desviación típica de las ejecuciones a una escala particular que se sobrepone en cada punto temporal. Las densidades celulares alcanzaron el máximo el día 7 a la escala de 5.000 l y el día 8 para las escalas de 7 l y 500 l. El día 14 las viabilidades medias de los cultivos fueron el 88 %, el 84 % y el 91 % a escalas del biorreactor de 7 l, 500 l y 5.000 l, respectivamente. Las figuras 18C y 18D presentan los perfiles de productividad y de ácido siálico a partir de escalas del biorreactor de 7 l, 500 l y 5.000 l. Las valoraciones del día 14 (indicadas como valores normalizados) fueron 13,2, 11,6 y 13,6 a escalas de 7, 500 y 5.000 l, respectivamente. Los niveles máximos de ácido siálico (indicados como valores normalizados) fueron 16,0, 18,0 y 19,0 a escalas aumentadas. El ácido siálico cayó en aproximadamente 2,6 unidades hacia el final del proceso en todas las escalas.

Conclusión

En conjunto, con la dexametasona incluida en el medio nutriente, el procedimiento se realizó bien en todas las

escalas, lo que indica la factibilidad del uso de dexametasona como aditivo del medio para la producción a escala industrial.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Jing Ying

<120> PROCESOS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

<130> 11400 WO PCT

<150> 61/278.343
<151> 2009/10/06

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1152
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<400> 1

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca          48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1               5                   10                  15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct          96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
            20                  25                  30

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag         144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
        35                  40                  45

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg         192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
    50                  55                  60

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg         240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65                  70                  75                  80

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc         288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
                85                  90                  95

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac         336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
            100                 105                 110

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac         384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
        115                 120                 125

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa         432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
    130                 135                 140

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac         480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
```

```
145                 150                 155                 160

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggt gga tcg tca gtc        528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
                165                 170                 175

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc        576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
            180                 185                 190

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag        624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
        195                 200                 205

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag        672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    210                 215                 220

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc        720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225                 230                 235                 240

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag        768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                245                 250                 255

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc        816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
            260                 265                 270

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc        864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
        275                 280                 285

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg        912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    290                 295                 300

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat        960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305                 310                 315                 320

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc       1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                325                 330                 335

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg       1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
            340                 345                 350

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg       1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
        355                 360                 365

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga       1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375                 380
```

<210> 2
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1               5                  10                  15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
            20                  25                  30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
        35                  40                  45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65                  70                  75                  80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
                85                  90                  95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
            100                 105                 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
        115                 120                 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145                 150                 155                 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
                165                 170                 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
            180                 185                 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
        195                 200                 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    210                 215                 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225                 230                 235                 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                245                 250                 255
```

```
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
            260                 265                 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
        275                 280                 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    290                 295                 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305                 310                 315                 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                325                 330                 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
            340                 345                 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
        355                 360                 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375                 380
```

<210> 3
<211> 1152
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<400> 3

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca          48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1               5                   10                  15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct          96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
            20                  25                  30

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag         144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
        35                  40                  45

tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg         192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
    50                  55                  60

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg         240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65                  70                  75                  80

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc         288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
```

```
                85                  90                  95

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac      336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
            100                 105                 110

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac      384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
        115                 120                 125

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa      432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
    130                 135                 140

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac      480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145                 150                 155                 160

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc      528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
                165                 170                 175

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
            180                 185                 190

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
        195                 200                 205

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    210                 215                 220

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225                 230                 235                 240

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                245                 250                 255

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
            260                 265                 270

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
        275                 280                 285

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    290                 295                 300

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305                 310                 315                 320

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc     1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                325                 330                 335

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg     1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
            340                 345                 350
```

```
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg       1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
        355                 360                 365

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga       1152
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375                 380
```

<210> 4
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1               5                   10                  15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
            20                  25                  30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
        35                  40                  45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65                  70                  75                  80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
                85                  90                  95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
            100                 105                 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
        115                 120                 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145                 150                 155                 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
                165                 170                 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
            180                 185                 190
```

```
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
        195                 200                 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
    210                 215                 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225                 230                 235                 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                245                 250                 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
            260                 265                 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
        275                 280                 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
    290                 295                 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305                 310                 315                 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
                325                 330                 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
            340                 345                 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
        355                 360                 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375                 380
```

<210> 5
<211> 636
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

<400> 5

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca          48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1               5                   10                  15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct          96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro

            20                  25                  30

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag         144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
        35                  40                  45

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg         192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
    50                  55                  60

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg         240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65                  70                  75                  80

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc         288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
                85                  90                  95

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac         336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
            100                 105                 110

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac         384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
        115                 120                 125

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa         432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
    130                 135                 140

ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt         480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
145                 150                 155                 160

tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc         528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
                165                 170                 175

aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa         576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
            180                 185                 190

atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt         624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

att ccc atc aat                                                        636
Ile Pro Ile Asn
    210
```

<210> 6
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1               5                  10                  15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
            20                  25                  30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
        35                  40                  45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
    50                  55                  60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65                  70                  75                  80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
                85                  90                  95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
            100                 105                 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
        115                 120                 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
    130                 135                 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
145                 150                 155                 160

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
            180                 185                 190

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
        195                 200                 205

Ile Pro Ile Asn
    210
```

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de cultivo celular para la producción de una molécula de CTLA4 soluble, que comprende: a) cultivar células CHO que producen una molécula de CTLA4 soluble en cultivo celular en condiciones que permiten la producción de proteínas; y b) añadir niveles no tóxicos de glucocorticoide.

2. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 1, en el que aumenta la sialilación de las moléculas de CTLA4 soluble en comparación con la sialilación en un cultivo sin la adición de glucocorticoide.

3. El proceso de cultivo de la reivindicación 1, en el que se suprime la muerte celular en comparación con la apoptosis celular en un cultivo sin adición de glucocorticoide.

4. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 1, en el que aumenta la viabilidad celular en comparación con la viabilidad celular en un cultivo sin adición de glucocorticoide.

5. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 1, en el que aumenta el título de CTLA4 en comparación con el título de CTLA4 en un cultivo sin adición de glucocorticoide.

6. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 1, en el que se reduce la agregación de la molécula de CTLA4 en comparación con la agregación de la molécula de CTLA4 en un cultivo sin adición de glucocorticoide.

7. El proceso de cultivo celular de las reivindicaciones 1-6, en el que el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en dexametasona, betametasona, acetato de hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

8. El proceso de cultivo celular de las reivindicaciones 1-6, en el que se mantiene el nivel de glucocorticoide en el cultivo celular a una concentración de 1 nM a 1 mM.

9. El proceso de cultivo celular de las reivindicaciones 1-6, en el que se añade el glucocorticoide al medio basal, al medio de alimentación o en forma de bolo en cualquier momento durante el proceso de cultivo.

10. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en el que se añade el glucocorticoide en cualquier momento después de la inoculación que sea anterior al comienzo de la fase de muerte inicial.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se añade el glucocorticoide en cualquier momento después de la inoculación que sea durante la fase de crecimiento inicial.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se añade el glucocorticoide al final o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial.

13. El proceso de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la molécula de CTLA4 soluble es una molécula de CTLA4 mutante soluble que comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y que termina en ácido aspártico en la posición 124, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3, unida a un resto de inmunoglobulina que comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3, en donde el glucocorticoide es dexametanosa y la dexametasona se sustenta o se mantiene en el cultivo celular a una concentración de 0,1 µM a 10 µM, y en donde el volumen de cultivo celular es de al menos 500 litros.

14. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 13, en el que la molécula de CTLA4 soluble es una molécula de CTLA4 mutante soluble que comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y que termina en ácido aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3, en donde se alimenta a las células con un medio de cultivo que comprende el glucocorticoide dexametasona, y en donde el volumen del cultivo celular es de al menos 500 litros.

15. El proceso de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la molécula de CTLA4 soluble comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y que termina en ácido aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3, en donde el glucocorticoide es dexametasona y la dexametasona se sustenta o se mantiene en el cultivo celular a una concentración de 1 nM a 0,1 µM y en donde el volumen de cultivo celular es de al menos 500 litros.

16. El proceso de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la molécula de CTLA4 soluble comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y que termina en ácido aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3, en donde se alimenta a las células con

un medio de cultivo que comprende el glucocorticoide dexametasona, en donde el volumen del cultivo celular es de al menos 500 litros.

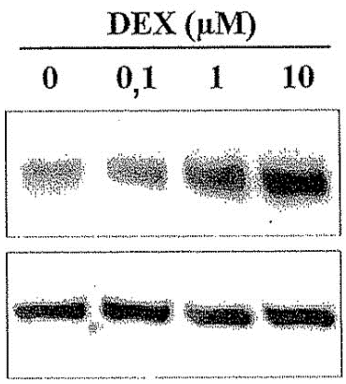
17. El proceso de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, 15 y 16 en el que la molécula de CTLA4 soluble comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y que termina en lisina en la posición +357, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

18. El proceso de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, 13 y 14, en el que la molécula de CTLA4 mutante soluble comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o con alanina en la posición -1 y que termina en lisina en la posición +357, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3.

19. El proceso de cultivo celular de la reivindicación 9, en el que el glucocorticoide es dexametasona y la dexametasona se añade al medio de cultivo.

