

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 960**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2013 PCT/US2013/064758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14062535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2013 E 13824043 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2906683**

54 Título: **Procesos de cultivo de células de mamífero para la producción de proteínas**

30 Prioridad:

15.10.2012 US 201261713812 P
09.10.2013 US 201361888647 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TIAN, JUN;
BORYS, MICHAEL;
LI, ZHENGJIAN;
ABUABSI, NICHOLAS;
AU, ANGELA;
QIAN, NAN-XIN y
DAI, XIAO-PING

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 633 960 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

Procesos de cultivo de células de mamífero para la producción de proteínas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para cultivar células CHO que producen un producto proteico. El rendimiento de los procesos de cultivo celular da como resultado una alta viabilidad celular y/o densidad celular y también puede dar como resultado una alta calidad y productividad del producto.

10

Antecedentes de la invención

Preferentemente se usan cultivos de células animales, principalmente el cultivo de células de mamífero, para la expresión de proteínas producidas de forma recombinante para aplicaciones terapéuticas y/o profilácticas.

15

En general, los niveles de expresión proteica en sistemas basados en cultivo de células de mamífero son considerablemente menores que en sistemas de expresión microbiana, por ejemplo, sistemas de expresión en bacterias o en levaduras. Sin embargo, las células bacterianas y de levadura tienen una capacidad limitada para expresar óptimamente productos proteicos de alto peso molecular, para plegar adecuadamente una proteína que tiene una estructura estérica compleja y/o para proporcionar las modificaciones postraduccionales necesarias para madurar una glucoproteína expresada, de modo que afecta a la inmunogenicidad y a la tasa de eliminación del producto.

20

Como consecuencia de las limitaciones del cultivo de células animales o de mamífero, particularmente de células animales o de mamífero que producen productos recombinantes, se ha investigado la manipulación de diversos parámetros, incluidos el empleo de vasos de cultivo a gran escala; alterando 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 aditivos del medio; e incrementando la densidad de las células cultivadas. Además, el desarrollo de un procedimiento para cultivos de células de mamífero se beneficiaría de los avances en la capacidad de extender los tiempos de recorrido para incrementar la concentración del producto final al tiempo que se mantiene una elevada calidad del producto. Los tiempos de ciclo de los procedimientos de los cultivos celulares, en particular los procedimientos no continuos, normalmente están limitados mediante la restante viabilidad de las células, que habitualmente disminuye con el tiempo del ciclo. Por tanto, se desea la máxima extensión posible de viabilidades celulares elevadas al tiempo que se mantiene la calidad del producto. Los problemas de la purificación de proteínas ofrecen otra motivación más para minimizar las disminuciones de la densidad de células viables y mantener una viabilidad celular elevada. La presencia de restos celulares y el contenido en células muertas en el cultivo pueden afectar de forma negativa a la capacidad de aislar y/o purificar el producto proteico al final del recorrido del cultivo. Manteniendo las células viables durante un mayor periodo de tiempo en cultivo, se produce una reducción concomitante de la contaminación del medio de cultivo por las proteínas y enzimas celulares, que pueden producir una degradación y, en último término, la reducción de la calidad de la proteína deseada producida por las células.

25

30

35

40

Se han investigado varios parámetros para conseguir una elevada viabilidad celular en los cultivos celulares. Un parámetro implicó una única disminución de la temperatura del cultivo tras el cultivo inicial a 37 °C (por ejemplo, Roessler et al., *Enzyme and Microbial Technology*, 18:423-427 (1996); las patentes de Estados Unidos n.º 5.705.364 y 5.721.121 de Etcheverry, T. et al. (1998); la patente de Estados Unidos n.º 5.976.833 de Furukawa, K. et al. (1999); la patente de Estados Unidos n.º 5.851.800 de Adamson, L. et al.; los documentos WO 99/61650 y WO 00/65070 de Genentech, Inc.; el documento WO 00/36092 de Biogen, Inc.; y la patente de Estados Unidos n.º 4.357.422 de Girard et al.).

45

50

Otros parámetros investigados implicaron la adición de componentes al cultivo. Se encontró que la adición de sulfato de dextrano y polivinilsulfato a la línea celular CHO 111-10PF aumentaba la viabilidad y la densidad de las células el día 3 con relación al cultivo del control (Zhang et al., *Biotechnol. Prog.*, 16:319-325 (2000)). No obstante no se notificó el efecto del sulfato de dextrano o del polivinilsulfato durante la fase de muerte. También se informó de que el sulfato de dextrano y el polivinilsulfato eran eficaces en la prevención de la agregación celular.

55

La terapéutica de las proteínas es inherentemente heterogénea debido a su tamaño, complejidad de la estructura y naturaleza de la producción biológica (Chirino et al., *Nat. Biotechnol.*, 22:1383-1391 (2004)). Incluso en la solución de proteína "pura", habrá algún porcentaje de fragmentos de bajo peso molecular, especies de alto peso molecular y diversos grados de modificaciones químicas. La formación de especies de alto peso molecular se debe generalmente a la agregación de proteínas, que es un problema habitual que se encuentra durante la fabricación de productos biológicos. Normalmente, se considera que la presencia de agregados es indeseable debido a la preocupación de que los agregados pueden conducir a una reacción inmunogénica o pueden producir efectos adversos en la administración (Cromwell et al., *AAPSJ.*, 8:E572-E579 (2006)). Aunque algunos tipos de agregados de productos biológicos pueden funcionar normalmente, sigue siendo importante mantener la consistencia de la calidad del producto, ya que la consistencia del producto es un requisito previo para la aprobación regulatoria.

