

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 185**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/07</b>	(2010.01)
<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/13</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/02</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2008 PCT/JP2008/058046**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08136398**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08752120 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2154244**

54 Título: **Método de cultivo celular que utiliza un medio enriquecido con aminoácidos**

30 Prioridad:

**26.04.2007 JP 2007117426**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.07.2017**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1 UKIMA 5-CHOME, KITA-KU  
TOKYO 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**KATAYAMA, SATOSHI;  
KISHISHITA, SHOUHEI;  
KODAIRA, KUNHIKO;  
SADAMITSU, MAKOTO;  
TAKAGI, YOSHINORI y  
MATSUDA, HIROKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 624 185 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método de cultivo celular que utiliza un medio enriquecido con aminoácidos

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de cultivo de células CHO mediante cultivo semi-continuo, que comprende la adición de un medio semi-continuo que comprende serina, cisteína y tirosina, donde el medio de cultivo semi-continuo se suministra secuencial o continuamente a la solución del cultivo en múltiples lotes, caracterizado por que la concentración de serina en la solución de cultivo se mantiene a 2 mM o más alta, y la concentración de tirosina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta, donde la concentración de serina o tirosina en la solución de cultivo se mantienen durante un periodo desde el cuarto día al décimo día de cultivo y donde la concentración de cisteína en la solución del cultivo puede ser de 0,4 mM o más alta durante una parte o el periodo completo de cultivo desde el tercer día del cultivo, donde dicho método se utiliza en un proceso que comprende el cultivo de una célula capaz de producir una proteína deseada para obtener la proteína deseada.

La presente divulgación se refiere en general a métodos de cultivo de células capaces de producir proteínas deseadas para obtener las proteínas, y a los medios para su uso en los métodos. En particular, la presente divulgación se refiere a métodos de cultivo de células capaces de producir proteínas deseadas para obtener las proteínas deseadas y a métodos para producir proteínas mediante un método de cultivo libre de suero, que se caracteriza por que la serina en un cultivo líquido se mantiene a una concentración alta. La presente divulgación se refiere adicionalmente al medio de cultivo semi-continuo para su uso en los métodos.

**Técnica antecedente**

Cuando una proteína natural producida por una célula animal se obtiene por el cultivo de la célula animal, o cuando una proteína deseada o similar se va a preparar cultivando una célula animal transformada con un gen que codifica la proteína deseada, el medio de cultivo se tiene que suplementar en un intervalo del 5-20 % con un extracto derivado de un mamífero, específicamente un suero tal como el suero bovino fetal, para el crecimiento de la célula animal, además de los nutrientes básicos tales como sales, azúcares, aminoácidos, y vitaminas. Los sueros derivados de los mamíferos, sin embargo, conllevan como desventaja que dichos sueros derivados de mamífero se contabilizan como un 75-95 % del coste de los medios, y que no se puede alcanzar un crecimiento estable debido a la calidad entre los lotes. Además, como los sueros derivados de mamífero no se pueden esterilizar en autoclave o similares, existe la posibilidad de que se contamine con micoplasmas o virus, aunque muchos de ellos son inocuos, pueden dar lugar a factores adicionales desconocidos desde el punto de vista de producción estable.

En los últimos años, ha existido una gran preocupación por si los componentes derivados de mamíferos pueden asociarse con la enfermedad de las vacas locas, o la Encefalopatía Espongiforme bovina (BSE), encefalopatía espongiforme transmisible (TSE), y, además con la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (CJD), y desde el punto de vista de la seguridad, se desea un cultivo celular animal libre de componentes de mamífero. Además, un suero contiene al menos 500 tipos de proteínas, y esto complica el aislamiento/purificación de la proteína deseada como un bio-producto de un medio de cultivo celular.

Para resolver los problemas anteriores, se han desarrollado métodos de cultivo libre de suero para cultivar células animales en ausencia de suero. En el desarrollo de los métodos de cultivo libre de suero, se proporcionan medios líquidos libres de suero que contienen, como sustitutos de los efectos del suero, proteínas plasmáticas tales como fetuina, transferrina, y albúmina, hormonas tales como hormonas esteroides e insulina, factores de crecimiento, y factores nutritivos tales como aminoácidos y vitaminas.

La fetuina, insulina, transferrina, y factores de crecimiento para su uso en los métodos de cultivo libre de suero son proteínas purificadas derivadas de los sueros o proteínas recombinantes derivadas de organismos recombinantes. El uso de los mismos tiene las siguientes desventajas: aunque en pequeñas cantidades, contienen productos biológicos; se necesita el uso de un producto caro; el cultivo varía entre los lotes; y similares.

En los últimos años, se han desarrollado métodos de cultivo libre de suero que utilizan hidrolizados de proteínas. Dichos métodos de cultivo tienen desventajas similares a las expuestas anteriormente: contienen un componente derivado de un organismo; los costes son altos; la producción varía entre los diferentes lotes; y similares. Por lo tanto es difícil decir que dichos métodos de cultivo libre de suero son más adecuados para la producción de proteínas útiles.

En vista de lo anterior, existe una demanda de un método de cultivo que utilice un medio definido químicamente que contenga los menos componentes biológicos posibles, sea barato, produzca una pequeña variación entre los lotes, y pueda dar como resultado un refuerzo en la producción proteica. Recientemente, se analizó el comportamiento de la glucosa y los aminoácidos en una solución de cultivo en cultivo semi-continuo, y este análisis reveló que el uso de una cantidad de glutamato aumentada en el cultivo semi-continuo contribuía al aumento de la cantidad de antitrombina producida (Documento no patente 1). Sin embargo, este hallazgo solo se basa en la glutamina

5 sintetasa expresada por células CHO específicas, y no se demuestra que se haya llevado a cabo con el uso de células CHO en general. Además, no se han investigado los efectos individuales de otros aminoácidos. Además, las cantidades de proteína que se producen siguen siendo insuficientes. Por lo tanto existe una fuerte demanda del desarrollo de un proceso de cultivo utilizando un medio definido químicamente que sea capaz de ofrecer una producción proteica mayor.

10 Se ha descrito que el cultivo de células de mamífero se puede cultivar en un medio libre de suero (Documento Patente 1). Se han descrito métodos y medios para la producción de proteínas a gran escala, particularmente para la producción de  $\alpha$ -ABeta en un medio de cultivo celular de mamífero (Documento Patente 2). Además se han desvelado suplementos para los medios de cultivo celular libre de proteína (Documento Patente 3), composiciones solubles para cultivar células eucariotas (Documento Patente 9) y medios no equilibrados para cultivo de hibridoma (Documento no patente 2). Se ha descrito para las células CHO, un medio esencialmente libre de proteínas, lípidos y carbohidratos aislados de fuentes animales (Documento Patente 5); al igual, se ha desvelado un medio libre de productos animales para la fermentación de Neisseria (Documento Patente 7). Se han descrito para bacterias acidolácticas procedimientos para la producción de péptidos heterólogos, polipéptidos o proteínas con la ayuda de un medio que contiene L-serina y L-cisteína (Documento Patente 8). Además, se ha desvelado la producción de t-Pa con la ayuda de inductores (Documento Patente 6). Se ha descrito la preparación de un miotubo celular con un medio de cultivo que contenía un alto contenido de aminoácidos (Documento Patente 10).

20 Documento no Patente 1: Journal of Bioscience and Bioengineering (2005), 100(5), 502-510

Documento no Patente 2: Animal Cell Technolog (1997) XX, XX, 675-680

Documento Patente 1: EP A2 0 513 738

Documento Patente 2: WO A2 2006/026408

Documento Patente 3: US A 6 048 728

25 Documento Patente 4: EP A2 1 132 465

Documento Patente 5: EP A2 0 481 791

Documento Patente 6: DE A1 37 34 632

Documento Patente 7: US A1 2004/229319

Documento Patente 8: WO A2 02/33109

30 Documento Patente 9: WO A2 2006/050050

Documento Patente 10: JP A 2006 296282

## Divulgación de la invención

### 35 Problemas a resolver por la invención

La presente invención es aplicable a un método de cultivo semi-continuo utilizando un medio en el que los componentes biológicos del medio se reducen al mínimo, y que tiene como objetivo proporcionar un medio mejorado de manera que las células se cultiven mediante un cultivo semi-continuo utilizando el medio, en el que las células producen proteínas con un alto rendimiento.

### Medios para resolver los problemas

45 Se ha estudiado extensa e intensivamente para resolver los problemas anteriores.

En consecuencia, se descubrió que ciertos aminoácidos específicos se agotaban frecuentemente y que el mantenimiento de dichos aminoácidos a altas concentraciones en un cultivo líquido libre de suero facilitaba que las células produjeran proteínas con un alto rendimiento. Gracias a este hallazgo, se completó la presente divulgación.

50 Específicamente, la presente invención proporciona:

(1) un método de cultivo de una célula CHO mediante un cultivo semi-continuo, que comprende la adición de un medio semi-continuo que comprende serina, cisteína y tirosina, donde el medio semi-continuo se suministra secuencial o continuamente a la solución de cultivo en múltiples lotes, caracterizado por que la concentración de serina en la solución de cultivo se mantiene a 2 mM o más alta, y la concentración de tirosina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta, donde la concentración de serina y tirosina se mantienen durante un periodo desde el cuarto día al décimo día de cultivo y donde la concentración de cisteína en la solución de cultivo puede ser de 0,4 mM o más alta durante una parte o el periodo de cultivo completo desde el tercer día de cultivo, donde dicho método se utiliza en un procedimiento que comprende el cultivo de una célula que es capaz de producir la proteína deseada para obtener la proteína deseada;

(2) un procedimiento de producción de una proteína deseada cultivando una célula CHO, que comprende el cultivo de una célula CHO utilizando el método de (1);

65 (3) el procedimiento de acuerdo con (2) donde la célula se transforma con un gen que codifica la proteína deseada;

(4) el procedimiento de (3), donde la proteína deseada es un anticuerpo;

(5) un procedimiento de preparación de un medicamento que comprende una proteína como principio activo, donde el procedimiento comprende las etapas siguientes,

5

(i) producir la proteína por el procedimiento de uno cualquiera de (2) a (4), y

(ii) mezclar la proteína con un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable donde dicha proteína tiene una propiedad biológica que se puede utilizar como un producto farmacéutico.

## 10 Ventajas de la invención

La presente divulgación se puede utilizar convenientemente en la producción de péptidos o proteínas fisiológicamente activas. Una característica de la presente divulgación es que el cultivo que utiliza un medio definido químicamente libre de componentes biológicos lo hace más productivo de proteínas. Además, debido a que el medio semi-continuo para su uso en el presente documento contiene aminoácidos significativamente puros, la composición del medio está claramente definida y el medio tiene propiedades uniformes con menos variaciones entre los lotes. El uso del medio asegura que se obtenga también una proteína de propiedades uniformes, por lo tanto el medio es adecuado para la fabricación industrial. Específicamente, el medio contribuye enormemente, por ejemplo, al suministro en masa de anticuerpos para un uso farmacéutico.