Fig.1

A


DEX (µM)
0
0,1
1
10
β1,4-galactosiltransferasa
β- actina

B

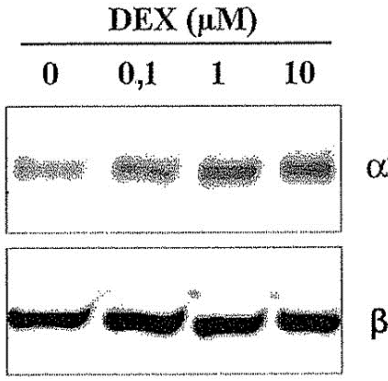

DEX (µM)
0
0,1
1
10
α2,3-sialiltransferasa
β-actina

Fig. 2

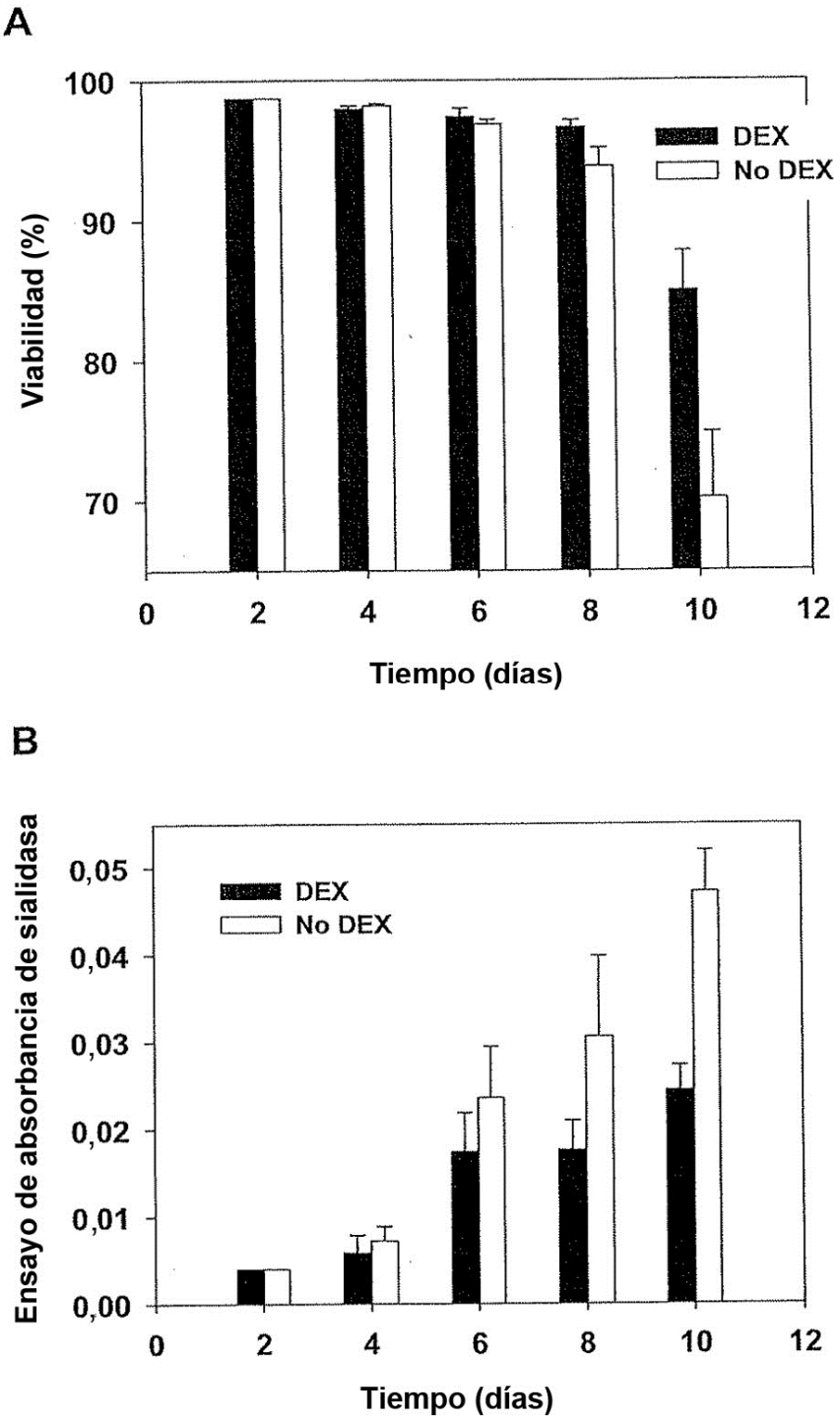
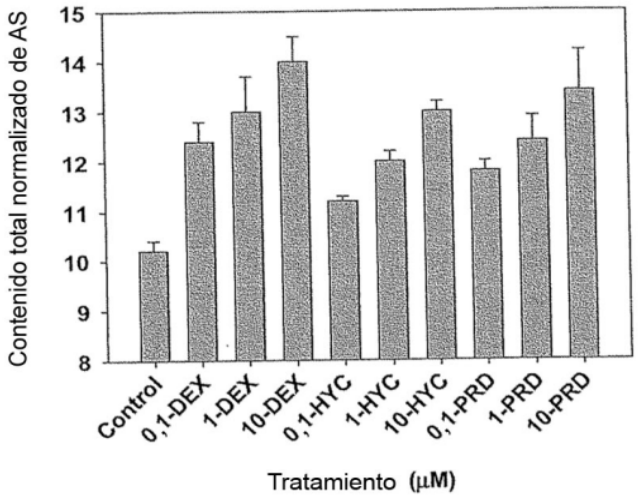

A
100
90
80
70
Viabilidad (%)
DEX
No DEX
0
2
4
6
8
10
12
Tiempo (días)
B
Ensayo de absorbancia de sialidasa
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
DEX
No DEX
0
2
4
6
8
10
12
Tiempo (días)

Fig.3

A


Contenido total normalizado de AS
15
14
13
12
11
10
9
8
Control
0,1-DEX
1-DEX
10-DEX
0,1-HYC
1-HYC
10-HYC
0,1-PRD
1-PRD
10-PRD
Tratamiento (μM)

B

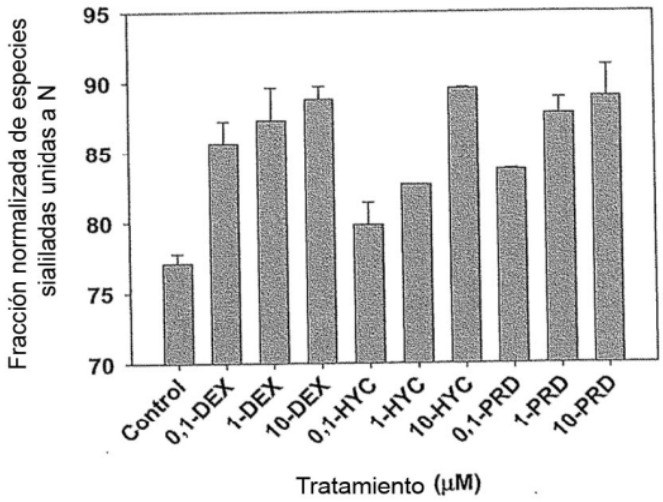
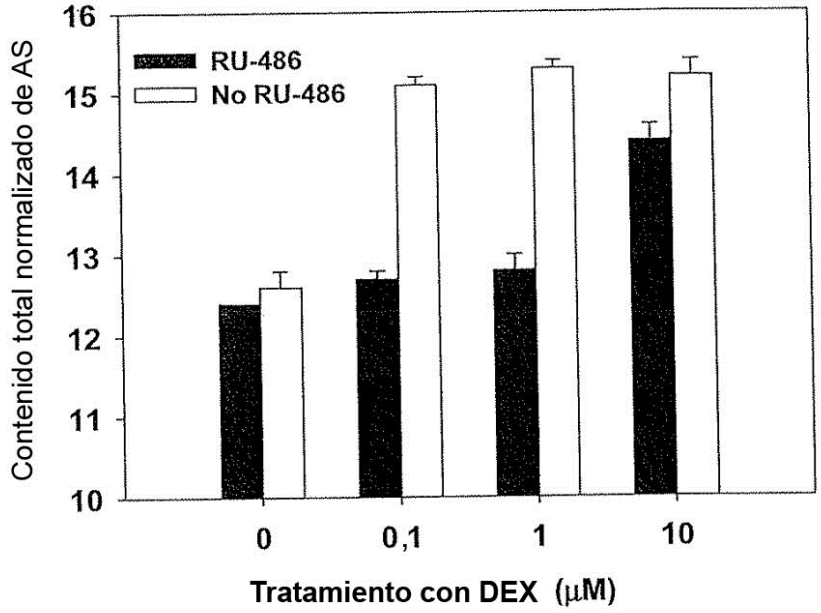

Fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N
95
90
85
80
75
70
Control
0,1-DEX
1-DEX
10-DEX
0,1-HYC
1-HYC
10-HYC
0,1-PRD
1-PRD
10-PRD
Tratamiento (μM)

Fig.4

A


16
15
14
13
12
11
10
RU-486
No RU-486
Contenido total normalizado de AS
0
0,1
1
10
Tratamiento con DEX (μM)

B

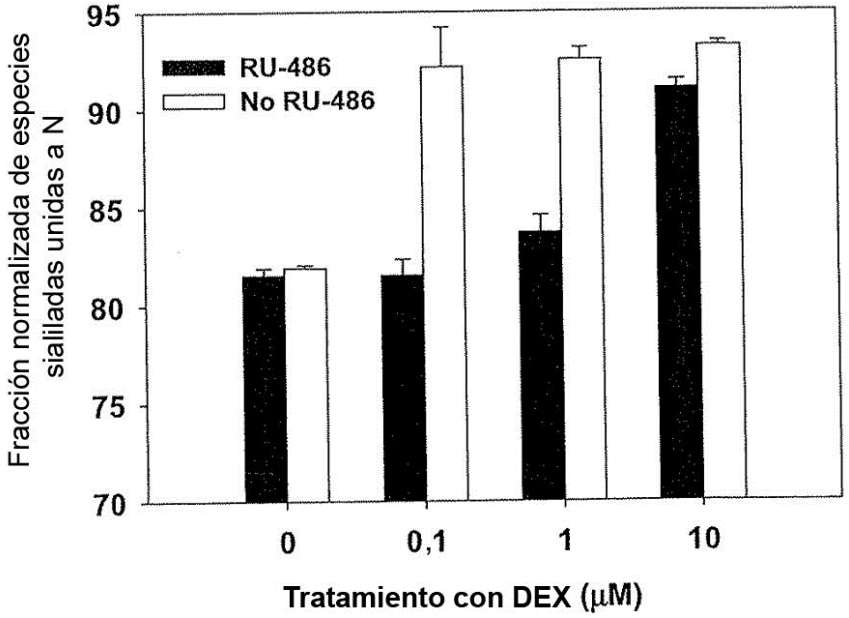

95
90
85
80
75
70
RU-486
No RU-486
Fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N
0
0,1
1
10
Tratamiento con DEX (μM)