60

65

Los agregados de proteínas pueden surgir de varios mecanismos y se producen en cada etapa durante el proceso de fabricación. En el cultivo celular, las proteínas secretadas pueden estar expuestas a las condiciones que son desfavorables para la estabilidad de la proteína; pero, con mayor frecuencia, la acumulación de altas cantidades de proteína puede conducir a la agregación intracelular debido a las interacciones de moléculas de proteínas no plegadas o al reconocimiento ineficiente de la cadena peptídica naciente por chaperonas moleculares responsables del plegamiento adecuado (Cromwell et al., AAPS J., 8:E572-E579 (2006)). En el retículo endoplásmico (RE) de las células, el enlace disulfuro de la proteína recién sintetizada se forma en un entorno oxidativo. En condiciones normales, los sulfhidrilos proteicos se oxidan de forma reversible a disulfuros de proteínas y ácidos sulfénicos, pero los estados más altamente oxidados, tales como las formas de ácido sulfínico y sulfónico de las cisteínas de las proteínas son irreversibles (Thomas et al., Exp. Gerontol., 36:1519-1526 (2001)). Las proteínas hiperoxidadas pueden contener enlaces disulfuro incorrectos o tienen enlaces disulfuro mixtos con otras proteínas lumenales del RE; En ambos casos conduce a un plegamiento y agregación inadecuados de las proteínas. Por lo tanto, es crucial mantener un ambiente oxidativo controlado adecuadamente en el RE. A este respecto, Cuozzo et al. (Nat. Cell Biol., 1:130-135 (1999)) demostraron inicialmente que en las levaduras, el glutatión se tamponó contra la hiperoxidación del RE y más tarde en Chakravarthi et al. (J. Biol. Chem., 279:39872-39879 (2004)) confirmaron que, en las células de mamífero, también se requería glutatión para regular la formación de enlaces disulfuro nativos dentro de las proteínas que entran en la vía secretora. Se ha descrito que la temperatura del cultivo modula la agregación de un anticuerpo recombinante en células CHO (Gomez et al. (Biotechnol. Bioeng. 109:125-136 (2012))

Con el aumento de la concentración del producto en el cultivo, se puede observar en procesos de cultivo celular que la calidad del producto disminuye. La abundancia elevada de una proteína producida por las células en cultivo, óptimamente se acompaña de una calidad elevada de la proteína que, en último término, se recupera para un uso previsto.

Los productos proteicos producidos de forma recombinante se están convirtiendo cada vez más en importantes médica y clínicamente para usar como terapéuticas, tratamientos y profilácticos. Por lo tanto, el desarrollo de procedimientos de cultivo celular fiables que alcanza económica y eficientemente una mayor concentración del producto proteico final, junto con un nivel elevado de la calidad del producto, cumple un objetivo tanto deseado como necesario en la materia.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de disminución de la agregación de una proteína de interés durante la fase de producción del cultivo celular en células CHO, que comprende adaptar células CHO que expresan la proteína de interés a los medios sin factor de crecimiento, proteínas y péptidos; y cultivar las células CHO adaptadas en los medios sin factor de crecimiento, proteínas y péptidos. Por consiguiente, en el presente documento se dan a conocer nuevos procedimientos para la producción de proteínas por cultivos de células CHO. Estos nuevos procesos logran una mayor densidad de células viables, viabilidad celular, productividad y disminución de la agregación de proteínas.

Un aspecto de la divulgación se refiere al crecimiento de células en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido durante todo el proceso de cultivo. En este aspecto, los procedimientos de cultivo celular de esta divulgación pueden conseguir ventajosamente una productividad específica mejorada de la proteína producida por las células cultivadas. Más específicamente, de acuerdo con la presente divulgación, el medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido libre utilizado durante el período de cultivo celular sostiene una alta viabilidad celular de las células en el cultivo y puede proporcionar una alta cantidad y calidad del producto producido a lo largo de todo un ciclo. Asimismo, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, el medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido utilizado durante los procedimientos de cultivo puede permitir, ventajosamente, una extensión de la fase de producción del cultivo. Durante la fase de producción, aumenta el título del producto deseado; la calidad del producto se mantiene a un nivel alto; el nivel de agregación de proteínas se mantiene a un nivel menor y la viabilidad celular también se mantiene a un nivel alto. Además, la fase de producción extendida asociada con los procedimientos de cultivo permite la producción de producto más allá de lo que se produce durante una fase de producción estándar.

Otro aspecto de esta divulgación se refiere a la adición de uno o más factores de crecimiento al cultivo celular sin factor de crecimiento/proteína/péptido después de la inoculación. De acuerdo con la presente divulgación, la adición de uno o más factores de crecimiento al medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido libre después de la inoculación sostiene una alta viabilidad celular de las células en el cultivo y puede proporcionar una alta cantidad y calidad del producto producido a lo largo de todo un ciclo. Durante la fase de producción del cultivo celular de alimentación del factor de crecimiento, aumenta el título del producto deseado; la calidad del producto se mantiene a un nivel alto; el nivel de agregación de proteínas se mantiene a un nivel menor y la viabilidad celular también se mantiene a un nivel alto.