20

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la transición de concentraciones de anticuerpos durante el periodo de cultivo (Ejemplo 1)

La Figura 2 muestra la transición de viabilidad durante el periodo de cultivo (Ejemplo 1)

25

La Figura 3 muestra la transición de concentraciones de lactato durante el periodo de cultivo (Ejemplo 1)

La Figura 4 muestra la transición de concentraciones de anticuerpos durante el periodo de cultivo (Ejemplo 2)

La Figura 5 muestra la transición de viabilidad durante el periodo de cultivo (Ejemplo 2)

La Figura 6 muestra la transición de concentraciones de lactato durante el periodo de cultivo (Ejemplo 2)

30

La Figura 7 muestra la transición de concentraciones de anticuerpos durante el periodo de cultivo (Ejemplo 3)

La Figura 8 muestra la transición de concentraciones de serina durante el periodo de cultivo (Ejemplo 3)

La Figura 9 muestra la transición de concentraciones de tirosina durante el periodo de cultivo (Ejemplo 3)

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de un transportador de taurina de hámster y la secuencia de nucleótido de un gen que codifica el mismo.

35

(Ejemplo de referencia 1)

La Figura 11 muestra una estructura del transportador de taurina del hámster.

(Ejemplo de referencia 1)

40

La Figura 12 muestra una estructura de un plásmido de expresión pHyg/TauT.

(Ejemplo de referencia 2)

## 45 Realización de la invención

A continuación se describen específicamente las realizaciones de la presente divulgación.

50

Un método de la presente divulgación se caracteriza por que comprende el mantenimiento, cuando las células capaces de producir proteínas deseadas se cultivan para obtener las proteínas, de serina en una solución de cultivo a una alta concentración. Específicamente, el método se caracteriza por que se mantiene la concentración de serina en la solución de cultivo a 1 mM o más alta, preferentemente a 2 mM o más alta, al menos durante un cierto periodo de tiempo después del inicio de la fase de crecimiento celular.

55

En consecuencia, un aspecto desvelado en el presente documento es un medio de cultivo celular animal que comprende al menos 1 mM de serina o una sal de la misma. En la presente divulgación, la expresión "medio de cultivo celular animal que comprende al menos 1 mM de serina (o una sal de la misma)" se refiere no solo al medio que comprende serina a una concentración de 1 mM o más alta en un medio inicial sino también a un medio que se ajusta de manera que la concentración de serina de la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta, preferentemente 2 mM o más alta, mediante la adición de un medio semi-continuo o similar al menos durante un cierto periodo desde o después de la aparición de la fase de crecimiento celular.

60

El método de la presente divulgación se caracteriza por comprender adicionalmente la suplementación de la solución de cultivo con tirosina y/o cisteína, además de contener serina a alta concentración. Específicamente, la concentración de tirosina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta y/o la concentración de cisteína se mantiene a la concentración de la cisteína en el medio inicial o más alta al menos durante un cierto periodo desde o

65

después de la aparición de una fase de crecimiento celular. Como la concentración de cisteína en el medio inicial es normalmente aproximadamente de 0,4 mM, la concentración de cisteína en la solución de cultivo puede ser de 0,4 mM o más alta, preferentemente de 1 mM o más alta, al menos durante un cierto periodo desde o tras el punto de inicio de la fase decrecimiento celular, independientemente de la concentración de cisteína en el medio inicial.

5 En consecuencia, otro aspecto de la presente divulgación es un medio de cultivo celular animal que comprende 1 mM o más de serina o una sal de la misma, y al menos 2 mM o más de tirosina y/o 0,4 mM o más de cisteína.

10 En el presente documento, la expresión "medio de cultivo celular animal que comprende al menos 1 mM de tirosina" se refiere no solo a un medio que comprende tirosina a una concentración de 1 mM o más alta en un medio inicial sino también un al medio ajustado de manera que se mantenga una concentración de tirosina en la solución de cultivo de 1 mM o más alta mediante la adición de un medio semi-continuo o similar al menos durante un cierto periodo desde o después de la aparición de la fase de crecimiento celular. De manera similar, la expresión "medio de cultivo celular animal que comprende al menos 0,4 mM de cisteína" se refiere no solo a un medio que comprende  
15 cisteína a una concentración de 0,4 mM o más alta en un medio inicial sino también un medio ajustado de manera que se mantenga una concentración de cisteína en la solución de cultivo de 0,4 mM o más alta mediante la adición de un medio semi-continuo o similar al menos durante un cierto periodo desde o tras la aparición de la fase de crecimiento celular.

20 Si la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo se mantiene como se ha descrito anteriormente mientras se cultivan las células, la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución se mantiene a una concentración predeterminada o más alta al menos durante una parte de un periodo suficiente para facilitar que las células que se van a cultivar crezcan suficientemente, o durante una parte de un periodo suficiente para facilitar la producción adecuada de las proteínas deseadas que se van a producir, haciendo posible que las  
25 células produzcan las proteínas con un alto rendimiento.

En consecuencia, otro aspecto de la presente divulgación es un método de cultivo de células capaces de producir las proteínas deseadas para obtener las proteínas mediante el uso de un medio ajustado de manera que se mantenga una concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) a una concentración predeterminada o más alta. En  
30 consecuencia, otro aspecto de la presente divulgación es un procedimiento de producción de proteínas deseadas, cuyo procedimiento se caracteriza por que comprende cultivar las células capaces de producir las proteínas deseadas mediante el uso de un medio de cultivo celular animal que comprende al menos 1 mM de serina o una sal de la misma. Otro aspecto de la presente divulgación es un método de producción de proteínas deseadas, cuyo método se caracteriza por que comprende el cultivo de células capaces de producir las proteínas deseadas  
35 mediante el uso de un medio de cultivo celular animal que comprende al menos 1 mM de serina o una sal de la misma, al menos 1 mM de tirosina, y/o al menos 0,4 mM de cisteína.

En el presente documento, el periodo durante el cual se mantiene la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo en una concentración predeterminada o más alta como se ha descrito anteriormente puede ser una parte de un periodo desde el punto de inicio al punto final de la fase de crecimiento, o un periodo completo desde el punto de inicio al punto final de la fase de crecimiento, o un periodo de cultivo completo.

40 La expresión "aparición (o punto de inicio) de una fase de crecimiento" como se utiliza en el presente documento se refiere a un periodo de transición entre una fase de pausa a una fase de crecimiento acelerado de las células cultivadas. A continuación, la fase pasa de la fase de crecimiento acelerado a una fase de crecimiento exponencial, una fase de declive, una fase estacionaria, y luego una fase de muerte. ((Takeshi Kobayashi y Hiroyuki Honda, "Seibutsukagakukogaku" (Biochemical Engineering), Tokyo Kagaku Dojin, Applied Life Science Serie 8, 2002).

En otro aspecto de la presente divulgación, el periodo durante el cual la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo se mantiene a una concentración predeterminada o más alta en el método de cultivo de la presente divulgación puede ser una parte de o un periodo completo suficiente para facilitar que las células que se van a cultivar crezcan suficientemente, o una parte de o un periodo entero suficiente para facilitar la producción adecuada de proteínas deseadas; específicamente, la concentración se puede mantener a una concentración predeterminada o más alta durante una parte de o un periodo completo desde el punto de inicio al  
50 punto final de la fase de crecimiento de las células que se cultivan. Es especialmente importante mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta durante un cierto periodo desde o después del tercer día de cultivo, debido a que el contenido de aminoácidos del medio inicial se agota el, y después del, tercer día de cultivo. En consecuencia, en este aspecto de la presente divulgación, más específicamente, un periodo en el cual se necesita mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta puede ser al menos una parte de o un periodo completo desde el tercer día de cultivo hasta una fase desde la fase de declive a la fase estacionaria de las células cultivadas, preferentemente una parte de o un periodo entero desde el tercer día de cultivo hasta una fase desde la fase de crecimiento celular exponencial hasta la fase de declive.

65 en un aspecto específico adicional, es preferible mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta durante un periodo desde al menos 4 días

después (normalmente el día 5 del cultivo) del punto de inicio de la fase de crecimiento celular (normalmente alrededor del día 1 de cultivo), preferentemente un periodo desde al menos 3 días después (normalmente el día 4 de cultivo) el punto de inicio de la fase decrecimiento, más preferentemente un periodo desde al menos 2 días después (normalmente el día 3 de cultivo) el punto de inicio de la fase de crecimiento, incluso más preferentemente un periodo desde o después del punto de inicio de la fase de crecimiento. Además, se necesita mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta al menos hasta 5 días antes del final del cultivo, preferentemente hasta 4 días antes del final del cultivo, más preferentemente hasta 3 días antes del final del cultivo, en los casos en los que el periodo de cultivo no es mayor de dos semanas; en los casos en los que el periodo de cultivo es mayor de dos semanas, se necesita mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta hasta el décimo día de cultivo, preferentemente hasta 5 días antes del final del cultivo, más preferentemente hasta 4 días antes del final del cultivo, incluso más preferentemente hasta 3 días antes del final del cultivo.

En otro aspecto de la presente divulgación, es preferible mantener continuamente la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta al menos durante una parte de la fase de crecimiento exponencial. Un periodo específico es un periodo desde los 4 días después del punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial, preferentemente un periodo desde los 3 días después del punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial, más preferentemente un periodo desde el punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “una parte de una fase de crecimiento celular exponencial” se refiere a una parte de la fase de crecimiento exponencial, un periodo completo desde el punto de inicio hasta el punto final de la fase de crecimiento exponencial, o un periodo de cultivo completo, durante el cual se puede mantener la concentración.

En un cultivo celular típico, el punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial es normalmente alrededor del día 3 del cultivo. En consecuencia, en otro aspecto específico de la presente divulgación, la concentración de serina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta, preferentemente 2 mM o más alta, al menos durante una parte de o un periodo de cultivo completo desde el tercer día del cultivo. En casos en los que las concentraciones de tirosina y/o cisteína se mantienen también a concentraciones predeterminadas o más altas, la concentración de tirosina en la solución de cultivo se mantiene en 1 mM o más alta y/o la concentración de cisteína se mantiene a la concentración de la cisteína en un medio inicial o más alta al menos durante una parte de o un periodo de cultivo completo desde el tercer día del cultivo. Como la concentración típica de cisteína en el medio inicial es aproximadamente de 0,4 mM, dicha concentración de cisteína en la solución del cultivo puede ser 0,4 mM o más alta, preferentemente 1 mM o más alta, durante una parte de o un periodo de cultivo completo desde el tercer día del cultivo, independientemente de la concentración de cisteína en el medio inicial.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “al menos una parte de o un periodo de cultivo completo” se refiere a un periodo de cultivo desde el cuarto, quinto, sexto, o séptimo día del cultivo, o un periodo de cultivo desde el punto de inicio del cultivo o desde el primer o segundo día del cultivo que incluye una parte de o un periodo de cultivo completo desde el tercer día del cultivo.