Fig.5

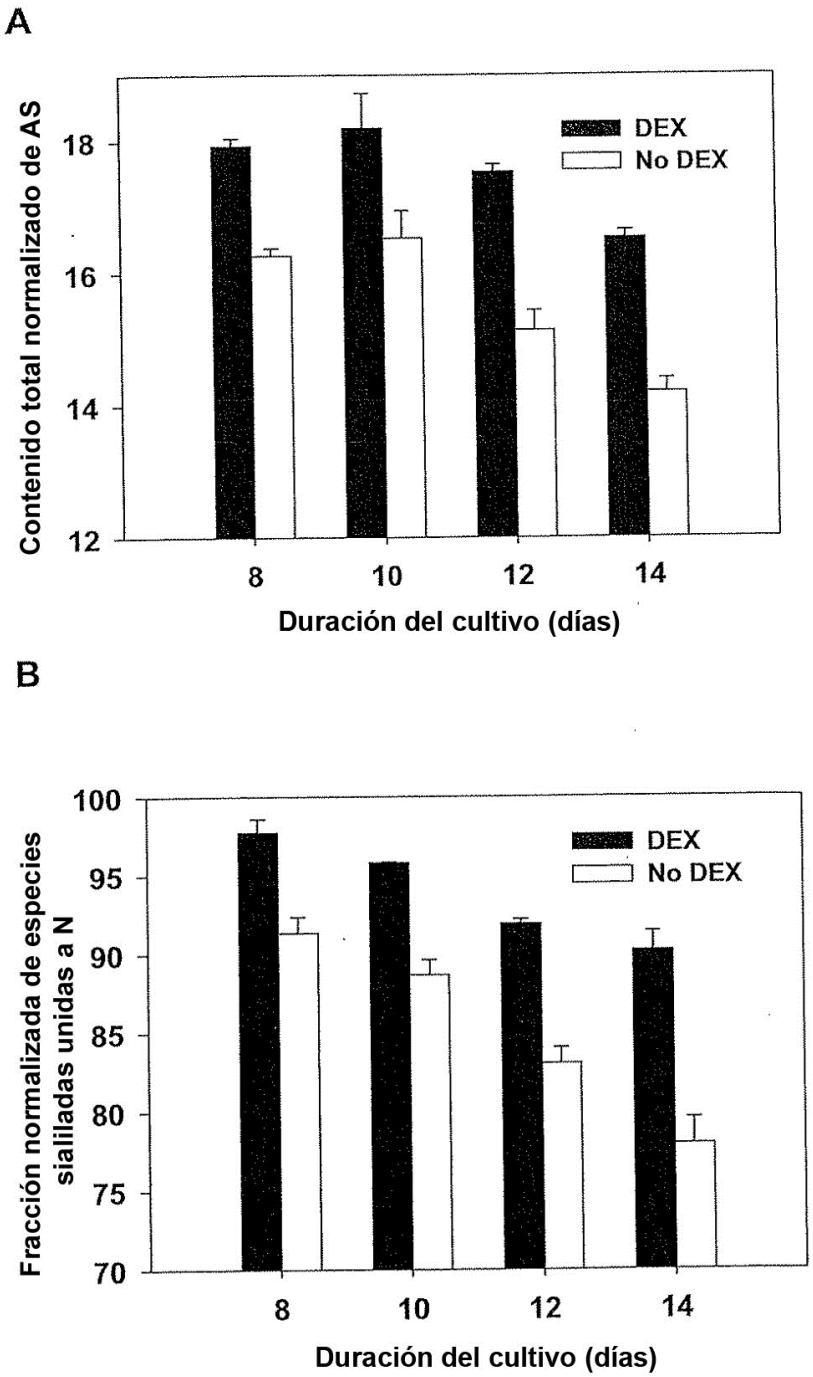

A
Contenido total normalizado de AS
18
16
14
12
DEX
No DEX
8
10
12
14
Duración del cultivo (días)
B
Fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N
100
95
90
85
80
75
70
DEX
No DEX
8
10
12
14
Duración del cultivo (días)

Fig.6

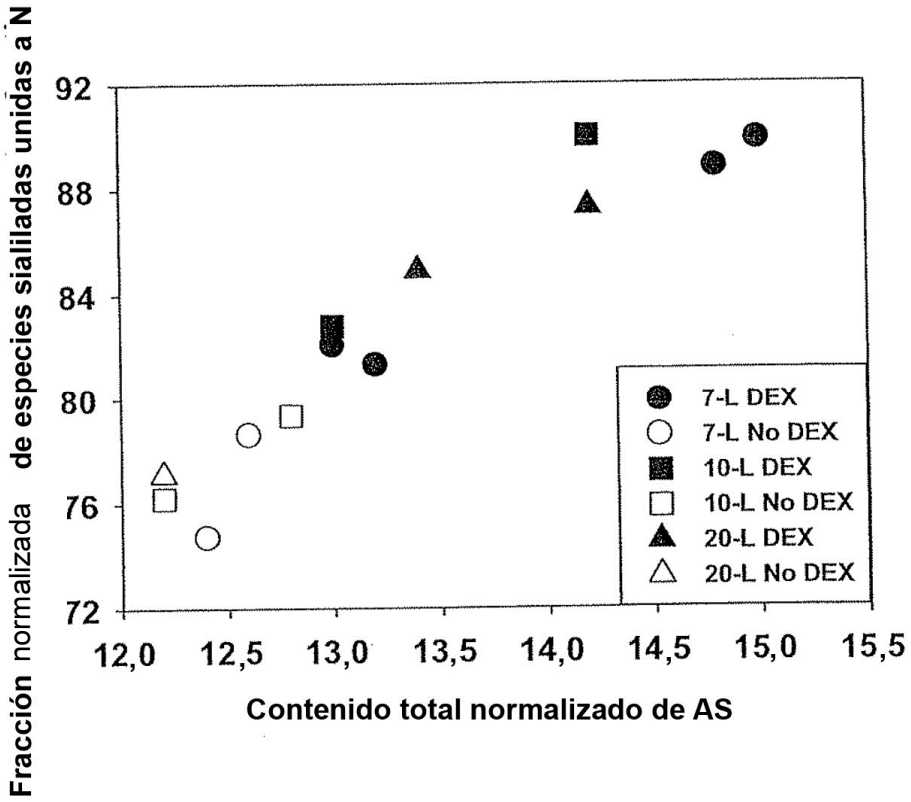

Fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N
92
88
84
80
76
72
12,0
12,5
13,0
13,5
14,0
14,5
15,0
15,5
Contenido total normalizado de AS
7-L DEX
7-L No DEX
10-L DEX
10-L No DEX
20-L DEX
20-L No DEX

Fig. 7

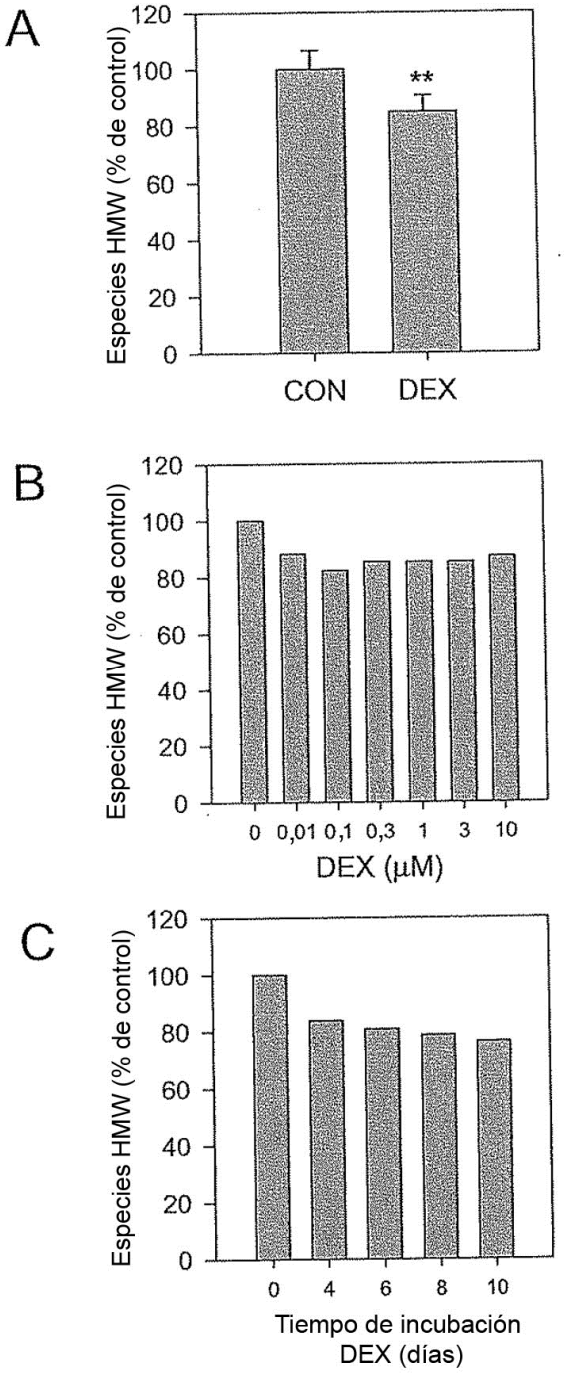

A
Especies HMW (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
**
CON
DEX
B
Especies HMW (% de control)
0 0,01 0,1 0,3 1 3 10
DEX (µM)
C
Especies HMW (% de control)
0 4 6 8 10
Tiempo de incubación
DEX (días)