En un aspecto particular, la presente divulgación proporciona un procedimiento (o método) en el que el nivel de agregación de proteínas se redujo mediante la adición de insulina y/o IGF en el medio alimentado. De acuerdo con este aspecto particular, la adición de insulina y/o IGF sostiene una alta viabilidad celular del cultivo, de este modo, el

título de producto, preferentemente el producto recombinante, se incrementa y la calidad del producto se mantiene un nivel alto.

En un aspecto de esta divulgación, se añade uno o más factores de crecimiento a un cultivo en el momento de la inoculación o en un momento después de la inoculación que es antes del comienzo de la fase inicial de la muerte o que es durante la fase de crecimiento inicial o que es durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial o que es al final, o aproximadamente al final, de la fase de crecimiento inicial. De acuerdo con este aspecto de la divulgación, la fase de crecimiento se extiende y/o el inicio de la fase de muerte se retrasa un periodo de tiempo, tal como varios días.

Otros aspectos, características y ventajas de la presente invención se apreciarán tras leer la descripción detallada de la invención y considerar los dibujos/figuras.

Descripción de los dibujos/figuras

La **Figura 1A y 1B** muestra la adaptación de las células CHO (**Clon A**) al crecimiento en medio sin factores de crecimiento (GF). Como se describe en el Ejemplo 1, las células se pasaron cada 3 o 4 días en medio con factores de crecimiento (barra sólida; GF) o sin (barra vacía; sin GF) (GF). (A) Viabilidad celular y (B) tiempo de duplicación en diferentes etapas de adaptación. Temprana: pases 1 a 4; Media: pases 5 a 8; Tardía: pases 9 a 12.

La **Figura 2** muestra la densidad de células viables (VCD), el porcentaje de viabilidad y el tiempo de duplicación para el **Clon B**. La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originalmente a partir de células parentales DG44 y se cultivó en un medio basal sin factor de crecimiento/proteína/péptido (sin GF) o medio basal con la insulina del factor de crecimiento (GF), tal como se describe en el ejemplo 1.

La **Figura 3** muestra el cambio en la expresión/fosforilación de proteínas de la vía mTOR cuando las células del **Clon A** se cultivan con (INS) y sin insulina (INS-F), tal como se describe en el ejemplo 2.

La **Figura 4A-D** muestra la densidad de células viables (VCD), el porcentaje de viabilidad, el título de la proteína aCD40L, el porcentaje de monómero aCD40L para el **Clon A** cultivado en medio basal con 1 mg/l de insulina y 10 mg/l en el medio de alimentación (INS) o sin insulina en el medio basal o de alimentación (sin INS) como se describe en el Ejemplo 3.

La **Figura 5A-D** muestra células sin GF y con GF a diferentes edades o duplicaciones de la población evaluadas usando un enfoque de cultivo discontinuo con alimentación del Clon A. Se compararon los factores, incluyendo la densidad de células viables máxima (A), la viabilidad final (B), el título de proteína normalizado (C) y la productividad específica normalizada (D) para los cultivos discontinuos alimentados como se describe en el Ejemplo 3. Obsérvese que las células sin GF mantenían los factores relativamente estables comparándolos con los de las células GF.

La **Figura 6A-D** muestra que el cultivo sin GF mejoraba la viabilidad final y el título proteico y reducía las especies de alto peso molecular para el Clon B. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (GF). Las células sin GF y con GF se cultivaron en modo discontinuo con alimentación siguiendo el mismo proceso que el descrito en el Ejemplo 3. Tanto el medio basal como el medio de alimentación utilizados se definieron químicamente. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final y (C) título normalizado de proteínas el día 14 para el procedimiento de cultivo discontinuo con alimentación. (D) especie de alto peso molecular (HMW) total para la proteína producida por células sin GF y con GF al final del cultivo (día 14).

La **Figura 7A-C** muestra que el cultivo sin GF mejoraba el crecimiento celular, la viabilidad final y el título proteico para el **Clon C**. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (GF). Las células sin GF y con GF se cultivaron en modo discontinuo con alimentación siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 3. El medio utilizado para el cultivo se definió químicamente. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final y (C) título normalizado de proteínas para el procedimiento de cultivo discontinuo.

La **Figura 8A-D** muestra que el cultivo sin GF mejoraba la viabilidad final y reducía las especies de alto peso molecular para el **Clon D**. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (GF). Las células sin GF y con GF se cultivaron en modo discontinuo con alimentación siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el Ejemplo 3. Tanto el medio basal como el medio de alimentación utilizados se definieron químicamente. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final y (C) título normalizado de proteínas el día 14 para el procedimiento de cultivo discontinuo con alimentación. (D) especie de alto peso molecular (HMW) total para la proteína producida por células sin GF y con GF al final del cultivo (día 14).