En los casos en los que el periodo de cultivo no es mayor de dos semanas, es preferible mantener continuamente la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta al menos hasta 5 días antes del final del cultivo, preferentemente hasta 4 días antes del final del cultivo, más preferentemente hasta 3 días antes del final del cultivo. En los casos en los que el periodo de cultivo es mayor de dos semanas, es preferible mantener continuamente la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta al menos hasta el décimo día del cultivo, preferentemente hasta 5 días antes del final del cultivo, más preferentemente hasta 4 días antes del final del cultivo, incluso más preferentemente hasta 3 días antes del final del cultivo.

En consecuencia, en otro aspecto de la presente divulgación, la concentración de serina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta, preferentemente a 2 mM o más alta, al menos durante una parte de o un periodo completo desde el tercer día hasta el décimo día del cultivo. En los casos en los que las concentraciones de tirosina y/o cisteína también se mantienen en concentraciones predeterminadas o más altas, la concentración de tirosina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta y/o la concentración de cisteína se mantiene a una concentración de la cisteína del medio inicial o más alta al menos durante una parte de o un periodo completo desde el tercer día hasta el décimo día del cultivo. Como la concentración de cisteína en el medio inicial es normalmente aproximadamente 0,4 mM, la concentración de cisteína en la solución de cultivo se puede mantener a 0,4 mM o más alta, preferentemente 1 mM o más alta, durante una parte de o un periodo completo desde el tercer día hasta el décimo día del cultivo, independientemente de la concentración de cisteína en el medio inicial.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “al menos una parte de o un periodo de cultivo completo desde el tercer día hasta el décimo día del cultivo” se refiere a un periodo de cultivo desde el cuarto, quinto, sexto, o séptimo día del cultivo, o un periodo de cultivo desde el punto de inicio del cultivo o desde el primer o segundo día del cultivo que incluye una parte de o un periodo de cultivo completo desde el tercer día hasta el décimo día del cultivo.

En el aspecto anterior, es suficiente mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada o más alta al menos durante una parte de o un periodo completo desde el tercer día del cultivo. Incluso cuando el periodo de cultivo es menor de 10 días, si la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo se mantiene a una concentración predeterminada o más alta durante una parte de o un periodo completo desde el tercer día del cultivo, se englobará en el alcance de la presente divulgación.

El cultivo de las células por el método descrito en el presente documento facilita la producción con un alto rendimiento de proteínas que son bio-productos de las células, y las proteínas se aíslan del medio de cultivo y se purifican para obtener las proteínas deseadas.

El cultivo de las células mientras se mantiene la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo a una concentración predeterminada se puede conseguir por la adición de una alta concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) al medio en un estadio temprano del cultivo celular, o por adición de un medio que comprende una alta concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) durante el cultivo para suplementar el medio con aminoácidos.

Un momento preferido para el comienzo de la suplementación de la solución de cultivo con aminoácidos para mantener la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo es al menos a los 3 días en un momento en el que los aminoácidos de la solución de cultivo alcanzan una concentración predeterminada o menor, preferentemente en 1 día, más preferentemente antes de que los aminoácidos alcancen una concentración predeterminada o menor. La suplementación de aminoácidos se puede llevar a cabo solo una vez, en lotes secuencialmente, o continuamente. De manera alternativa, el medio inicial puede contener una cantidad total de aminoácidos necesaria para mantener los aminoácidos a concentraciones predeterminadas.

En general, los métodos de cultivo celular se clasifican en cultivo por lotes, cultivo continuo, cultivo semi-continuo. En el método de la presente divulgación, se puede utilizar cualquiera de estos métodos de cultivo, pero se utilizan preferentemente el cultivo semi-continuo o cultivo continuo; el uso del cultivo semi-continuo se prefiere especialmente.

El cultivo por lotes es un método de cultivo en el que se añade una pequeña cantidad de solución de cultivo de siembra a un medio y las células se cultivan sin adición alguna de nuevo medio ni se desecha solución de cultivo durante el cultivo. En el caso de utilizar el cultivo por lotes que se describe en el presente documento, el medio comprende una alta concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) desde un estadio inicial del cultivo celular.

El cultivo continuo es un método de cultivo en el que se añade y se desecha el medio continuamente durante el cultivo. Este método continuo incluye el cultivo de perfusión.

El cultivo de alimentación discontinua se llama también cultivo semi-continuo debido a que está entre el cultivo por lotes y el cultivo continuo. En el cultivo semi-continuo, se alimenta continua o secuencialmente el medio durante el cultivo, pero a diferencia del cultivo continuo, no se lleva a cabo el desecho de la solución de cultivo en el cultivo. El medio que se añade al cultivo semi-continuo (de aquí en adelante "medio semi-continuo") no tiene que ser necesariamente el mismo medio que el que se ha utilizado en el cultivo (de aquí en adelante "medio inicial"); a saber, se puede añadir un medio diferente, o se pueden añadir solamente componentes específicos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio inicial" se refiere en general a un medio que se utiliza en un estadio temprano del cultivo celular. Nótese que en el caso en el que se añada un medio semi-continuo en múltiples lotes, se puede hacer referencia a cada medio anterior a la adición del medio semi-continuo como medio inicial.

En el caso de emplear el cultivo semi-continuo o el cultivo continuo de la presente divulgación, el medio que se va a añadir durante el cultivo puede contener una alta concentración de serina (y tirosina y/o cisteína), o puede estar contenida una alta concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en el medio de cultivo desde un estadio inicial del cultivo celular. Lo que es importante es mantener la concentración de serina, o las concentraciones de serina y tirosina respectivas, o las concentraciones respectivas de serina y cisteína, o las concentraciones respectivas de serina, tirosina y cisteína a una concentración predeterminada o más alta, al menos durante un estadio del cultivo predeterminado, como se ha descrito anteriormente. Para realizar lo anterior, por ejemplo, la concentración de serina (y tirosina y/o cisteína) en la solución de cultivo se puede controlar para ajustar las concentraciones de estos aminoácidos que se van a añadir en el medio de manera que se puedan controlar las concentraciones de estos aminoácidos en la solución de cultivo. De manera alternativa, se puede emplear un método en el que, por ejemplo, se determine un estadio en una curva de crecimiento celular basándose en el número de células del cultivo para controlar la suplementación de los aminoácidos.

A continuación se describe en detalle la serina, tirosina y cisteína en la solución de cultivo, por las que se caracteriza la presente divulgación.

Se puede utilizar serina sola, derivados de la misma, y sales de la misma. Se puede utilizar serina natural, serina sintética, o serina producida por recombinación genética. La concentración de serina en la solución de cultivo es, por ejemplo, 1 mM o más alta, preferiblemente 2 mM o más alta al menos durante un periodo predeterminado en el cultivo. Un medio que comprende serina utilizado convencionalmente normalmente comprende aproximadamente

5 0,5 mM de serina, por lo tanto se reconoce que la concentración de serina en la presente divulgación es significativamente alta (Dulbecco, R., Freeman, G. *Virology* 8, p396 (1959), *Nature, New Biology* (1971) 230, p52)).

De manera similar, se puede utilizar cualquiera de entre tirosina sola, derivados de la misma, y sales de la misma. Se puede utilizar tirosina natural, tirosina sintética, o tirosina producida por recombinación genética. De manera similar se puede utilizar cualquiera de entre cisteína sola, derivados de la misma y sales de la misma, incluyendo cisteína que sea un dímero de cisteína. Se puede utilizar cisteína natural, cisteína sintética, o cisteína producida por recombinación genética. La concentración de tirosina en la solución de cultivo es de 1 mM o más alta y/o la concentración de cisteína es la concentración de cisteína del medio inicial o más alta al menos durante un periodo predeterminado durante el cultivo.

10

15

En el caso de emplear el cultivo semi-continuo como método de cultivo de células en la presente divulgación, la serina y tirosina y/o cisteína se disuelven a altas concentraciones para enriquecer un medio semi-continuo y se añade el medio semi-continuo o bien continuamente o secuencialmente durante el cultivo de manera que las concentraciones de estos aminoácidos se mantengan en concentraciones predeterminadas o más altas. Específicamente, por ejemplo, se puede utilizar un medio semi-continuo que comprenda L-serina a una concentración de aproximadamente 10-1000 mM, preferentemente 20-500 mM, más preferentemente 50-200 mM, en el medio semi-continuo. De manera alternativa, se puede utilizar un medio semi-continuo que comprenda L-tirosina a una concentración de aproximadamente 0,01-1000 mM, preferentemente 1-200 mM, más preferentemente 10-100 mM, o un medio semi-continuo que comprenda clorhidrato de L-cisteína monohidrato a una concentración de aproximadamente 0,01-500 mM, preferentemente 0,1-50 mM, más preferentemente 1-10 mM, en el medio semi-continuo.

20

25

En el caso en el que se añada el medio semi-continuo a la solución de cultivo descrita en el presente documento, una cantidad de medio semi-continuo que se va a añadir secuencial o continuamente durante un periodo de cultivo o durante un cierto periodo durante el periodo de cultivo puede ser del 1-150 %, preferentemente 5-50 %, más preferentemente 8-20 %, o una cantidad del medio inicial.

30

En la presente divulgación, un periodo de adición del medio semi-continuo a la solución de cultivo incluye al menos una parte de o un periodo completo desde el punto de inicio al punto final de la fase de crecimiento celular del cultivo. Un periodo preferido es un periodo desde al menos 4 días después del punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial (normalmente alrededor del día 3 del cultivo) de las células que se van a cultivar, preferentemente desde 3 días después del punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial, más preferentemente desde el punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial (normalmente alrededor del día 3 del cultivo). Es preferible iniciar la alimentación al menos a los 3 días desde el momento en que la concentración del aminoácido en la solución de cultivo alcanza una concentración predeterminada o menor, preferentemente el día 1, más preferentemente antes de que la concentración del aminoácido alcance la concentración predeterminada. En los casos en los que el periodo de cultivo no es mayor de dos semanas, la alimentación se puede llevar a cabo o continuar al menos hasta el décimo día del cultivo, preferentemente hasta 5 días antes del final del cultivo, preferentemente 4 días antes, más preferentemente 3 días antes. En los casos en los que el periodo de cultivo es mayor de dos semanas la alimentación se puede llevar a cabo o continuar al menos hasta el décimo día de cultivo, preferentemente hasta 5 días antes del final del cultivo, más preferentemente hasta 4 días antes del final del cultivo, incluso más preferentemente hasta 3 días antes del final del cultivo.