Fig. 8

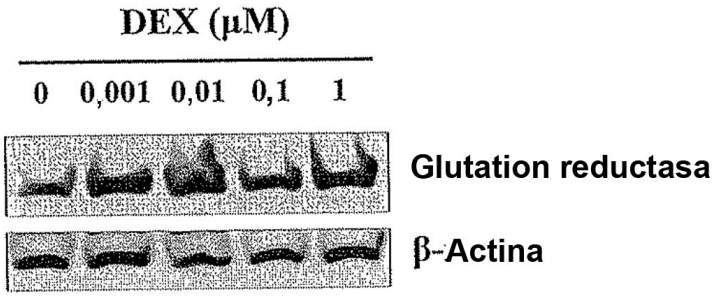


Fig. 9

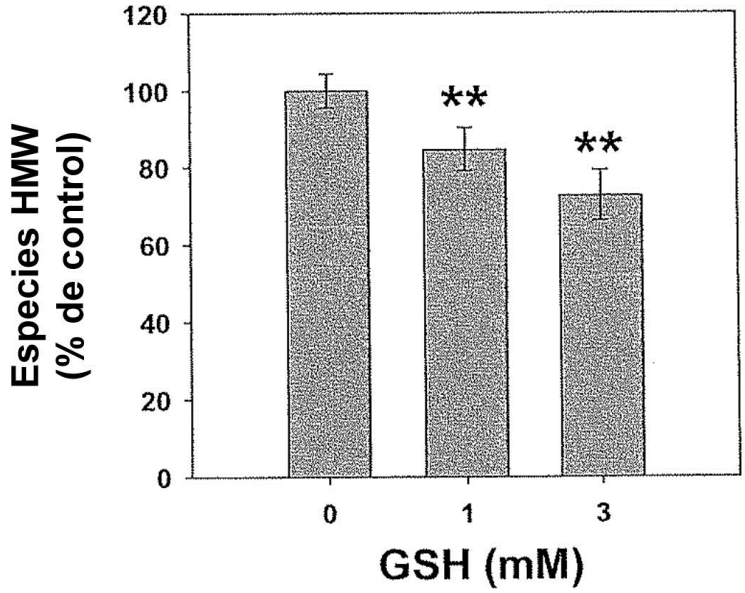


Fig. 10

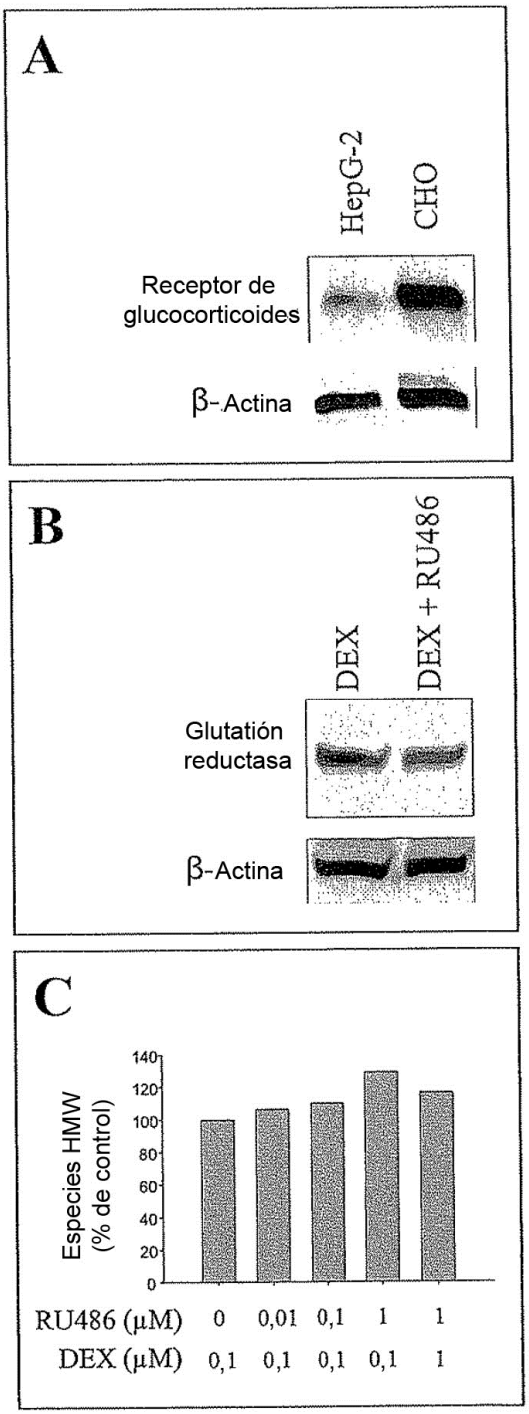

A
HepG-2
CHO
Receptor de glucocorticoides
β-Actina
B
DEX
DEX + RU486
Glutatión reductasa
β-Actina
C
Especies HMW (% de control)
140
120
100
80
60
40
20
0
RU486 (μM) 0 0,01 0,1 1 1
DEX (μM) 0,1 0,1 0,1 0,1 1

Fig. 11

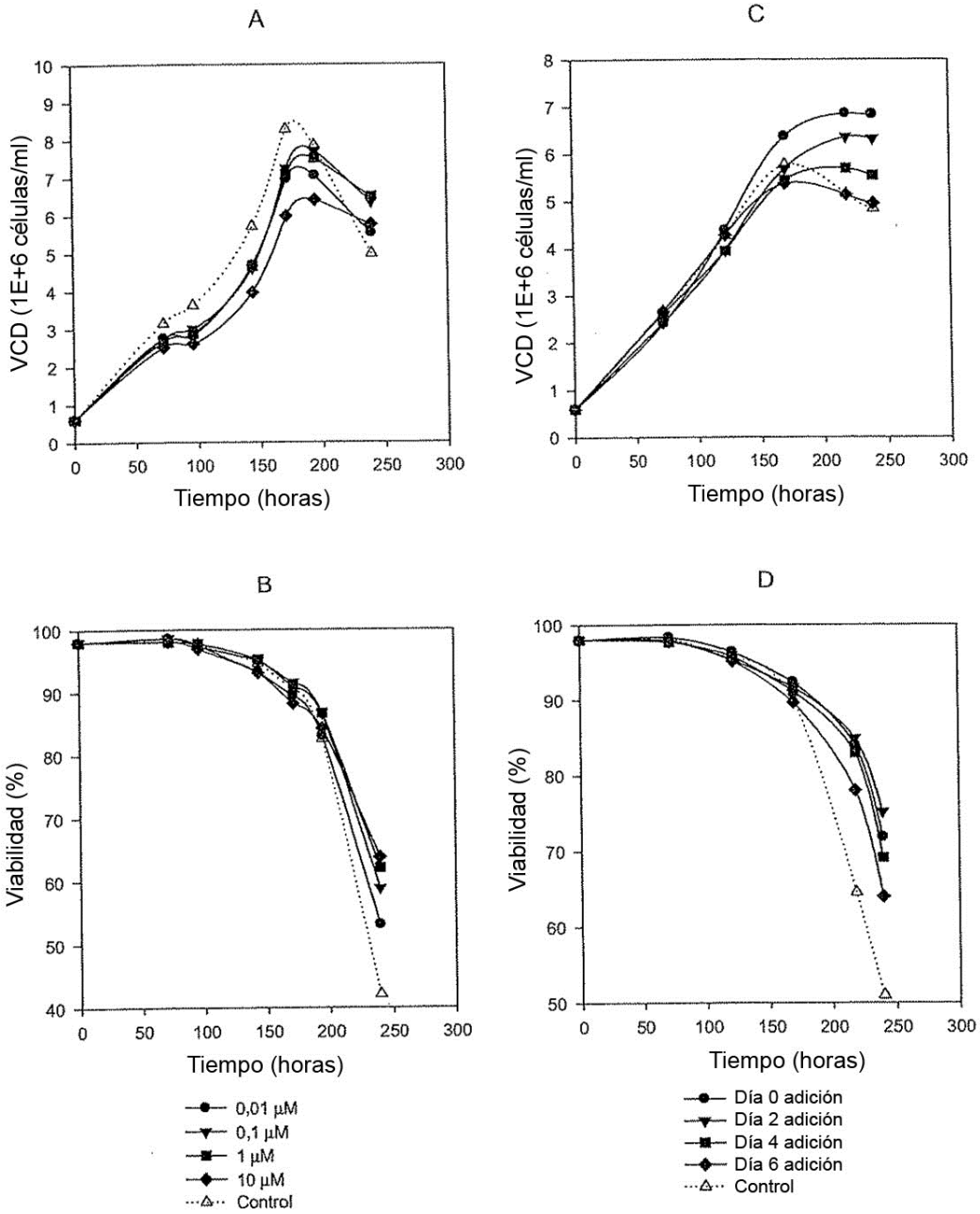
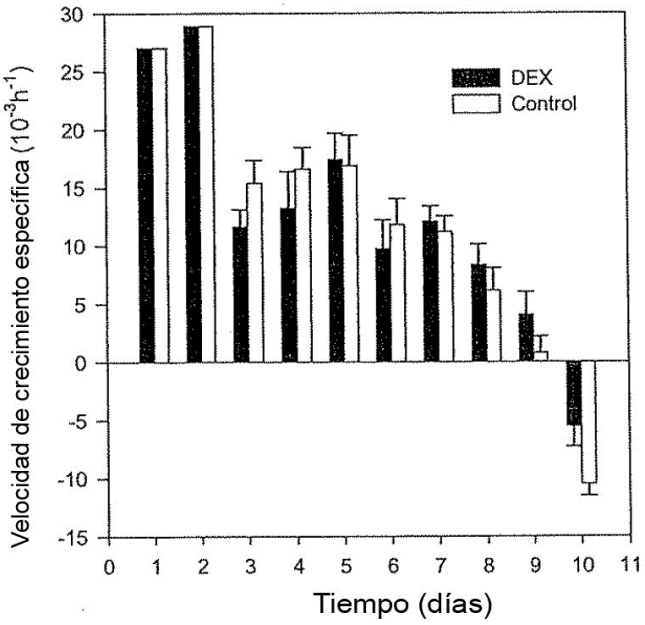

A
VCD (1E+6 células/ml)
Tiempo (horas)
C
VCD (1E+6 células/ml)
Tiempo (horas)
B
Viabilidad (%)
Tiempo (horas)
0,01 µM
0,1 µM
1 µM
10 µM
Control
D
Viabilidad (%)
Tiempo (horas)
Día 0 adición
Día 2 adición
Día 4 adición
Día 6 adición
Control