La **Figura 9A-D** muestra que la adición de GF al cultivo sin GF mejoraba el crecimiento celular, la viabilidad final y el título proteico para el **Clon B**. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (GF). Las células sin GF y con GF se cultivaron en modo discontinuo con alimentación en medio basal y de alimentación químicamente definido con o sin GF como se describe en el Ejemplo 4. Sin GF: no había GF presente en el medio de cultivo celular; Sin GF + INS: células sin GF cultivadas en medio basal con 1 mg/ml de insulina y en medio de

alimentación con 10 mg/ml de insulina; de un modo similar, Sin GF + LR3: 4 µg/l de LONG@R3 (LR3) en medio basal y 40 µg/l de LR3 en medio de alimentación; GF: 1 mg/l de insulina en medio basal y 10 mg/l de insulina en medio de alimentación; GF + LR3: 1 mg/l de insulina y 4 µg/l de LR3 en medio basal y 10 mg/l de insulina y 40 µg/l de LR3 en medio de alimentación. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final (C) título normalizado de proteínas para las células cultivadas en modo discontinuo con alimentación en las condiciones mencionadas anteriormente. (D) especie de alto peso molecular (HMW) total para la proteína producida en las condiciones indicadas al final del cultivo (día 14).

La **Figura 10A-C** muestra que la adición de GF al cultivo sin GF mejoraba el crecimiento celular, la viabilidad final y el título proteico para el **Clon C**. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (GF). Las células sin GF y con GF se cultivaron en modo discontinuo con alimentación en medio basal y de alimentación químicamente definido con o sin GF como se describe en el Ejemplo 4. Sin GF + INS: células sin GF cultivadas en medio basal con 1 mg/ml de insulina y en medio de alimentación con 10 mg/ml de insulina; de un modo similar, Sin GF + INS+ LR3: 1 mg/l de insulina y 4 µg/l de LR3 en medio basal y 10 mg/l de insulina y 40 µg/l de LR3 en medio de alimentación; GF + INS + LR3: Células GF cultivadas en presencia de 1 mg/l de insulina y 4 µg/l de LR3 en medio basal y 10 mg/l de insulina y 40 µg/l de LR3 en medio de alimentación. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final (C) título normalizado de proteínas para las células cultivadas en modo discontinuo con alimentación en las condiciones mencionadas anteriormente.

La **Figura 11A-C** muestra que la adición de GF suplementario a los cultivos con menor concentración de GF mejoraba la viabilidad final y mantenía el crecimiento celular y el título proteico para el **Clon C**. Las células adaptadas al crecimiento en medio con menor concentración de insulina (0,01 mg/l; INS baja) tenían un número de pase similar al de las células siempre cultivadas en el mismo medio con mayor concentración de insulina (1 mg/l; INS alta). Usando el mismo procedimiento discontinuo con alimentación que se describe en el ejemplo 4, las células con INS baja se cultivaron en medio basal con 0,01 mg/l de insulina y en medio de alimentación con 10 mg/ml de insulina; las células con INS alta se cultivaron en medio basal con 1 mg/l de insulina y en medio de alimentación con 10 mg/ml de insulina. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final y (C) título normalizado de proteínas el día 14 para las células cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

La **Figura 12A-C** muestra que la adición de GF suplementario al cultivo sin GF mejoraba la viabilidad final y el título de proteínas para el **Clon D**. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (1 mg/l; GF). Las células sin GF y con GF se cultivaron en modo discontinuo con alimentación en medio basal y de alimentación químicamente definido con o sin GF como se describe en el Ejemplo 4. Sin GF + INS+ LR3: células sin GF cultivadas en medio basal sin GF y en medio de alimentación con 10 mg/ml de insulina y 40 µg/l de LONG@R3 (LR3); de un modo similar, GF + INS + LR3: células GF cultivadas en presencia de 1 mg/l de insulina en medio basal y 10 mg/l de insulina y 40 µg/l de LR3 en medio de alimentación. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final y (C) título normalizado de proteínas el día 14 para las células cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

La **Figura 13A-D** muestra que la estrategia de adición de GF suplementario minimiza la concentración de GF requerida para un rendimiento similar del procedimiento. Las células del **Clon B** adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (1 mg/l; GF) tal como se describe en el ejemplo 4. Con el mismo procedimiento se cultivaron las células sin GF en un modo discontinuo con alimentación en un medio basal químicamente definido con concentraciones diferentes de insulina: 0 mg/l (sin GF), 0,002 mg/l (sin GF + 2 µg/l), 0,1 mg/l (sin GF +100 µg/l) o 1 mg/l (sin GF + 1000 µg/l). Las células GF se cultivaron en medio basal con 1 mg/ml de insulina. La concentración de insulina en el medio de alimentación es 10 veces la del medio basal para las condiciones correspondientes. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final, (C) título normalizado de proteínas el día 14 y (D) productividad específica normalizada (Qp) para las células cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

La **Figura 14A-D** muestra que se pueden añadir diferentes GF suplementarios a los cultivos sin GF para impulsar el crecimiento celular y el título de proteínas. Las células de **Clon B** se adaptaron para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF), como se describe en el ejemplo 4. Las células sin GF adaptadas se cultivaron en un modo discontinuo con alimentación en medios basales y de alimentación definidos químicamente sin (sin GF) o con diferentes GF a 4 µg/l. bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos; PDGF-bb: factor de crecimiento derivado de plaquetas, dos cadenas B; INS: insulina; LR3: LONG@R3, un análogo de IGF1 recombinante. La concentración de GF en el medio de alimentación es 5 veces la del medio basal para las condiciones correspondientes. (A) densidad máxima de células viables (VCD máxima), (B) viabilidad celular final, (C) título normalizado de proteínas el día 14 y (D) productividad específica normalizada (Qp) para las células cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente.