35

40

45

Los componentes que se utilizan habitualmente en los medios para el cultivo de células (preferentemente células animales) se pueden utilizar apropiadamente como otros componentes en la solución de cultivo para su uso en los métodos descritos en el presente documento, que incluyen aminoácidos, vitaminas, factores lipídicos, fuentes de energía, osmorreguladores, fuentes de hierro, y tampones del pH. Además de los componentes anteriores, se pueden añadir, un elemento metálico menor, tensioactivos, cofactores de crecimiento, nucleósidos, o similares. Los componentes del medio, incluyendo los componentes característicos, para su uso en el presente documento se pueden dividir, y se pueden añadir por separado en el cultivo celular. Específicamente, por ejemplo, se puede utilizar una alta concentración de serina sola y los componentes del medio del cultivo celular, sea al mismo tiempo o en diferentes momentos.

50

55

Ejemplos específicos de otros componentes de la solución de cultivo incluyen: aminoácidos tales como L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-treonina, L-triptófano, y L-valina, preferentemente L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-treonina, L-triptófano, y L-valina; vitaminas tales como L-inositol, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, pantotenato cálcico, clorhidrato de piridoxal, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B12, y ácido ascórbico, preferentemente biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, pantotenato cálcico, clorhidrato de

60

65

piridoxal, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina B12, y ácido ascórbico; factores lipídicos tales como cloruro de colina, tartrato de colina, ácido linoleico, ácido oleico, y colesterol, preferentemente cloruro de colina; fuentes de energía tales como glucosa, galactosa, manosa, y fructosa, preferentemente glucosa; osmorreguladores tales como cloruro sódico, cloruro potásico, y nitrato potásico, preferentemente cloruro sódico; fuentes de hierro tales como EDTA férrico, citrato férrico, cloruro ferroso, cloruro férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico, y nitrato férrico, preferentemente cloruro férrico, EDTA férrico, y citrato férrico; y tampones de pH tales como bicarbonato sódico, cloruro cálcico, fosfato dihidrógeno sódico, HEPES, y MOPS, preferentemente bicarbonato sódico.

Además de los componentes anteriores, la solución de cultivo puede comprender, por ejemplo, elementos metálicos menores tales como sulfato de cobre, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de magnesio, cloruro de níquel, cloruro de estaño, cloruro magnésico, y silicato sódico, preferentemente sulfato de cobre, sulfato de zinc, y sulfato magnésico; tensioactivos tales como Tween 80 y Pluronic F68; y cofactores de crecimiento tales como insulina recombinante, IGF recombinante, EGF recombinante, FGF recombinante, PDGF recombinante, TGF-alfa recombinante, clorhidrato de etanolamina, selenito sódico, ácido retinoico, y clorhidrato de putrescina, preferentemente selenito sódico, clorhidrato de etanolamina, IGF recombinante, y clorhidrato de putrescina; y nucleósidos tales como desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, adenosina, citidina, guanosina y uridina.

En el presente documento, pueden estar contenidos antibióticos, tales como estreptomycin, penicilina G potásica, y gentamicina, e indicadores del pH, tales como rojo fenol.

La cantidad de otros componentes de la solución de cultivo están normalmente en intervalos adecuados de 0,05-1500 mg/l de aminoácidos, 0,001-10 mg/l de vitaminas, 0-200 mg/l de factores lipídicos, 1-20 g/l de fuentes de energía, 0,1-10000 mg/l de osmorreguladores, 0,1-500 mg/l de fuentes de hierro, 1-10000 mg/l de tampones de pH, 0,00001-200 mg/l de elementos metálicos menores, 0-5000 mg/l de tensioactivos, 0,05-10000 µg/l de cofactores de crecimiento, y 0,001-50 mg/l de nucleósidos, pero no se limita a estos intervalos y se puede determinar apropiadamente dependiendo del tipo de célula que se cultive, el tipo de proteína deseada, y similares.

El pH de la solución de cultivo depende de las células que se van a cultivar, pero normalmente es un pH de 6,8-7,6, y muy a menudo adecuadamente puede ser un pH de 7,0-7,4.

En la presente divulgación, las células se pueden cultivar utilizando un medio sintético completo en el que se disuelven los componentes anteriores. También es posible utilizar como medio básico un medio conocido convencionalmente para el cultivo celular animal, y el medio se puede suplementar con los componentes característicos para su uso en el presente documento. Ejemplos de medios básicos disponibles en el mercado que se pueden utilizar como medio de cultivo celular animal incluyen: D-MEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco), D-MEM/Mezcla F-12 1:1 (Medio Eagle Modificado de Dulbecco: Mezcla de Nutrientes F-12), RPMI1640, CHO-S-SFMII (Invitrogen), CHO-SF (Sigma-Aldrich), EX-CELL 301 (JRH biosciences), CD-CHO (Invitrogen), IS CHO-V (Irvine Scientific), y PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich). En los casos en que se cultivan las células por cultivo semi-continuo, se pueden utilizar dichos medios disponibles en el mercado como medio inicial en un estadio temprano del cultivo celular. Se puede concentrar el mismo medio utilizado como medio inicial y suplementarse con serina y tirosina y/o cisteína y entonces utilizarlos como medio semi-continuo.

Los métodos de cultivo de la presente divulgación se pueden utilizar para cultivar distintas células (por ejemplo, células bacterianas, células fúngicas, células de insecto, células vegetales, células animales) sin ninguna limitación. Por ejemplo, se pueden cultivar células COS recombinantes o células CHO recombinantes que portan un gen que codifica una proteína deseada preparada por modificación genética, o células fusionadas que producen anticuerpos, ejemplificadas por el hibridoma tal como de ratón-humano, ratón-ratón. Los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para cultivar células animales para obtener proteínas tipo natural que producen las células animales, o para cultivar células BHK, células HeLa, y similares, así como las células descritas anteriormente.

Las células animales que se pueden utilizar en la presente divulgación son las células CHO en las que se ha introducido un gen que codifica una proteína deseada. La proteína deseada no se limita particularmente y puede ser cualquier proteína tal como anticuerpos, tales como anticuerpos naturales, fragmentos de anticuerpo, fragmentos pequeños de anticuerpo o "minicuerpos", anticuerpos quiméricos, y anticuerpos humanizados (por ejemplo, los anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-glicoproteína-3, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-GPIIb/IIIa, anticuerpos anti-TNF, anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-Her2/neu, anticuerpos anti-RSV, anticuerpos anti-CD33, anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-VLA4) y proteínas fisiológicamente activas (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), eritropoyetina, interferón, interleucina tal como IL-1 e IL-6, t-PA, urocinasa, seroalbúmina, factor de coagulación sanguínea), pero se prefieren especialmente los anticuerpos.

Los anticuerpos producidos por los métodos descritos en el presente documento incluyen no solo anticuerpos monoclonales derivados de animales, tales como seres humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, y monos, sino también anticuerpos recombinantes modificados genéticamente de manera artificial, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos biespecíficos. La clase de inmunoglobulina de un anticuerpo no

se limita particularmente y puede ser cualquiera de entre IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgA, IgD, IgE, e IgM, aunque se prefieren las IgG e IgM para usos farmacéuticos. Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen no solo anticuerpos completos sino también fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, Fab, y F(ab)<sub>2</sub>, y minicuerpos que son Fv de cadena sencilla (por ejemplo, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>) con una unión uni-, bi-, o multivalente en los

5

Como las condiciones de cultivo se diferencian según los tipos de células que se van a utilizar, las condiciones adecuadas se pueden determinar apropiadamente. Por ejemplo, las células CHO se pueden cultivar, normalmente, en una atmósfera de gas CO<sub>2</sub> a una concentración del 0-40 %, preferentemente del 2-10 %, a 30-39 °C, preferentemente aproximadamente 37 °C, durante 1-50 días, preferentemente 1-14 días.

10

Se pueden utilizar distintos biorreactores para los cultivos celulares animales; por ejemplo, tanques biorreactores tipo fermentador, biorreactores de elevador de aire, biorreactores de matraces de cultivo, biorreactores de matraces giratorios, biorreactores microportadores, biorreactores de lecho fluidificado, biorreactores de fibra hueca, biorreactores de botellas giratorias, y biorreactores de lecho empaquetado.

15

Cultivar las células (preferentemente células animales) con los métodos de la presente divulgación facilita la producción de proteínas con un alto rendimiento.

20

Algunas proteínas pueden producirse simplemente cultivando las células que producen proteínas, mientras que la producción de otras proteínas necesita operaciones especiales. La operación o condiciones se pueden determinar apropiadamente según las células animales que se van a cultivar. Por ejemplo, en el caso de las células CHO transformadas por modificación genética con un vector que tiene un gen que codifica un anticuerpo quimérico de ratón-humano, las células se pueden cultivar en las condiciones anteriores de manera que se obtenga una proteína deseada en el medio a los 1-50 días, preferentemente 5-21 días, más preferentemente aproximadamente 7-14 días. La proteína resultante se puede aislar y purificar por métodos bien conocidos en la técnica (referirse por ejemplo a Kotaiogakunyumon (Introduction to Antibody Engineering), Chijinshokan Co. Ltd., (1994) p. 102-104; Affinity Chromatography Principles & Methods, GE Healthcare, (2003) p. 56-60) para obtener la proteína deseada.

25

30

La presente divulgación hace posible una producción de anticuerpos recombinantes con un alto rendimiento (por ejemplo, anticuerpos naturales, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos fragmentados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos), proteínas recombinantes genéticamente (por ejemplo, factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF), factores estimulantes de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), eritropoyetinas, interferón, interleucinas tales como IL-1 e IL-6, t-PA, urocinasa, seroalbúmina, factores de coagulación sanguínea), y similares.

35

En los casos en los que una proteína o polipéptido producidos por los métodos que se describen en el presente documento (a veces se hace referencia a la proteína y el polipéptido como la proteína de la presente divulgación) tiene una actividad biológica que se puede utilizar en un producto farmacéutico, dicha proteína o polipéptido se puede mezclar con un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable y formularse para producir un medicamento. Las proteínas de la presente divulgación, y los medicamentos que comprenden como principio activo las proteínas de la presente divulgación también se engloban en el alcance de la presente divulgación.

40

Ejemplos de vehículo y aditivos farmacéuticamente aceptables incluyen el agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímeros de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliácido acrílico sódico, alginato sódico, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma de xantano, goma arábiga, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerol, glicerol, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, seroalbúmina humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, y tensioactivos que son aceptables como aditivos farmacéuticos.

50

Un aditivo actual se selecciona de entre los anteriores, sea solo o en combinación, según una forma de agente terapéutico que sea un producto farmacéutico de la presente divulgación, pero no se limita definitivamente a los enumerados anteriormente. Por ejemplo, en los casos en los que se utilice como una formulación por inyección, se puede utilizar un aditivo preparado disolviendo un polipéptido purificado en un disolvente, tal como solución salina fisiológica, una solución tampón, y una solución de azúcar de uva, y añadiendo un agente que evite la adsorción, tal como Tween 80, Tween 20, gelatina, y seroalbúmina humana. Se puede utilizar un aditivo secado por congelación para realizar una forma que se disuelva y re-estructure antes de su uso, y por ejemplo se pueden utilizar alcoholes azúcares y azúcares, tales como manitol y azúcar de uva, como excipientes para el secado por congelación.