Fig. 12

A


Velocidad de crecimiento específica ($10^{-3}h^{-1}$)
DEX
Control
Tiempo (días)

B

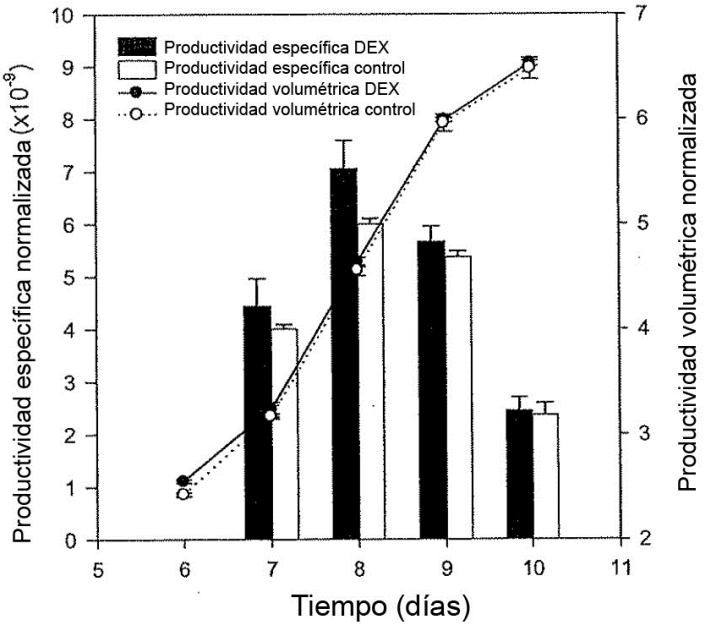
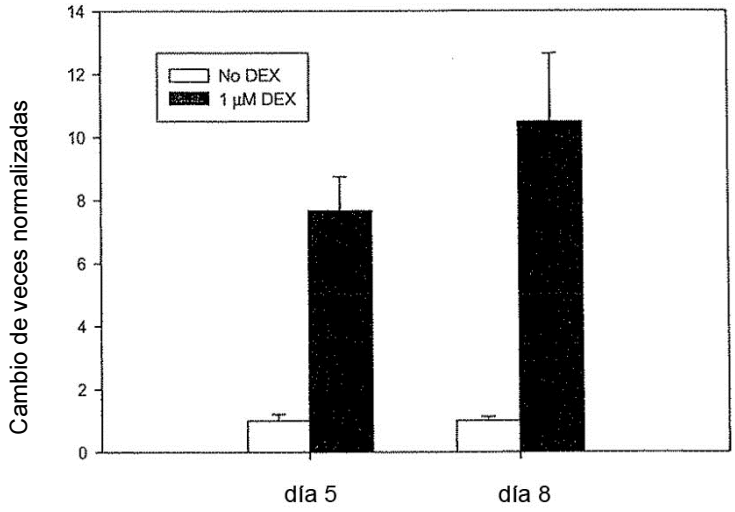

Productividad específica normalizada (x10^{-9})
Productividad específica DEX
Productividad específica control
Productividad volumétrica DEX
Productividad volumétrica control
Productividad volumétrica normalizada
Tiempo (días)

Fig. 13

A


14
12
10
8
6
4
2
0
Cambio de veces normalizadas
No DEX
1 µM DEX
día 5
día 8

B

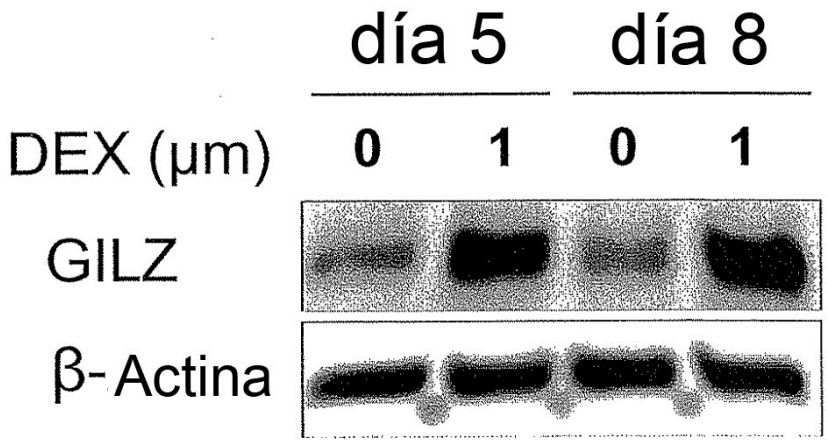
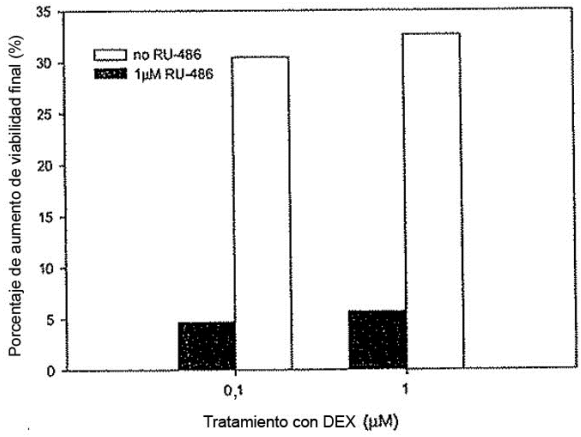
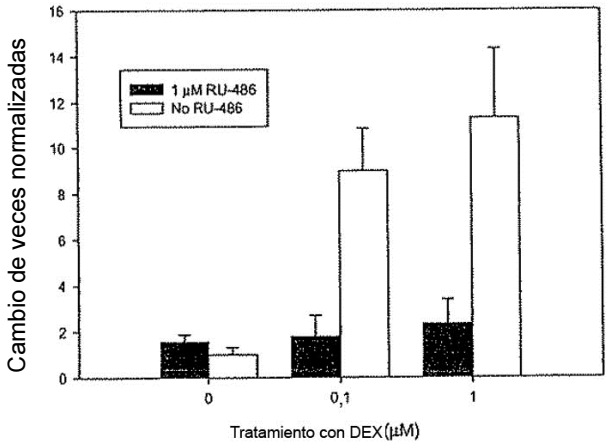

día 5
día 8
DEX (µm)
0
1
0
1
GILZ
β-Actina

Fig. 14


Porcentaje de aumento de viabilidad final (%)
no RU-486
1μM RU-486
0
5
10
15
20
25
30
35
0,1
1
Tratamiento con DEX (μM)


Cambio de veces normalizadas
1 μM RU-486
No RU-486
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
0,1
1
Tratamiento con DEX (μM)

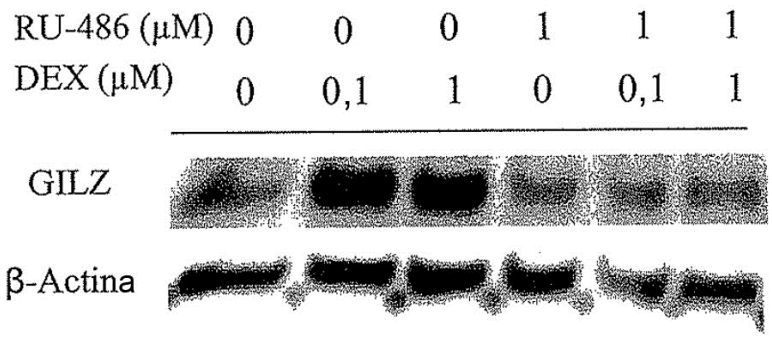
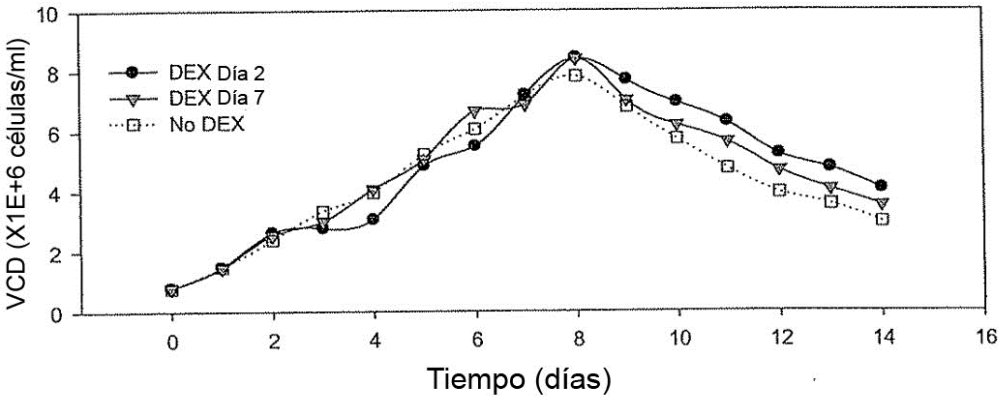
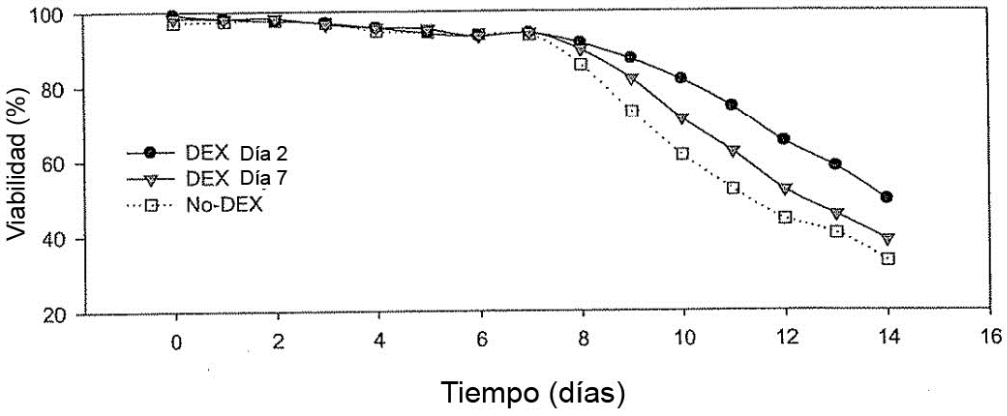