La **Figura 15A-B** muestra que la estrategia de la adición de GF suplementario mejoraba la solidez del procedimiento para el **Clon C**. Las células adaptadas para crecer en medio sin factores de crecimiento (sin GF) tenían un número de pase similar al de las células siempre expuestas a la insulina (1 mg/l; GF). Las células sin GF y con INS se cultivaron en modo discontinuo con alimentación en medio basal y de alimentación químicamente definidos como se describe en el Ejemplo 4. El medio basal para las células sin GF carecía de GF y para las células INS contenía 1 mg/ml de insulina. Se aplicaron diferentes volúmenes de alimentación para cada condición a diario comenzando el día 3: FV1: volumen de alimentación (FV) a 3,6 %; FV2: 4,3 %; y FV3: 5

% de volumen inicial. El medio de alimentación contenía tanto insulina y LR3 para cada condición. Para FV1: la insulina era de 10 mg/l y LR3 de 42 µg/l. La concentración para insulina y LR3 en FV2 y V3 se ajustó de forma que se añadiera la misma cantidad (gramos) de insulina y LR3 al vaso de cultivo, aunque el volumen de alimentación era diferente. (C) título normalizado de proteínas el día 14 y (B) viabilidad final normalizada para las células cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente. Obsérvese que las células sin GF mantenían la viabilidad final y el título de proteínas relativamente estable contra la alteración del procedimiento (incremento del volumen de alimentación).

La **Figura 16** muestra la densidad de células viables (VCD), el porcentaje de viabilidad, el título de la proteína aCD40L, porcentaje de aCD40L de alto peso molecular (HMW) para el **Clon B** cultivadas en un reactor de 5l en el que los factores de crecimiento insulina (INS) y/o LONG®R3 (LR3) suplementarios se añaden a los medios basal y de alimentación después de la inoculación, como se describe en el ejemplo 5.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe nuevos procedimientos para la producción de proteínas, preferentemente productos de proteínas recombinantes, en el cultivo celular de CHO. Estos procedimientos logran una mayor densidad de células viables, viabilidad celular, productividad y disminución de la agregación de proteínas.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) han sido uno de los principales tipos de células utilizadas para la producción de terapéutica recombinante. Para la fabricación a gran escala de tales agentes terapéuticos en células CHO con medios de cultivo celular definidos químicamente, los factores de crecimiento (GF) se usan ampliamente para promover el crecimiento y la productividad de las células. Sin embargo, el uso de factores de crecimiento no solo aumenta significativamente el coste de la fabricación, sino que potencialmente también afecta el rendimiento y la robustez del procedimiento debido a la complicada señalización celular de los factores de crecimiento.

La siguiente tabla describe los clones utilizados para ilustrar la invención. Cada clon es una línea celular CHO con un sistema de selección de DHFR que expresa una proteína de fusión.

	A	B	C	D
Clon	40A6	63C2	D7	Aba
Molécula	proteína de fusión 1	proteína de fusión 1	proteína de fusión 2	proteína de fusión 3
Línea celular	CHO	CHO	CHO	CHO
Sistema de selección	DHFR	DHFR	DHFR	DHFR

Células cultivadas en condiciones de cultivo celular sin factor de crecimiento

Una realización de la invención muestra que la señalización a partir de factores de crecimiento podría eliminarse para el cultivo de células CHO. El Ejemplo 1 muestra que dos clones diferentes de dihidrofolato reductasa (DHFR) que expresan un anticuerpo de fusión de dominio pueden adaptarse a medios sin factor de crecimiento (sin GF) cultivándolos continuamente en los medios hasta nueve pases (véanse las Figuras 1 y 2). De forma interesante, como se muestra en el Ejemplo 2, La vía de mTOR, que regula el crecimiento celular y la producción de proteínas, no se vio afectada de manera significativa por la eliminación del factor de crecimiento, como se muestra mediante matrices de anticuerpos que están dirigidos a 138 proteínas implicadas en la vía de mTOR (véase la figura 3).

Los ensayos de producción de cultivos discontinuo con alimentación descritos en el Ejemplo 3 descubrieron que la condición sin GF incrementaba la densidad de células viables máximas a 15,7 x 10⁶ células/ml desde 13,0 x 10⁶ células/ml para la condición de GF y mejoraba la viabilidad celular en las etapas posteriores del cultivo, desde 59,4 % para la condición de GF a 96,2 % el día 8 y desde 35,6 % a 65,1 % el día 14. Como resultado, el título de proteína se incrementó en un 80,9 %. Además, la calidad de la proteína se mejoró en la condición sin GF a medida que las especies de alto peso molecular disminuyeron a 4,8 % desde 14,3 % para la condición de GF (véase la Figura 4).

Además, las Figuras 5-8 muestran que la estabilidad de la producción de las células se mejoraba en la condición sin GF en tres clones diferentes. La productividad disminuyó después de cultivar las células en la condición de GF, mientras que las células cultivadas en condiciones sin GF mantenían su productividad.

En general, nuestros resultados demuestran que un medio químicamente definido sin proteínas y péptidos es capaz de propagar las células CHO, proporcionando productividades comparables a la condición de GF y manteniendo mejor la estabilidad de la producción de los clones.