55

60

La cantidad eficaz de administración del polipéptido se selecciona apropiadamente según un tipo de polipéptido, tipo de enfermedad que se va a tratar o prevenir, edad del paciente, la gravedad de la enfermedad, y similares. Por ejemplo, en los que casos en que la proteína de la presente divulgación es un anticuerpo tal como un anticuerpo anti-glipicano, la cantidad eficaz de administración se selecciona de entre el intervalo de 0,001 mg a 1000 mg por kilogramo de peso corporal por administración. La cantidad de administración se puede seleccionar de entre el intervalo de 0,01 a 100000 mg/paciente. La cantidad de administración no se limita por las anteriores.

65

Los métodos de administración de los productos farmacéuticos de la presente divulgación puede ser la administración oral y la administración parenteral, pero se prefiere la administración parenteral; ejemplos específicos incluyen la inyección (por ejemplo, la administración general o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similares), la administración transnasal, administración pulmonar y administración percutánea.

### Ejemplos

La presente divulgación se describe en detalle posteriormente, en referencia a los Ejemplos y Ejemplos de referencia.

#### **Ejemplo 1 Cultivo semi-continuo utilizando un medio de semi-continuo que comprende serina, cisteína y tirosina a altas concentraciones y que tiene un pH bajo (de una cepa de células CHO transformadas con un gen de anticuerpo)**

Una composición de un medio y un método de preparación son los siguientes.

Medio inicial: Se disolvió un medio de cultivo celular animal disponible en el mercado y luego se esterilizó por filtración.

Medio semi-continuo: Se disolvió un medio de cultivo celular animal para su uso en el medio inicial de manera que la concentración del medio de cultivo celular animal era tres veces la concentración del medio inicial. Después, se añadieron 50 mM de serina, 1,8 mM de clorhidrato de cisteína monohidrato, y 14,5 mM de tirosina, y se disminuyó el pH con ácido clorhídrico hasta que los componentes del medio se disolvieron completamente (alrededor de un pH de 1,5). Después de confirmar que los componentes del medio estaban completamente disueltos, el medio resultante se esterilizó por filtración.

Células: cepa de células CHO (en referencia al documento WO 2006/006693) que produce una IgG humanizada (anticuerpo anti-glipicano-3).

El medio inicial se cargó en un aparato de cultivo celular tipo jarra, y se añadieron las células CHO hasta que había  $2 \times 10^5$  células/ml para comenzar el cultivo en condiciones de 37 °C y un 10 % de CO<sub>2</sub>. Durante un periodo de cultivo de 14 días, se controló automáticamente un límite inferior de pH de 7,0, y se controló una concentración de oxígeno disuelto automáticamente al 40 %. A partir del tercer día de cultivo, se alimentó con el medio semi-continuo con un caudal constante (1,0 g/hora con respecto a 1 l de medio inicial), y el cultivo se continuó hasta el día catorce. Se llevó a cabo la toma de muestras al principio del cultivo y los días tercero, quinto, séptimo, décimo, duodécimo y catorceavo. Se sometieron los sobrenadantes de las muestras respectivas a cromatografía de afinidad utilizando proteína A para medir las concentraciones de anticuerpos que se producían, se sometieron a tinción con azul tripano para medir la tasa de supervivencia, y se sometieron a un método de enzima inmovilizada para cuantificar el lactato. Como se muestra en la Figura 1, en el caso del cultivo semi-continuo (de control) utilizando el medio semi-continuo que no se había enriquecido con serina, cisteína, y tirosina, la concentración de anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era aproximadamente de 1,6 g/l. Por otra parte, en el caso del cultivo semi-continuo (Ser, Cys, Tyr) utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y que comprendía cantidades aumentadas de serina, cisteína y tirosina a altas concentraciones, la concentración de anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era de aproximadamente 2,2 g/l; la concentración era aproximadamente un 40 % más alta. La Figura 2 muestra la transición de viabilidad (tasa de supervivencia) durante el periodo de cultivo. Además, como se muestra en la Figura 3, la concentración de lactato transicionaba a un nivel bajo desde el tercer día del cultivo en el cultivo semi-continuo utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y enriquecido con serina, cisteína y tirosina, en comparación con el cultivo semi-continuo utilizando el medio semi-continuo que no estaba enriquecido con serina, cisteína y tirosina.

#### **Ejemplo 2. Cultivo semi-continuo utilizando un medio semi-continuo que comprende serina cisteína y tirosina a altas concentraciones y que tiene un pH bajo (de una cepa de células CHO transformada con un gen de anticuerpo y un gen transportador de taurina de hámster)**

Una composición de un medio y un método de preparación son los siguientes.

Medio inicial: Se disolvió un medio de cultivo celular animal disponible en el mercado y luego se esterilizó por filtración.

Medio semi-continuo: Se disolvió un medio de cultivo celular animal para su uso en el medio inicial de manera que la concentración del medio de cultivo celular animal era tres veces la concentración del medio inicial. Después, se añadieron 50 mM de serina, 1,8 mM de clorhidrato de cisteína monohidrato, y 14,5 mM de tirosina, y se disminuyó el pH con ácido clorhídrico hasta que los componentes del medio se disolvieron completamente (alrededor de un pH de 1,5). Después de confirmar que los componentes del medio estaban completamente disueltos, el medio resultante se esterilizó por filtración.

Células: cepa de células CHO que produce IgG humanizada transformada con un gen transportador de taurina.

El medio inicial se cargó en un aparato de cultivo celular tipo jarra, y se añadieron las células CHO hasta que había  $2 \times 10^5$  células/ml para comenzar el cultivo en condiciones de 37 °C y un 10 % de CO<sub>2</sub>. Durante un periodo de cultivo de 14 días, se controló automáticamente un límite inferior de pH de 7,0, y se controló la concentración de oxígeno disuelto automáticamente a un 40 %. A partir del tercer día de cultivo, se alimentó con el medio semi-continuo con un caudal constante (1,5 g/hora con respecto a 1 l de medio inicial), y el cultivo se continuó hasta el día catorce. Se llevó a cabo la toma de muestras al principio del cultivo y los días tercero, quinto, séptimo, duodécimo y catorceavo. Se sometieron los sobrenadantes de las muestras respectivas a cromatografía de afinidad utilizando proteína A para medir las concentraciones de anticuerpos que se producían, se sometieron a tinción con azul tripano para medir la tasa de supervivencia, y se sometieron a un método de enzima inmovilizada para cuantificar el lactato. Como se muestra en la Figura 4, en el caso del cultivo semi-continuo (de control) utilizando el medio semi-continuo que no se había enriquecido con serina, cisteína, y tirosina, la concentración de anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era aproximadamente de 1,3 g/l. Por otra parte, en el caso del cultivo semi-continuo (Ser, Cys, Tyr) utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y que comprendía cantidades aumentadas de serina, cisteína y tirosina a altas concentraciones, la concentración de anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era de aproximadamente 2,0 g/l; la concentración era aproximadamente un 54 % más alta. Como se muestra en la Figura 5, en el caso del cultivo semi-continuo utilizando el medio semi-continuo que no estaba enriquecido con serina, cisteína, y tirosina, la tasa de supervivencia era del 52 % el día catorce del cultivo de 14 días. Por otra parte, en el caso del cultivo semi-continuo utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y que comprendía cantidades aumentadas de serina, cisteína, y tirosina a altas concentraciones, la tasa de supervivencia era del 78 % el día catorce del cultivo de 14 días; se mantuvo una alta viabilidad. Además, como se muestra en la Figura 6, la concentración de lactato transicionaba a un nivel bajo desde el tercer día de cultivo en el cultivo semi-continuo utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y enriquecido con serina, cisteína y tirosina, en comparación con el cultivo semi-continuo utilizando el medio semi-continuo que no estaba enriquecido con serina, cisteína y tirosina.

**Ejemplo 3. Cultivo semi-continuo que presenta la contribución de altas concentraciones de serina, cisteína, y tirosina para conseguir una producción con un alto rendimiento de anticuerpos (una cepa de células CHO transformadas con un gen de anticuerpo y un gen transportador de taurina de hámster)**

Una composición de un medio y un método de preparación son los siguientes.

Medio inicial: Se disolvió un medio de cultivo celular animal disponible en el mercado y luego se esterilizó por filtración.

Medio semi-continuo (Ser, Cys, Tyr): se disolvió un medio de cultivo celular animal para su uso en el medio inicial de manera que la concentración del medio de cultivo celular animal era tres veces la concentración del medio inicial. Después, se añadieron 50 mM de serina, 1,8 mM de clorhidrato de cisteína monohidrato, y 14,5 mM de tirosina, y se disminuyó el pH con ácido clorhídrico hasta que los componentes del medio se disolvieron completamente (alrededor de un pH de 1,5). Después de confirmar que los componentes del medio estaban completamente disueltos, el medio resultante se esterilizó por filtración.

Medio semi-continuo (Ser, Cys): se disolvió un medio de cultivo celular animal para su uso en el medio inicial de manera que la concentración del medio de cultivo celular animal era tres veces la concentración del medio inicial. Después, se añadieron 50 mM de serina, y 1,8 mM de clorhidrato de cisteína monohidrato, y se disminuyó el pH con ácido clorhídrico hasta que los componentes del medio se disolvieron completamente (alrededor de un pH de 1,0). Después de confirmar que los componentes del medio estaban completamente disueltos, el medio resultante se esterilizó por filtración.

Medio semi-continuo (Ser, Tyr): se disolvió un medio de cultivo celular animal para su uso en el medio inicial de manera que la concentración del medio de cultivo celular animal era tres veces la concentración del medio inicial. Después, se añadieron 50 mM de serina, y 14,5 mM de tirosina, y se disminuyó el pH con ácido clorhídrico hasta que los componentes del medio se disolvieron completamente (alrededor de un pH de 1,0). Después de confirmar que los componentes del medio estaban completamente disueltos, el medio resultante se esterilizó por filtración.

Medio semi-continuo (Cys, Tyr): se disolvió un medio de cultivo celular animal para su uso en el medio inicial de manera que la concentración del medio de cultivo celular animal era tres veces la concentración del medio inicial. Después, se añadieron 1,8 mM de clorhidrato de cisteína monohidrato, y 14,5 mM de tirosina, y se disminuyó el pH con ácido clorhídrico hasta que los componentes del medio se disolvieron completamente (alrededor de un pH de 1,0). Después de confirmar que los componentes del medio estaban completamente disueltos, el medio resultante se esterilizó por filtración.

Células: cepa de células CHO transformada con un gen transportador de taurina que produce IgG humanizada.