RU-486 (μM) 0 0 0 1 1 1
DEX (μM) 0 0,1 1 0 0,1 1
GILZ
β-Actina

Fig. 15

A


VCD (X1E+6 células/ml)
DEX Día 2
DEX Día 7
No DEX
Tiempo (días)

B


Viabilidad (%)
DEX Día 2
DEX Día 7
No-DEX
Tiempo (días)

C

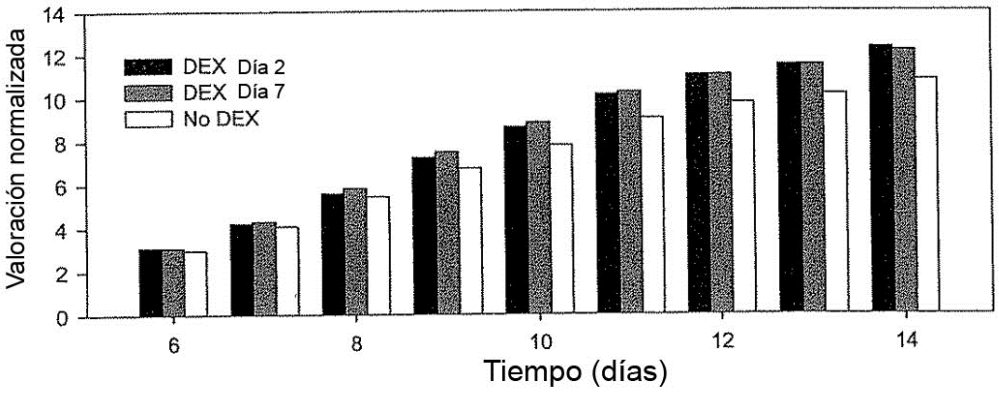
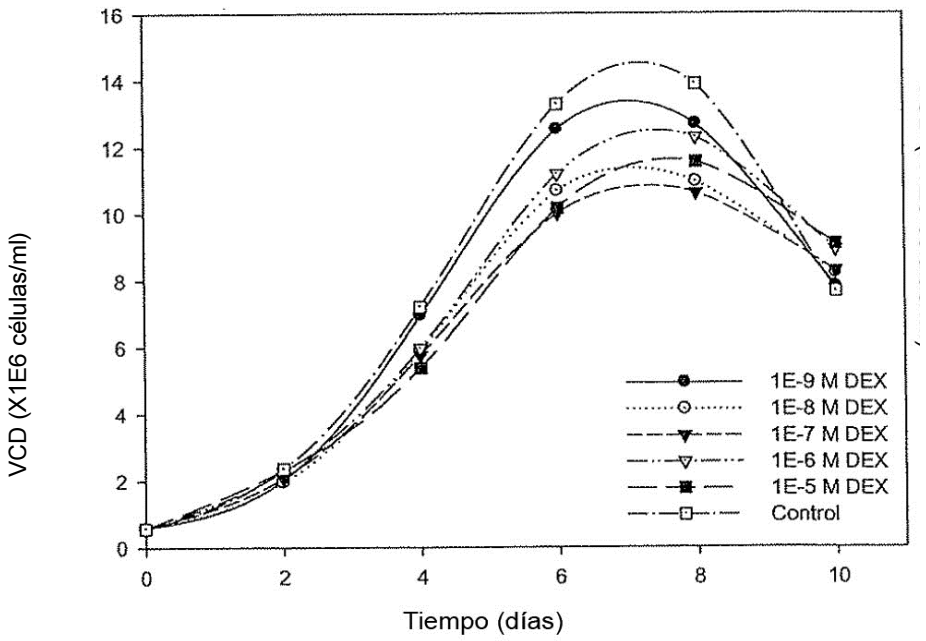

Valoración normalizada
DEX Día 2
DEX Día 7
No DEX
Tiempo (días)

Fig. 16

A


VCD (X1E6 células/ml)
Tiempo (días)
1E-9 M DEX
1E-8 M DEX
1E-7 M DEX
1E-6 M DEX
1E-5 M DEX
Control

B

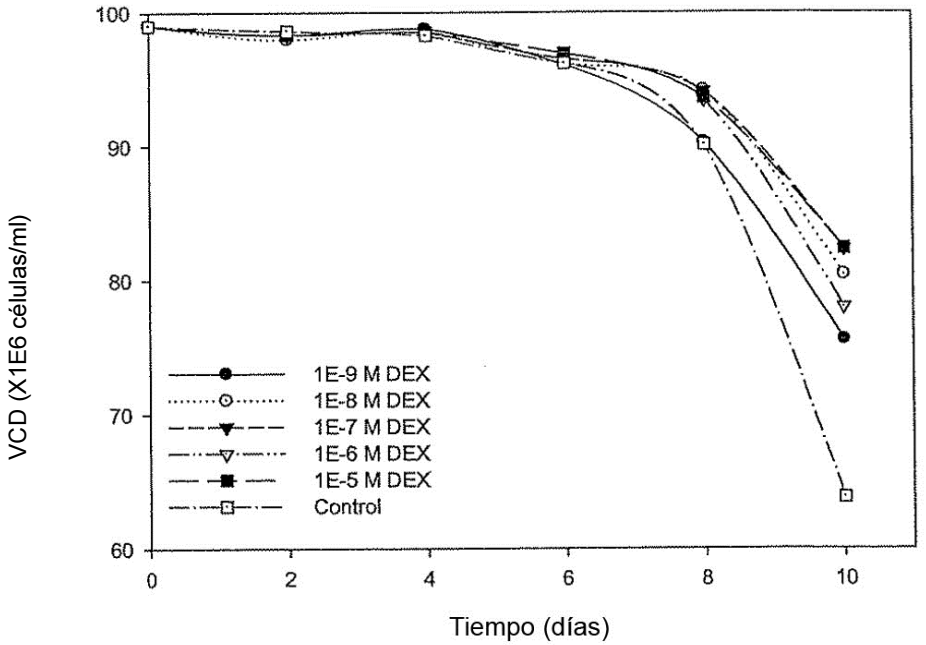
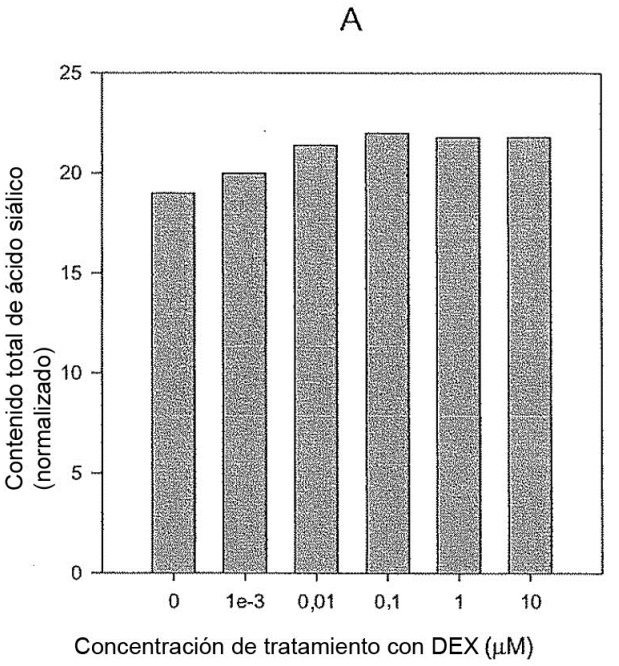

VCD (X1E6 células/ml)
Tiempo (días)
1E-9 M DEX
1E-8 M DEX
1E-7 M DEX
1E-6 M DEX
1E-5 M DEX
Control

Fig. 17


A
Contenido total de ácido siálico (normalizado)
25
20
15
10
5
0
0
1e-3
0,01
0,1
1
10
Concentración de tratamiento con DEX (μM)