Se ha descubierto (véanse las Figuras 4, 6, 7 y 8) que las células en crecimiento en condiciones sin factor de crecimiento aumentan la viabilidad celular en etapas posteriores del cultivo y aumentan el título de proteínas, mientras reducen la agregación de las proteínas de interés.

Por tanto, en el presente documento se divulga un procedimiento de cultivo celular para aumentar la viabilidad celular en etapas posteriores de cultivo que comprenden cultivar células huésped, que expresan una proteína de

interés; en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido, en el que la viabilidad celular de la etapa final aumenta en comparación con la viabilidad celular de la etapa final en las células cultivadas en medio que comprende factor de crecimiento/proteína/péptido.

5 En el presente documento también se divulga un procedimiento de cultivo celular para aumentar la producción de una proteína de interés que comprende cultivar células huésped, que expresan una proteína de interés; en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido, en el que el título de proteínas aumenta en comparación con el título de proteínas en las células cultivadas en medio que comprende factor de crecimiento/proteína/péptido.

10 En el presente documento también se divulga un procedimiento de cultivo celular para reducir el porcentaje de agregación de proteínas que comprende: cultivar células huésped, que expresan una proteína de interés; en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido, en el que el porcentaje de especies de alto peso molecular está disminuido en comparación con el porcentaje de especies de alto peso molecular en células cultivadas en medios que comprenden factor de crecimiento/proteína/péptido.

15 Adición de factor de crecimiento suplementario a las condiciones del cultivo celular sin factor de crecimiento

En una realización, la divulgación se refiere a un procedimiento de cultivo celular que comprende: cultivar células huésped/inóculo, que expresan una proteína de interés, en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido; y añadir uno o más factores de crecimiento al cultivo de células de producción.

20 Un factor de crecimiento es una sustancia de origen natural que es capaz de estimular el crecimiento celular y la diferenciación celular. Por lo general, es una proteína o una hormona esteroide. Los factores de crecimiento son importantes para regular diversos procedimientos celulares. Los factores de crecimiento actúan normalmente como moléculas de señalización para las células. A menudo estimulan la diferenciación y la maduración celular, que varía entre los factores de crecimiento.

25 Los factores de crecimiento incluyen, entre otros, insulina (GIBCO® rHu AOF Insulin, Biocin), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) LONG®EGF, RepliGen Bioprocessing), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (LONGOR31GF-1, RepliGen Bioprocessing), factor de crecimiento transformador alfa (TGF- α) (LONG®TGF - α , RepliGen Bioprocessing), eritropoyetina, esteroides, suero, factor de crecimiento neural (NGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor estimulante de colonias (CSF). Los compuestos son fácilmente disponibles a partir de las fuentes indicadas o fácilmente obtenibles a través de medios conocidos por un experto en la materia.

30 En una realización, entre los factores de crecimiento se incluyen, pero no se limitan a los mismos, insulina y/o factor de crecimiento similar a insulina (IGF).

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

40 En una realización, el factor de crecimiento se añade en un momento después de la inoculación, es decir, no está presente en el medio basal y no está presente en la inoculación. En una realización específica, el compuesto de crecimiento se añade el día 1 del cultivo o más tarde.

45 El factor de crecimiento se puede añadir al cultivo celular una vez, dos veces, tres veces o un número cualquiera de veces durante el periodo de tiempo especificado. Uno o más factores de crecimiento se pueden usar juntos. Es decir, cualquier adición sencilla de un factor de crecimiento incluye la adición de uno o más factores de crecimiento. De manera similar, si hay más de una adición de un factor de crecimiento, se pueden añadir diferentes factores a las diferentes adiciones. Compuestos y sustancias adicionales, incluido el factor de crecimiento, pueden añadirse al cultivo antes, con o después de la adición del factor de crecimiento, durante o no durante el periodo de tiempo especificado. En una realización específica, el factor de crecimiento se añade en un momento después de la inoculación. En otra realización, el factor de crecimiento se añade con el medio de alimentación. En una realización específica, el factor de crecimiento se añade con el medio basal después de la inoculación y con el medio de alimentación. En otra realización específica, se añade un factor de crecimiento.

50 El factor de crecimiento se puede añadir al cultivo celular por cualquier medio. Entre los medios de añadir el factor de crecimiento se incluyen, pero sin limitaciones, disuelto en agua, disuelto en un ácido, disuelto en medio basal, disuelto en medio de alimentación, disuelto en un medio adecuado, en la forma en que se obtiene o cualquier combinación de los mismos.

55 En una realización, la insulina se añade como una solución en la que la insulina se disuelve en HCl 1 M que luego se diluye con agua para uso posterior (es decir, tal como la adición de insulina al medio de alimentación).

60 En una realización, el factor de crecimiento se añade para llevar la concentración en el cultivo a un nivel adecuado. Como ejemplos no limitantes, la insulina se añade para mantener una concentración de 1 μ g/l - 10 mg/l. En otra

realización, la insulina se añade para mantener una concentración de 4 µg/l - 10 mg/l. En aún otra realización, la insulina se añade para mantener una concentración de 40 µg/l - 10 mg/l.