El medio inicial se cargó en un aparato de cultivo celular tipo jarra, y se añadieron las células CHO hasta que había  $2 \times 10^5$  células/ml para comenzar el cultivo en condiciones de 37 °C y un 10 % de CO<sub>2</sub>. Durante un periodo de cultivo de 14 días, se controló automáticamente un límite inferior de pH de 7,0, y se controló la concentración de oxígeno disuelto automáticamente a un 40 %. A partir del tercer día de cultivo, se alimentó con el medio semi-continuo con un caudal constante (1,0 g/hora con respecto a 1 l de medio inicial), y el cultivo se continuó hasta el día catorce. Se llevó a cabo la toma de muestras al principio del cultivo y los días tercero, quinto, séptimo, décimo, duodécimo y catorceavo. Las concentraciones de anticuerpos que se produjeron en los sobrenadantes de las muestras

respectivas se midieron por cromatografía de afinidad utilizando proteína A, y las concentraciones de aminoácidos, serina y tirosina, en los sobrenadantes de las respectivas muestras se midieron por análisis de aminoácidos utilizando una columna de intercambio iónico. Como se muestra en la Figura 7, en el caso del cultivo semi-continuo (de control) utilizando el medio semi-continuo que no se había enriquecido con serina, cisteína, y tirosina, la concentración de anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era aproximadamente de 1,16 g/l. Por otra parte, en el caso del cultivo semi-continuo (Ser, Cys, Tyr) utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y que comprendía cantidades aumentadas de serina, cisteína y tirosina a altas concentraciones, la concentración de anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era de aproximadamente 1,87 g/l; en el caso del cultivo semi-continuo (Ser, Cys) utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y que comprendía cantidades aumentadas de serina y cisteína a altas concentraciones, la concentración del anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era de 1,47 g/l; en el caso del cultivo semi-continuo (Ser, Tyr) utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y comprendía cantidades aumentadas de serina y tirosina a altas concentraciones, la concentración del anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era de 1,41 g/l; y en el caso del cultivo semi-continuo (Cys, Tyr) utilizando el medio semi-continuo que tenía un pH bajo y comprendía cantidades aumentadas de cisteína y tirosina, la concentración del anticuerpo que se obtuvo como resultado del cultivo de 14 días era de 1,18 g/l. Los resultados sugieren que las altas concentraciones de serina, cisteína y tirosina contribuían en este orden a la producción de anticuerpos con un alto rendimiento. Los resultados también sugieren que la adición de altas concentraciones de serina, cisteína, y tirosina juntas en el medio semi-continuo en el mismo caso contribuía más significativamente a la producción de anticuerpos con un alto rendimiento.

Las Figuras 8 y 9 muestran las transiciones de las concentraciones de serina y tirosina durante el periodo de cultivo de 14 días. En el control, la concentración de serina era de 0,63 mM y la concentración de tirosina era de 0,34 mM el quinto día, y la concentración de serina era de 0,4 mM o menor y la concentración de tirosina era de 0,4 mM o menor a partir del séptimo día de cultivo. Por otra parte, la concentración de serina se mantuvo a 2 mM o más alta en el cultivo utilizando el medio semi-continuo suplementado con serina, y la concentración de tirosina se mantuvo a 1 mM o más alta en el cultivo utilizando el medio semi-continuo suplementado con tirosina.

Los siguientes Ejemplos de Referencia describen la preparación de las cepas de células CHO transformadas con un gen transportador de taurina que producen IgG humanizada que se utilizaron en los Ejemplos 2 y 3 descritos anteriormente.

#### **Ejemplo de referencia 1. Clonación de un gen transportador de taurina de hámster derivado de células CHO**

Se extrajo el ARN total de las células que producían un anticuerpo anti-receptor de la IL-6 (documento JP H08-99902A), que se obtuvo transformando un gen de anticuerpo anti-receptor de la IL-6 en células CHO DXB11. A continuación, se sintetizó el ADNc dependiente de políA. Se obtuvo un gen transportador de taurina de hámster (TauT de hámster) por PCR utilizando una matriz fragmentada de ADNc por tres tipos de enzimas de restricción, Sall, XhoI, y EcoRI. Se diseñaron y utilizaron cebadores de PCR que contenían secuencias conservadas 5', 3' que son comunes entre los TauT de rata/ratón. Tras determinar la secuencia de nucleótidos del gen clonado, se confirmó que el gen codificaba el TauT de ratón, basándose en la homología con TauT conocidos de otras especies biológicas (Figura 10). La secuencia de aminoácidos del TauT de ratón era altamente homogénea con la del ratón (96 % de identidad), rata (96 % de identidad), y humana (93 % de identidad); por lo tanto, se especuló que el TauT de hámster era un transportador que tenía 12 dominios transmembrana (Figura 11).

#### **Ejemplo de referencia 2. Preparación de cepas de células CHO en las que se introduce el gen transportador de taurina**

Se construyó un plásmido de expresión pHyg/TauT (Figura 12) con un promotor CMV añadiendo una secuencia Kozak al gen TauT de hámster (de aquí en adelante "TauT") obtenido por la clonación del Ejemplo de referencia 1. Las células CHO que expresaban el anticuerpo anti-glicano-3, como la cepa parental, (referirse al documento WO 2006/006693), se transformaron por electroporación con el plásmido pHyg/TauT o un plásmido de control pHyg (400 µg/ml), seguido por la expansión de todas las cepas celulares que presentaban un crecimiento estable (pHyg/TauT: 8 cepas, pHyg: 7 cepas). Después de preparar el ARNm TauT, se llevó a cabo el procedimiento TaqMan para seleccionar 7 cepas que presentaban una expresión superior sobre la cepa parental para obtener células transformadas con pHyg/TauT. Una cantidad media de la expresión de ARNm de las células transformadas (7 cepas) era aproximadamente de 40 veces la del control (7 cepas).

#### **Texto libre del listado de secuencias**

<SEQ ID NO: 1> SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia básica de un gen que codifica un transportador de taurina de hámster.  
<SEQ ID NO: 2> SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos del transportador de taurina de hámster.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

- 5 <120> Método para el cultivo de células utilizando medio de cultivo que contiene aminoácidos en altas concentraciones
- <130> YCT-1347
- 10 <150> JP 2007-117426  
<151> 26-04-2007
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 1869
- <212> ADN
- 20 <213> *Cricetulus griseus*
- <400> 1

```

atggccacca aggagaagct gcagtgtctg aaagacttcc acaaagacat cctgaagcct      60
tctccagggga agagcccagg cacacggcct gaggatgagg ctgaggggaa gccccctcag      120
agggagaagt ggtccagcaa gattgacttt gtgctgtctg tggccggagg cttcgtgggt      180
ttgggcaacg tttggcgttt cccgtacctc tgctacaaaa atgggtggagg tgctttcctc      240
ataccgtatt ttattttctt gtttgggagt ggctgcctg tgttttctt ggaggtcata      300
ataggccagt acacctcaga agggggaatc acctgctggg agaagatctg ccccttgttc      360
tctggcattg gctacgcata catcgtcatt gtgtccctcc tgaatgtgta ctacattgtc      420
atcctggcct gggccacata ctacctattt cactccttcc agacagagct tcctggggcc      480
cactgcaacc acagctggaa cacaccacat tgcattggagg acacctgctg taggaatgag      540
agtctctggg tctcccttag cgctccaac ttcacctcgc ctgtcattga gttctgggag      600
cgcaatgtac tcagcctgtc ttccggaatc gacgaaccag gcgctctgaa atgggacctt      660
gcgctctgcc tcctcttagt ctggcttgtc tgttttttct gcatatggaa ggggtgttca      720
tccacaggca aggttgtcta cttcaccgcc actttcccgt ttgccatgct tctgggtgctg      780
ctggtccgtg gactgacctt gccgggtgct ggcgaaggca tcaaattcta cctgtaccct      840
gacatcagcc gccttgagga cccacagggt tggatcgacg ccggaacca gatattcttt      900
tcctatgcca tctgcctggg ggccatgacc tcaactggaa gctacaacaa gtacaagtat      960
aactcgtaca gggactgtat gctgctggga tgcctgaaca gtggtaccag ttttgtgtct     1020
ggcttcgcag ttttttccat cctgggcttc atggcacaag agcaaggggt ggacattgct     1080
gatgtggctg agtcagggtc tggcttggcc ttcatgtcct atccaaaagc tgtgactatg     1140
atgccgctgc ccaccttttg gtccattctg ttttttatta tgctcctctt gcttggactg     1200

```

ES 2 624 185 T3

gacagccagt ttgttgaagt cgaaggacag atcacatcct tggttgatct ttaccctgcc 1260  
 ttcctaagga agggttatcg tcgggaagtc ttcacgcgca tcctgtgtag catcagctac 1320  
 ctgctggggc tgtcgatggt gacggagggt ggcacgtatg tgtttcaact ctttgactac 1380  
 tatgcagcta gtgggtgatg ccttttgtgg gttgcattct ttgaatggtt tgttattgcc 1440  
 tggatatatg gtgggtgataa cttatatgac ggtattgagg acatgattgg ctatcggcct 1500  
 gggccctgga tgaagtacag ctgggctgtc atcactccag ttctctgtgc tggatgtttc 1560  
 atcttctctc ttgtcaagta tgtaccctg acctacaaca aagtctacgt gtatcctgat 1620  
 tgggcaattg ggctgggctg gggcctggcc ctatcctcca tgggtgtgat ccccttggtc 1680  
 attgccatcc tcctctgccg gacggagga ccggtccgcg tgagaatcca atacctgata 1740  
 acccccaggg agcccaaccg ctgggctgtg gagcgtgagg gggccacacc cttccactcc 1800  
 cgcacaagcc tcgtcatgaa cggcgcactc atgaaacca gtcacgtcat tgtggagacc 1860  
 atgatgtga 1869

<210> 2  
 <211> 622  
 <212> PRT  
 <213> *Cricetulus griseus*

5

<400> 2

Met	Ala	Thr	Lys	Glu	Lys	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Asp	Phe	His	Lys	Asp
1				5					10					15	
Ile	Leu	Lys	Pro	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Gly	Thr	Arg	Pro	Glu	Asp
			20					25					30		
Glu	Ala	Glu	Gly	Lys	Pro	Pro	Gln	Arg	Glu	Lys	Trp	Ser	Ser	Lys	Ile
		35					40					45			
Asp	Phe	Val	Leu	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Phe	Val	Gly	Leu	Gly	Asn	Val
	50					55					60				
Trp	Arg	Phe	Pro	Tyr	Leu	Cys	Tyr	Lys	Asn	Gly	Gly	Gly	Ala	Phe	Leu
65					70					75					80
Ile	Pro	Tyr	Phe	Ile	Phe	Leu	Phe	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Phe	Phe
				85					90					95	
Leu	Glu	Val	Ile	Ile	Gly	Gln	Tyr	Thr	Ser	Glu	Gly	Gly	Ile	Thr	Cys
			100					105					110		

10

# ES 2 624 185 T3

Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Ile  
 115 120 125

Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp  
 130 135 140

Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe His Ser Phe Gln Thr Glu Leu Pro Trp Ala  
 145 150 155 160