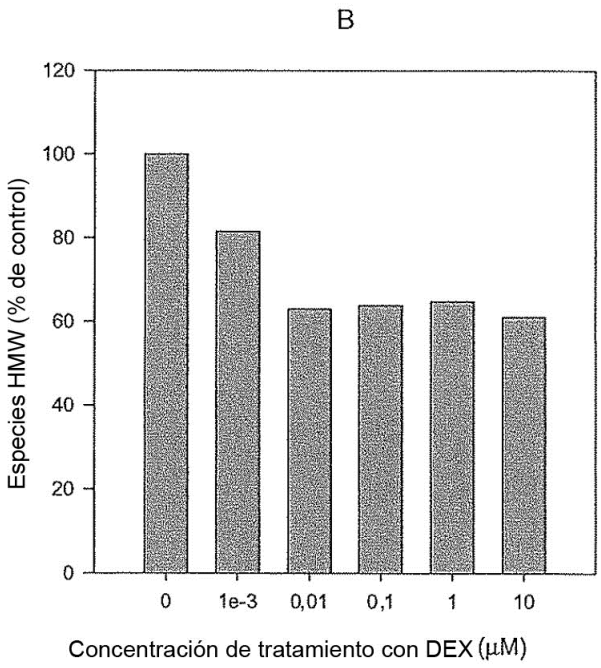
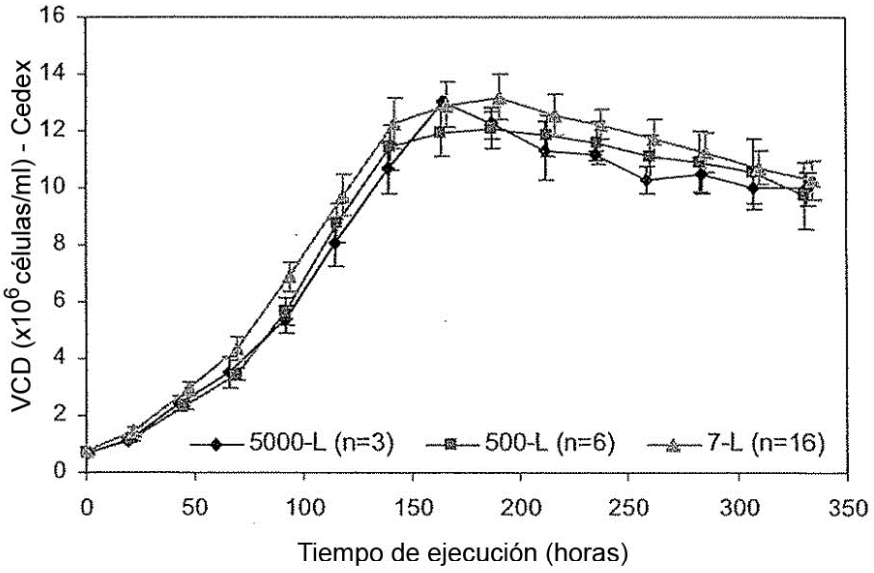
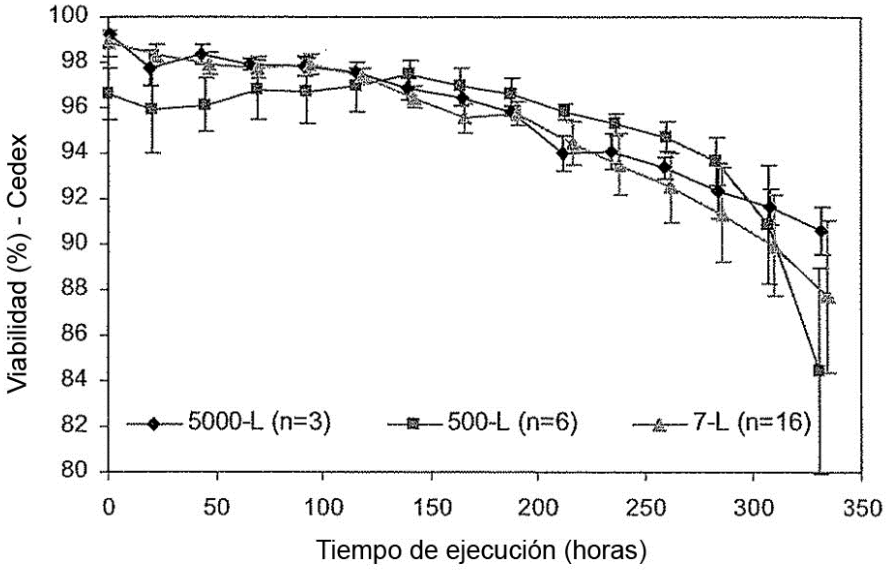

B
Especies HMW (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
0
1e-3
0,01
0,1
1
10
Concentración de tratamiento con DEX (μM)

Fig. 18 A/B

A

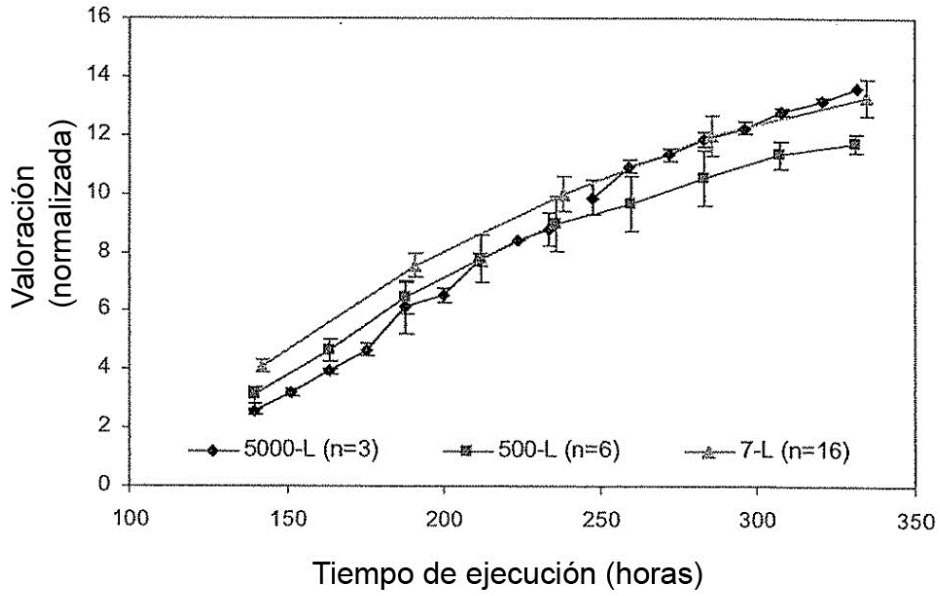

VCD (x10^6 células/ml) - Cedex
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo de ejecución (horas)
5000-L (n=3)
500-L (n=6)
7-L (n=16)

B


Viabilidad (%) - Cedex
100
98
96
94
92
90
88
86
84
82
80
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo de ejecución (horas)
5000-L (n=3)
500-L (n=6)
7-L (n=16)

C

Fig. 18 C/D


Valoración (normalizada)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
100
150
200
250
300
350
5000-L (n=3)
500-L (n=6)
7-L (n=16)
Tiempo de ejecución (horas)

D

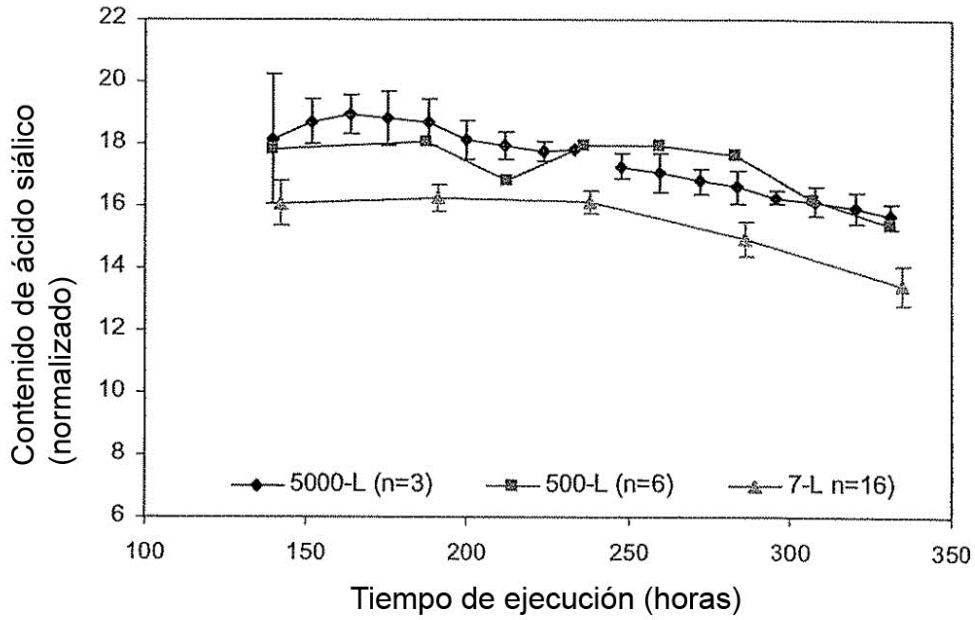

Contenido de ácido siálico (normalizado)
22
20
18
16
14
12
10
8
6
100
150
200
250
300
350
5000-L (n=3)
500-L (n=6)
7-L n=16)
Tiempo de ejecución (horas)

FIG. 19

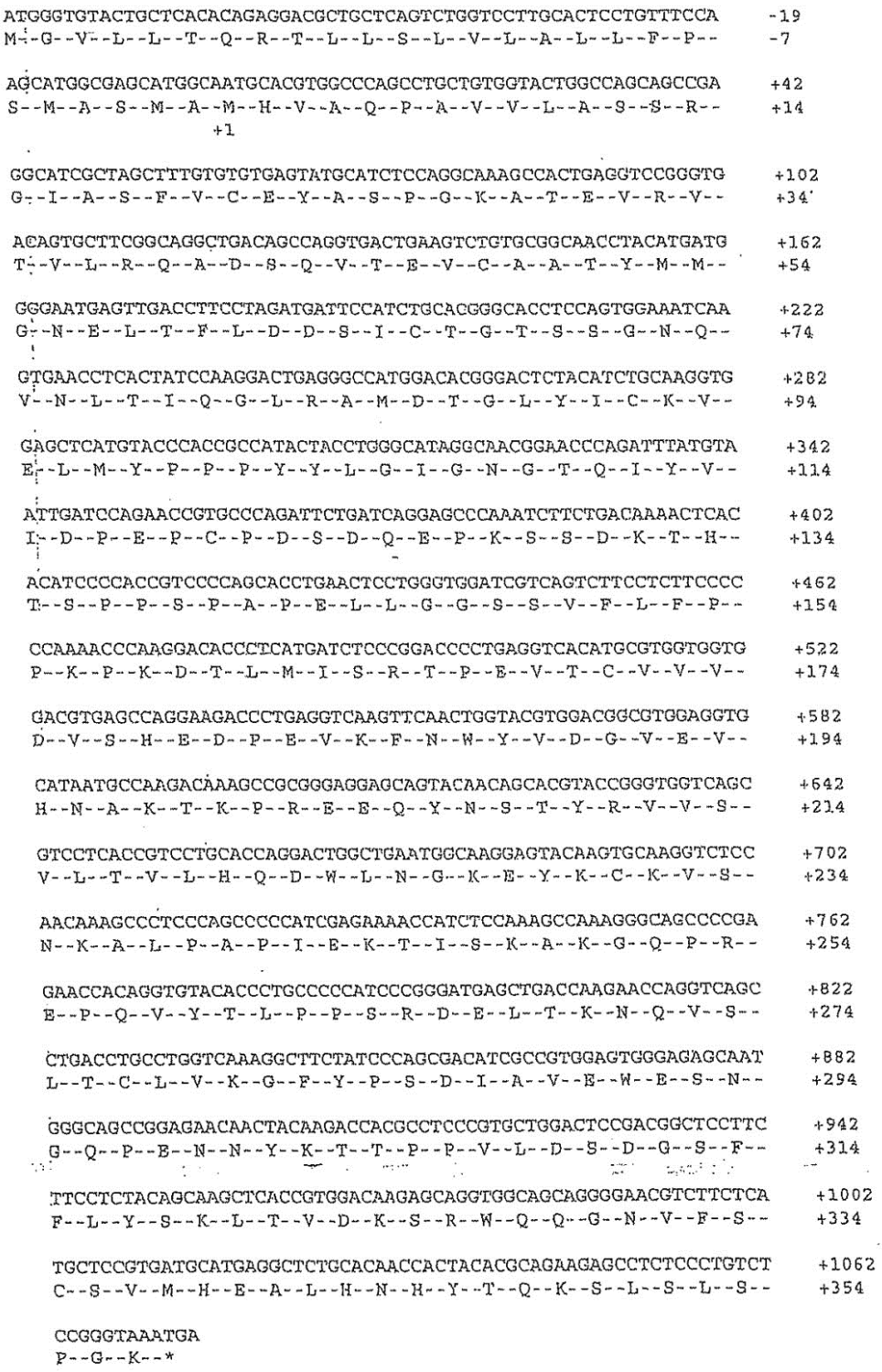

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174
GACGTGAGCCAGGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354
CCGGGTAAATGA
P--G--K--*