5 En una realización, el factor de crecimiento se añade al medio basal en una cantidad de aproximadamente 1 µg/l a 10 mg/l. En otra realización, el factor de crecimiento se añade al medio basal en una cantidad de aproximadamente 1 µg/l a 1 mg/l. En un ejemplo no limitante, la insulina se puede añadir al medio basal en una cantidad de aproximadamente 2 µg/l a 100 µg/l, la insulina se puede añadir al medio basal en una cantidad de aproximadamente 2 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l o 1 mg/ml. Otros ejemplos no limitantes incluyen, la adición de IGF, bFGF y/o PDGF se pueden añadir al medio basal en una cantidad de aproximadamente 4 µg/l.

10 En una realización, el factor de crecimiento se añade al medio de alimentación en una cantidad de aproximadamente 1 µg/l a 10 mg/l. En otra realización, el factor de crecimiento se añade al medio de alimentación en una cantidad que es de 5 veces a 10 veces la del medio basal. En un ejemplo no limitante, la insulina puede añadirse al medio de alimentación en una cantidad de aproximadamente 10 mg/l y/o el factor de crecimiento similar a la insulina puede añadirse al medio de alimentación en una cantidad de aproximadamente 40 µg/l.

15 El cultivo se puede realizar durante cualquier periodo de tiempo tras la adición del factor de crecimiento. Un experto en la materia puede determinar el tiempo del ciclo de cultivo sobre la base de factores relevantes, tales como la cantidad y la calidad de la proteína recuperable y el nivel de especie celular contaminante (por ejemplo, proteínas y ADN) en el sobrenadante resultantes de la lisis celular, lo que complicará la recuperación de la proteína de interés.

20 En realizaciones concretas del procedimiento de cultivo celular y el procedimiento de incrementar la viabilidad celular, el factor de crecimiento se añade en un momento después de la inoculación, que es antes del comienzo de la fase inicial de muerte. Como alternativa, el factor de crecimiento se añade en un momento después de la inoculación, es decir durante la fase de crecimiento inicial o se añade el factor de crecimiento durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial o se añade el factor de crecimiento al final de la fase de crecimiento inicial.

25 La fase de crecimiento inicial se refiere a la fase de crecimiento que se observa en ausencia de la adición especificada del factor de crecimiento. La fase de crecimiento inicial se refiere a la fase de la muerte que se observa en ausencia de la adición especificada del factor de crecimiento.

30 La fase inicial del crecimiento puede finalizar cuando comienza la fase inicial de la muerte o puede ser una fase estacionaria de cualquier duración entre la fase inicial del crecimiento y la fase inicial de muerte.

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

40 Se ha descubierto (véanse las figuras 9 y 10) que al llevar a cabo el procedimiento divulgado en el presente documento aumenta la viabilidad del cultivo celular. Una condición, tal como la adición del factor de crecimiento, produce un incremento de la viabilidad celular si la viabilidad celular en el cultivo es mayor durante un periodo de tiempo en presencia de la condición que en ausencia de la condición.

45 Por lo tanto, en otras realizaciones, la divulgación se refiere a un procedimiento de cultivo celular de incrementar la viabilidad celular en un cultivo, que comprende: cultivar células huésped, que expresan una proteína de interés, en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido; y añadir factor de crecimiento al cultivo celular; en el que la viabilidad celular del cultivo celular aumenta en comparación con la viabilidad celular final en las células cultivadas en medio que comprende factor de crecimiento/proteína/péptido.

50 Los tiempos de ciclo de los procedimientos de los cultivos celulares, en particular los procedimientos no continuos, normalmente están limitados por la densidad de células viables restante, que disminuye durante la fase de muerte. Los tiempos de ciclo más largos permiten alcanzar títulos de producto más elevados. Los aspectos relacionados con la calidad del producto también ofrecen una motivación para reducir la tasa de muerte, ya que la presencia de restos celulares y el contenido en células muertas en el cultivo pueden afectar de forma negativa a la capacidad para aislar y/o purificar el producto proteico al final del ciclo de cultivo.

55 Se ha descubierto (véanse las figuras 9, 10 y 12) que la viabilidad celular prolongada lograda mediante la realización de los procedimientos divulgados en el presente documento da como resultado un aumento del título proteico.

60 Por lo tanto, en otras realizaciones, la divulgación se refiere a un procedimiento de cultivo celular para incrementar la producción de proteínas en un cultivo, que comprende: cultivar células huésped, que expresan una proteína de interés, en un medio sin factor de crecimiento/proteína/péptido; y añadir factor de crecimiento al cultivo celular; en el que el título de proteínas aumenta en comparación con el título de proteínas de las células cultivadas en medio, que

comprende factor de crecimiento/proteína/péptido.

Técnicas y procedimientos relacionados con la purificación y análisis de glucoproteínas

- 5 En los métodos de cultivo abarcados por la presente invención, normalmente la proteína producida por las células se recolecta, recupera, aísla y/o purifica, o purifica sustancialmente, según se desee, al final de todo el periodo de cultivo celular total usando métodos de aislamiento y purificación, tal como se conocen y practican en la materia. Preferentemente, la proteína secretada por las células cultivadas se aísla del medio de cultivo o del sobrenadante; sin embargo, la proteína también se puede recuperar a partir de las células huésped, *por ejemplo*, lisados celulares,
- 10 usando métodos conocidos.