His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Leu  
 165 170 175

Arg Arg Asn Glu Ser Leu Trp Val Ser Leu Ser Ala Ser Asn Phe Thr  
 180 185 190

Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Ser  
 195 200 205

Gly Ile Asp Glu Pro Gly Ala Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu  
 210 215 220

Leu Leu Val Trp Leu Val Cys Phe Phe Cys Ile Trp Lys Gly Val Arg  
 225 230 235 240

Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Phe Ala Met  
 245 250 255

Leu Leu Val Leu Leu Val Arg Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Glu  
 260 265 270

Gly Ile Lys Phe Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Ser Arg Leu Glu Asp Pro  
 275 280 285

Gln Val Trp Ile Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe Ser Tyr Ala Ile  
 290 295 300

Cys Leu Gly Ala Met Thr Ser Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr  
 305 310 315 320

Asn Ser Tyr Arg Asp Cys Met Leu Leu Gly Cys Leu Asn Ser Gly Thr  
 325 330 335

Ser Phe Val Ser Gly Phe Ala Val Phe Ser Ile Leu Gly Phe Met Ala  
 340 345 350

Gln Glu Gln Gly Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Glu Ser Gly Pro Gly

# ES 2 624 185 T3

355	360	365
Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Lys Ala Val Thr Met Met Pro Leu Pro 370 375 380		
Thr Phe Trp Ser Ile Leu Phe Phe Ile Met Leu Leu Leu Leu Gly Leu 385 390 395 400		
Asp Ser Gln Phe Val Glu Val Glu Gly Gln Ile Thr Ser Leu Val Asp 405 410 415		
Leu Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu Val Phe Ile 420 425 430		
Ala Ile Leu Cys Ser Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Ser Met Val Thr 435 440 445		
Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser 450 455 460		
Gly Val Cys Leu Leu Trp Val Ala Phe Phe Glu Cys Phe Val Ile Ala 465 470 475 480		
Trp Ile Tyr Gly Gly Asp Asn Leu Tyr Asp Gly Ile Glu Asp Met Ile 485 490 495		
Gly Tyr Arg Pro Gly Pro Trp Met Lys Tyr Ser Trp Ala Val Ile Thr 500 505 510		
Pro Val Leu Cys Ala Gly Cys Phe Ile Phe Ser Leu Val Lys Tyr Val 515 520 525		
Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Val Tyr Val Tyr Pro Asp Trp Ala Ile Gly 530 535 540		
Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Ser Ser Met Val Cys Ile Pro Leu Val 545 550 555 560		
Ile Ala Ile Leu Leu Cys Arg Thr Glu Gly Pro Phe Arg Val Arg Ile 565 570 575		
Gln Tyr Leu Ile Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg 580 585 590		
Glu Gly Ala Thr Pro Phe His Ser Arg Thr Ser Leu Val Met Asn Gly 595 600 605		
Ala Leu Met Lys Pro Ser His Val Ile Val Glu Thr Met Met 610 615 620		

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de cultivo de una célula CHO mediante cultivo semi-continuo, que comprende la adición de un medio semi-continuo que comprende serina, cisteína y tirosina, donde el medio semi-continuo se alimenta en la solución de cultivo en múltiples lotes secuencial o continuamente,  
5 **caracterizado por que** la concentración de serina en la solución de cultivo se mantiene a 2 mM o más alta, y la concentración de tirosina en la solución de cultivo se mantiene a 1 mM o más alta, donde la concentración de serina y tirosina se mantienen durante un periodo desde el cuarto día al décimo día del cultivo y donde la concentración de cisteína en la solución de cultivo puede ser de 0,4 mM o más alta durante una parte de o un periodo de cultivo  
10 completo a partir del tercer día del cultivo,  
donde dicho método se utiliza en un procedimiento que comprende el cultivo de una célula capaz de producir una proteína deseada para obtener la proteína deseada.
2. Un procedimiento de producción de una proteína deseada cultivando una célula CHO, que comprende el cultivo  
15 de una célula CHO utilizando el método de la Reivindicación 1.
3. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 2 donde la célula se transforma con un gen que codifica la proteína deseada.
- 20 4. El procedimiento de la Reivindicación 3, donde la proteína deseada es un anticuerpo.
5. Un procedimiento de preparación de un medicamento que comprende una proteína como principio activo, donde el procedimiento comprende las siguientes etapas,  
25 (i) producir la proteína por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, y  
(ii) mezclar la proteína con un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable donde dicha proteína tiene una propiedad biológica que se puede utilizar como un producto farmacéutico.