FIG. 20

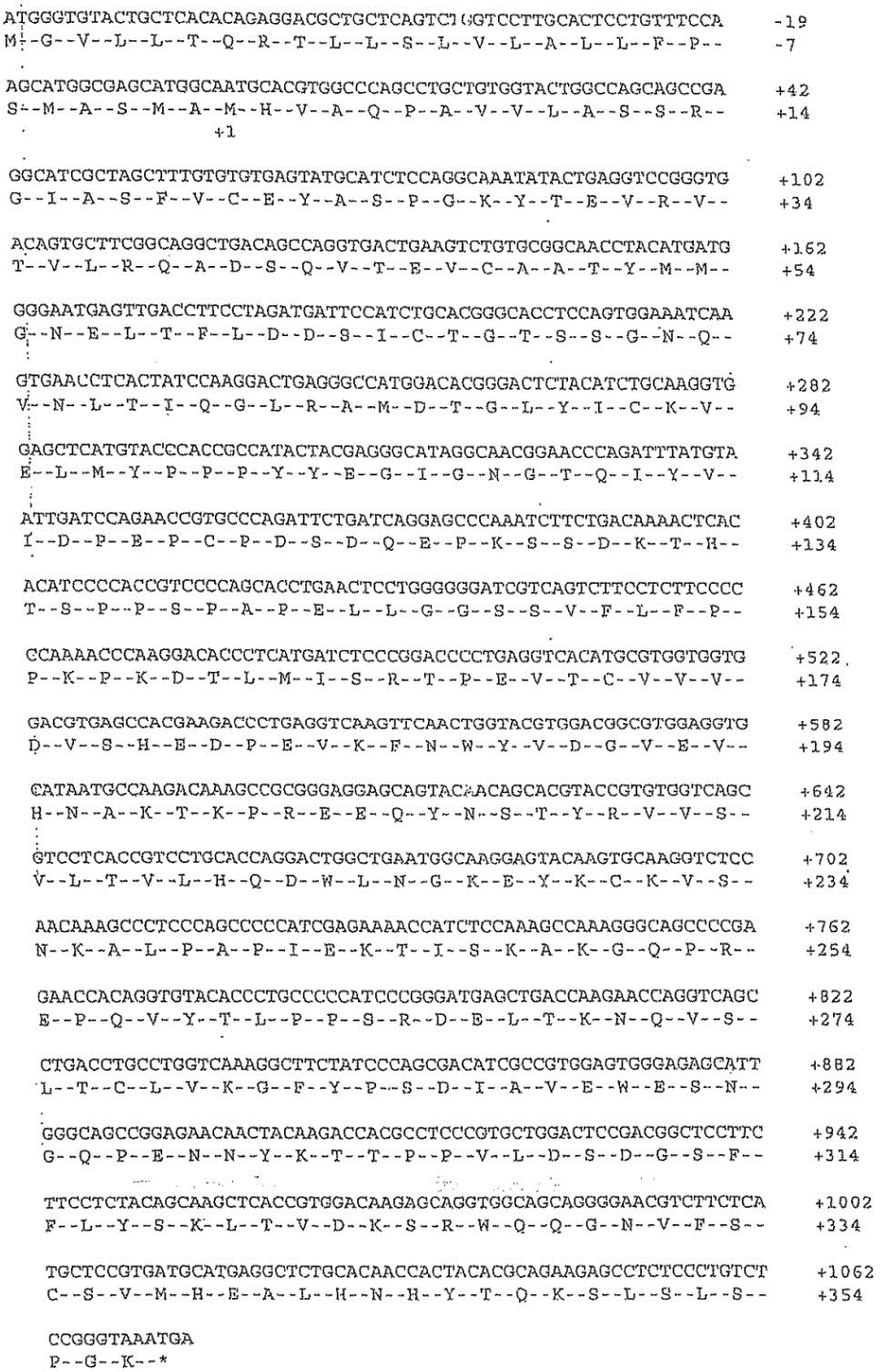
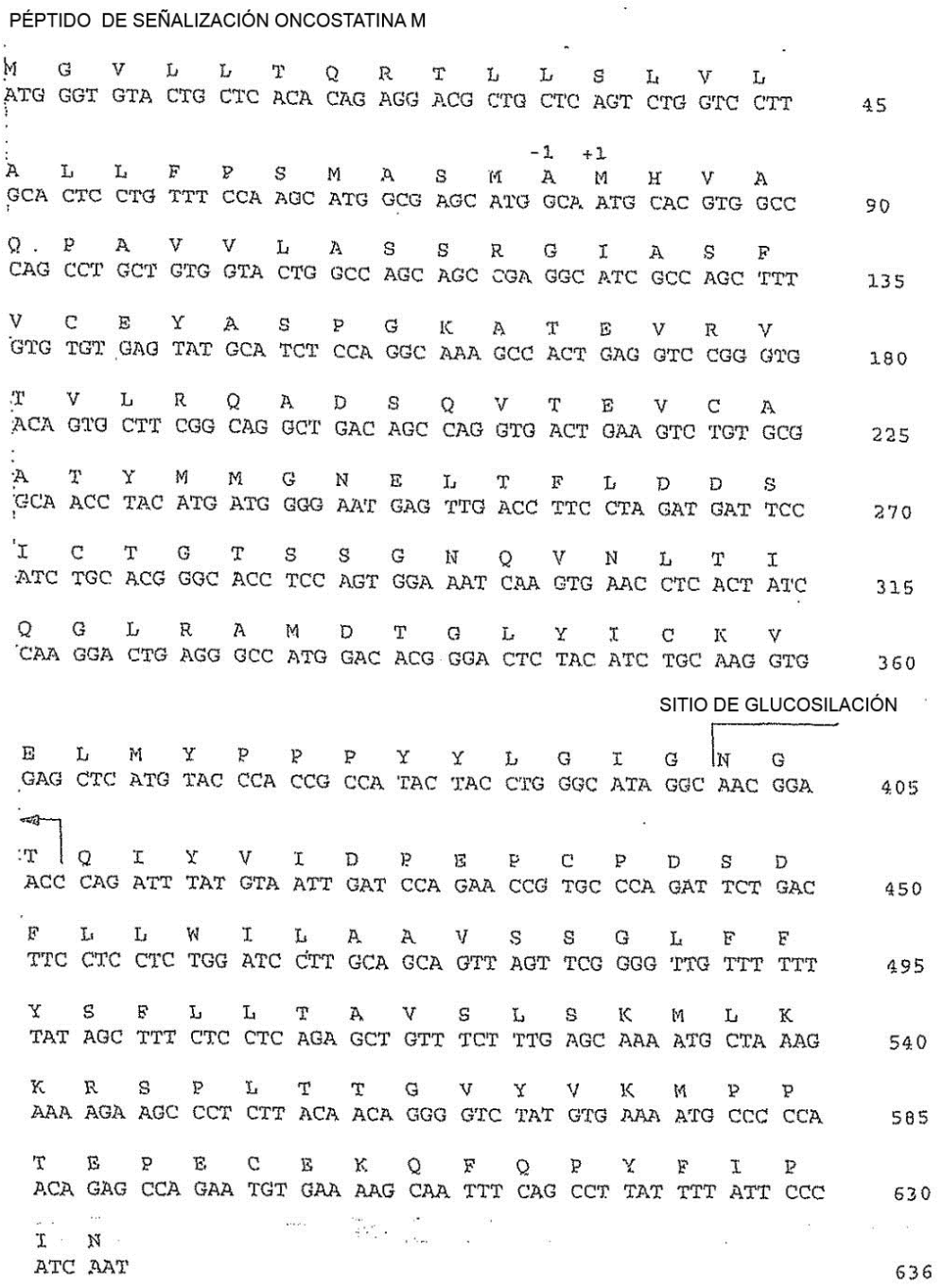

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V-- +34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCATT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354
CCGGGTAAATGA
P--G--K--*

FIG. 21


PÉPTIDO DE SEÑALIZACIÓN ONCOSTATINA M
M G V L L T Q R T L L S L V L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT 45
-1 +1
A L L F P S M A S M A M H V A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC 90
Q P A V V L A S S R G I A S F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT 135
V C E Y A S P G K A T E V R V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG 180
T V L R Q A D S Q V T E V C A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG 225
A T Y M M G N E L T F L D D S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC 270
I C T G T S S G N Q V N L T I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC 315
Q G L R A M D T G L Y I C K V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG 360
SITIO DE GLUCOSILACIÓN
E L M Y P P P Y Y L G I G N G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA 405
T Q I Y V I D P E P C P D S D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC 450
F L L W I L A A V S S G L F F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT 495
Y S F L L T A V S L S K M L K
TAT AGC TTT CTC CTC AGA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG 540
K R S P L T T G V Y V K M P P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA 585
T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630
I N
ATC AAT 636