Figura 1

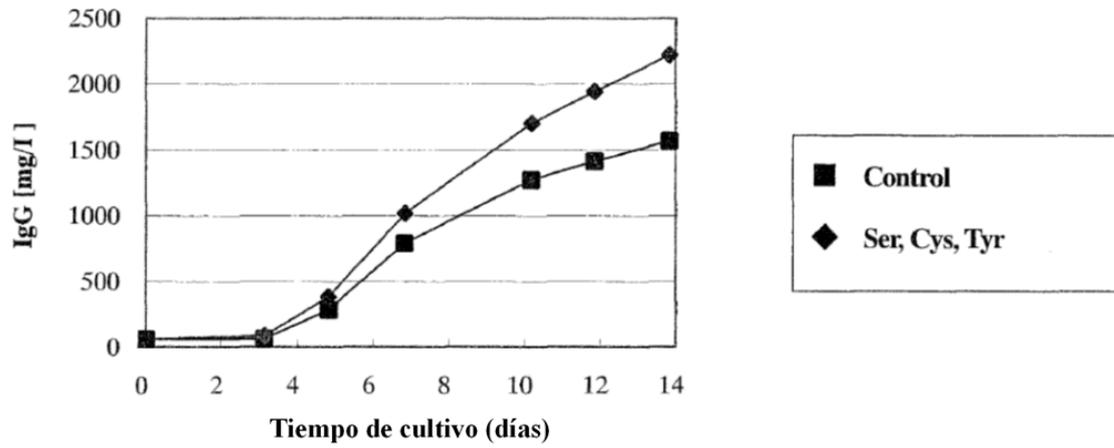


Figura 2

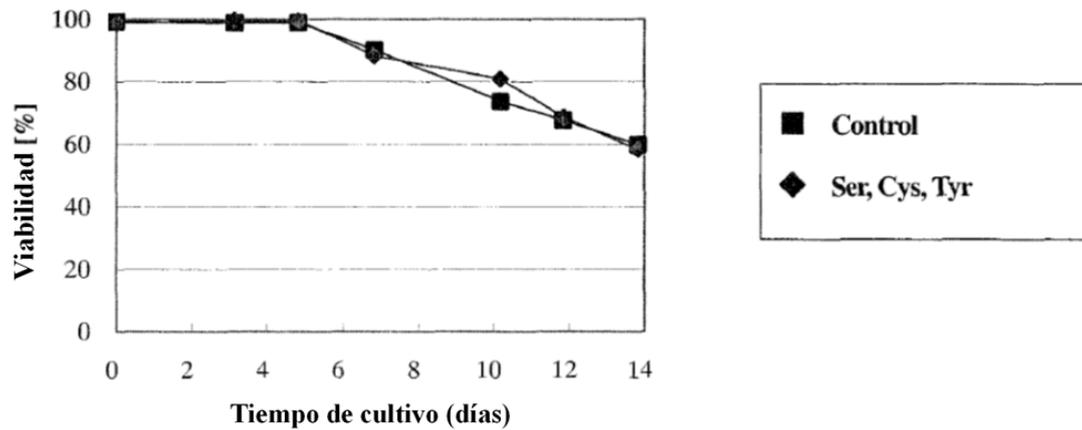


Figura 3

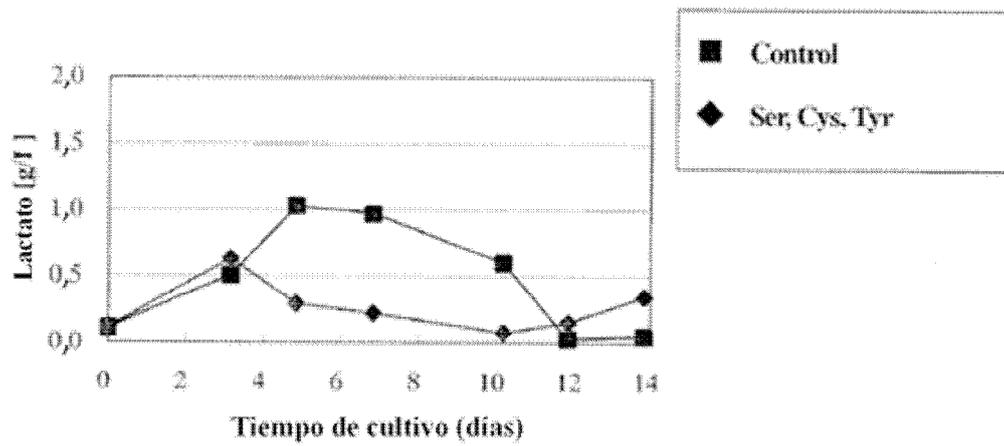


Figura 4

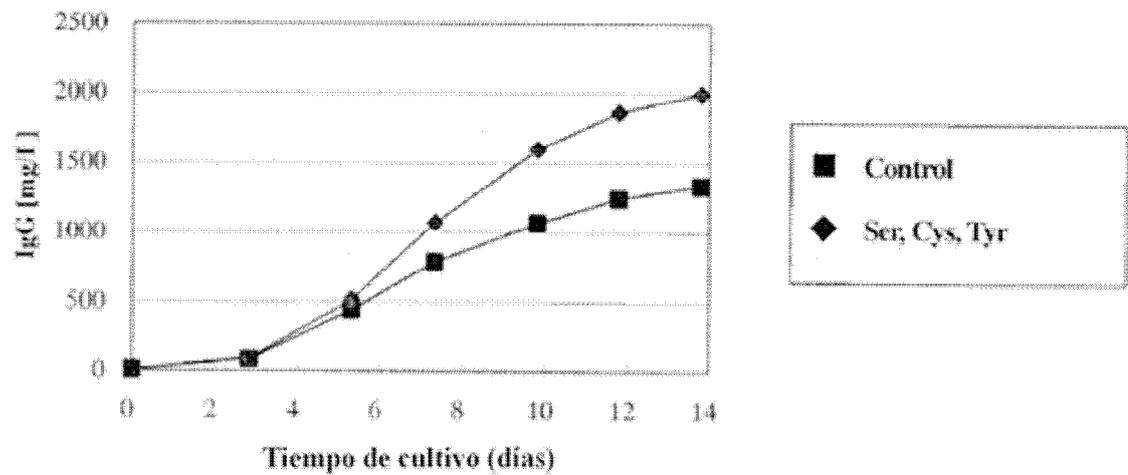


Figura 5

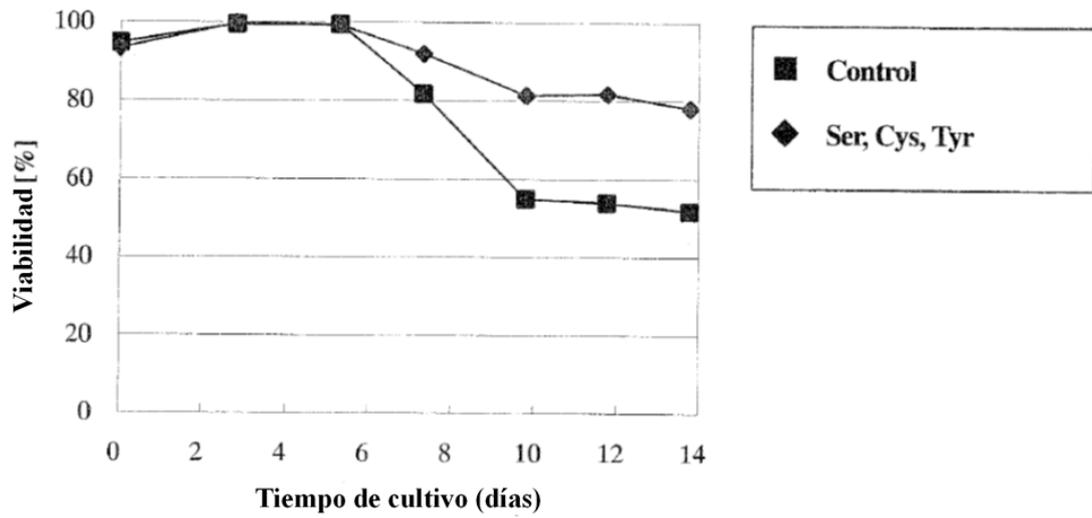


Figura 6

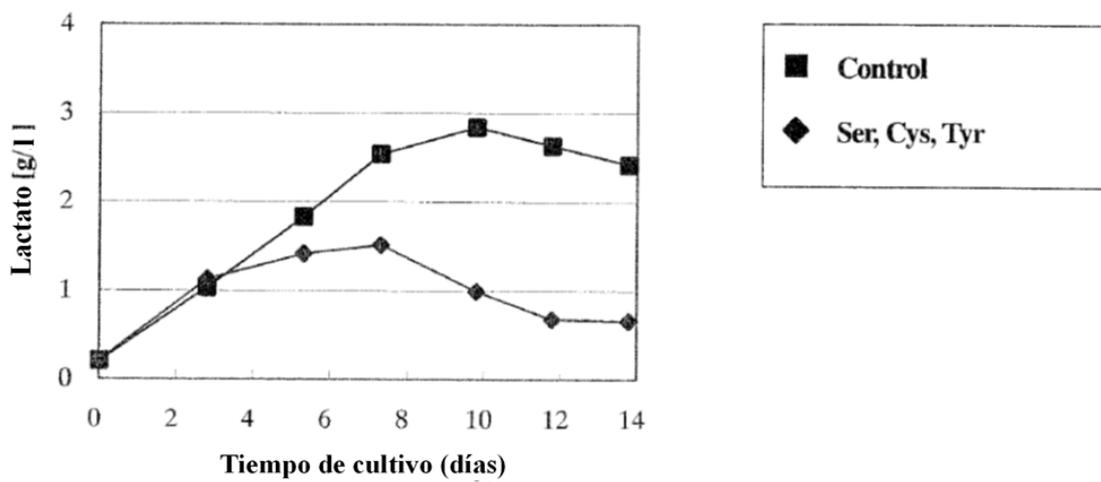


Figura 7

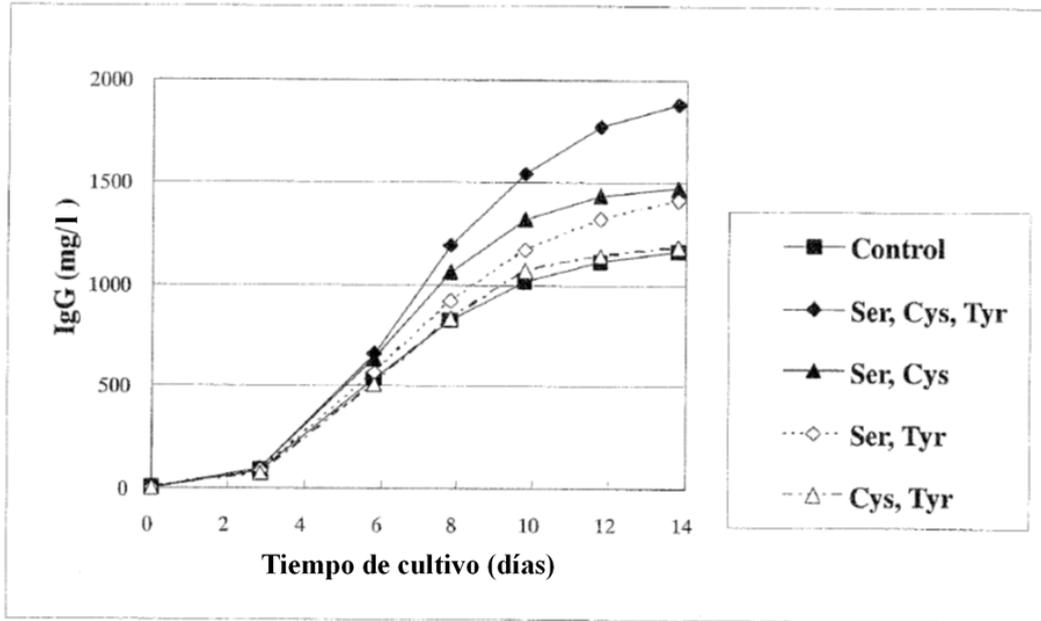


Figura 8

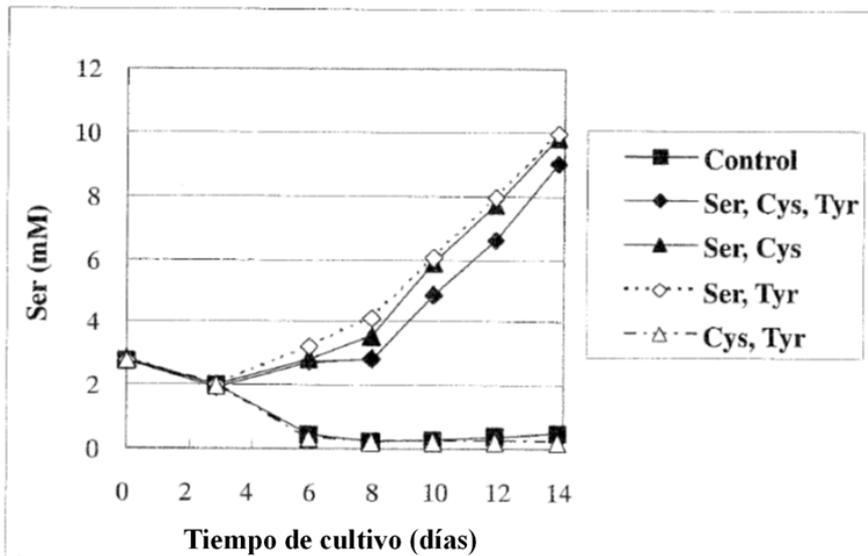




Figura 11

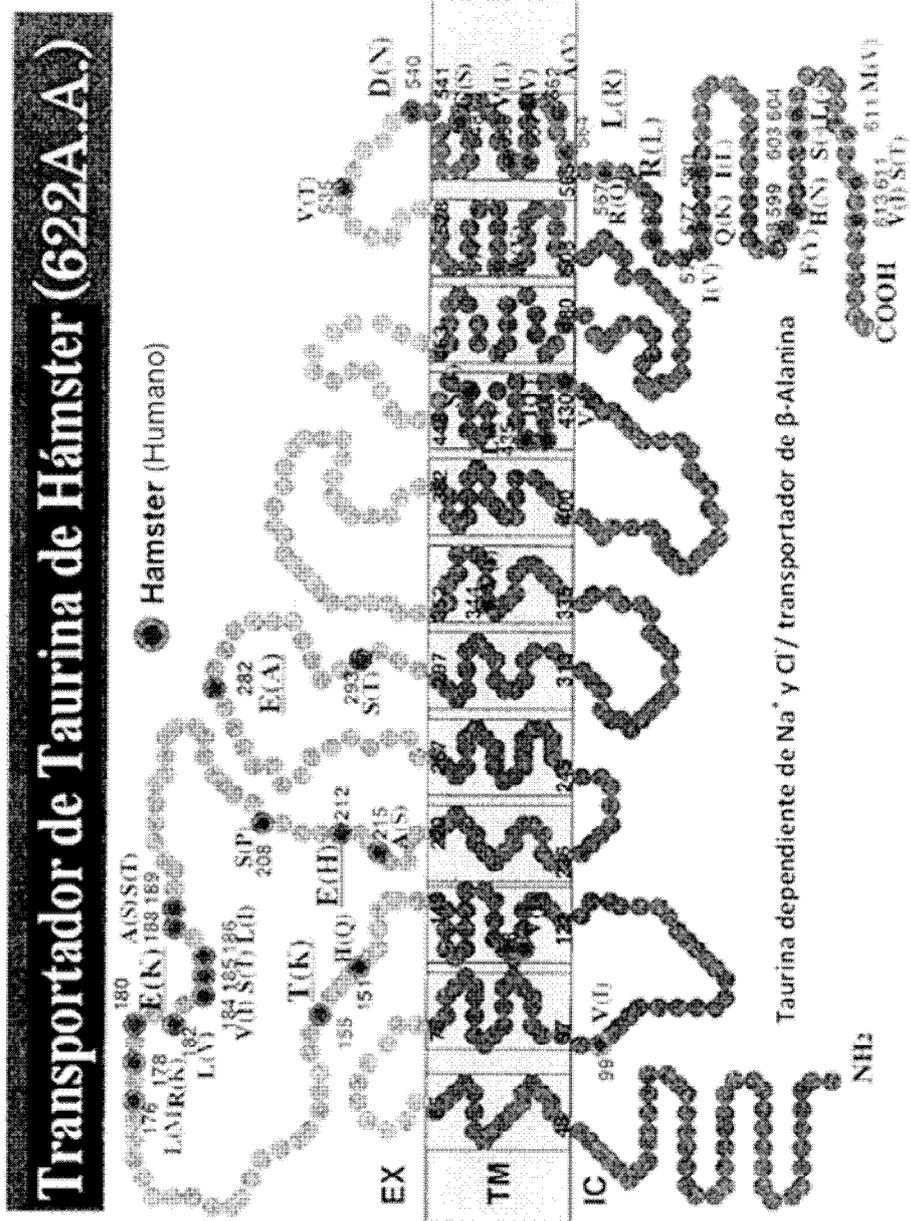


Figura 12