- De manera ilustrativa, para la recuperación, aislamiento y/o purificación de las proteínas, el medio de cultivo celular o el lisado celular se centrifugan para eliminar partículas celulares y residuos celulares. El producto polipeptídico deseado se aísla o purifica de las proteínas y polipéptidos solubles contaminantes mediante técnicas de purificación
- 15 adecuadas. Los procedimientos siguientes proporcionan ejemplos, aunque no limitantes, de métodos de separación o fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación en etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía en una resina, tal como sílice, o resina de intercambio catiónico, por ejemplo, DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación en sulfato amónico; filtración en gel usando, *por ejemplo*, SEPHADEX® G-75, SEPHAROSE®; cromatografía SEPHAROSE® de proteína A para la eliminación de los contaminantes de
- 20 inmunoglobulina; y similares. Otros aditivos, tales como inhibidores de proteasa (por ejemplo, PMSF o proteinasa K) se pueden usar para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. El experto en la materia entenderá que los procedimientos de purificación para un determinado polipéptido de interés pueden requerir modificaciones que permitan cambios en el polipéptido expresado de forma recombinante en cultivo celular.

25 Células, proteínas y cultivos celulares

- En los métodos o procedimientos de cultivo celular de la presente invención, las células se pueden mantener en diversos medios de cultivo celular, *es decir*, medio de cultivo basal, como se conocen en la materia. Por ejemplo, los métodos se aplican para usar con grandes volúmenes de células mantenidas en el medio de cultivo celular, que se
- 30 pueden suplementar con nutrientes y similares. Normalmente, "medio de cultivo celular definido químicamente" (también denominado "medio definido químicamente") es un término que el experto en la materia entiende y se sabe que hace referencia a una solución nutriente en la que se cultivan las células, preferentemente células animales o de mamífero, y que generalmente proporciona al menos uno o más componentes a partir de los siguientes: una fuente de energía (normalmente en forma de un hidrato de carbono tal como glucosa); todos los aminoácidos esenciales y,
- 35 generalmente, los veinte aminoácidos básicos, más cisteína; vitaminas y/u otros compuestos orgánicos normalmente necesarios a concentraciones bajas; lípidos o ácidos grasos libres, *por ejemplo*, ácido linoleico; y oligoelementos, *por ejemplo*, compuestos inorgánicos o elementos de origen natural que normalmente se requieren a concentraciones muy bajas, normalmente en el rango micromolar. El medio de cultivo celular también se puede suplementar de modo que contenga diversos componentes opcionales, tales como sales, *por ejemplo*, de calcio, magnesio y fosfato, y
- 40 tampones, *por ejemplo*, HEPES; nucleósidos y bases, *por ejemplo*, adenosina, timidina, hipoxantina; antibióticos, *por ejemplo*, gentamicina; y agentes protectores celulares, *por ejemplo*, un poliol PLURONIC® (PLURONIC® F68).

- Una realización de la invención es un procedimiento de cultivo celular que utiliza un medio de cultivo celular definido químicamente que está libre de factores de crecimiento, proteínas y péptidos, *por ejemplo*, insulina, transferrina,
- 45 factor de crecimiento epidérmico, suero, proteínas hidrolizadas, hormonas, bFGF, IGF, PDGF y libre de productos o ingredientes de origen animal.

- Como aprecia el técnico, las células animales o de mamífero se cultivan en un medio adecuado para las células concretas que se están cultivando y que un experto en la materia puede determinar sin experimentación innecesaria.
- 50 Se pueden utilizar medios disponibles comercialmente e incluyen, por ejemplo, medio mínimo esencial (MEM, Sigma, St. Louis, MO); medio F10 de Ham (Sigma); medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma); medio RPMI-1640 (Sigma); medio de cultivo celular HYCLONE® (HyClone, Logan, UT); y medio definido químicamente (CD), que se formulan para tipos de células concretas, *por ejemplo*, medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA). EX-CELL® CD-CHO (SAFC, Saint Louis).

- 55 A los medios de ejemplo anteriores se pueden añadir los componentes o ingredientes complementarios descritos con anterioridad, incluidos componentes opcionales, en concentraciones o cantidades adecuadas, según sea necesario o se desee, y según saben y practican los expertos en la materia de rutina.

- 60 Además, las condiciones de cultivo celular adecuadas para los métodos de la presente invención son aquellas que normalmente se emplean y conocen para el cultivo de células discontinuo, discontinuo con alimentación o de cultivo continuo, prestando atención al pH, *por ejemplo*, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5; oxígeno disuelto (O₂), *por ejemplo*, entre aproximadamente 5-90 % de saturación de aire, y dióxido de carbono (CO₂), agitación y humedad, además de la temperatura. Como ejemplo ilustrativo, aunque no limitante, un medio de cultivo celular
- 65 adecuado para los procedimientos discontinuo con alimentación de la presente invención comprende un medio CD-CHO modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA). También se puede usar un medio de alimentación, tal como medio

eRDF modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA). Una realización de la divulgación utiliza un medio de alimentación que también contiene un factor de crecimiento, *por ejemplo*, insulina.

- 5 Células animales, células de mamífero, células cultivadas, células huésped animales o de mamífero, células huésped, células recombinantes, células huésped recombinantes y similares, son, todos ellos, términos para las células que se pueden cultivar de acuerdo con los procedimientos de esta divulgación. Normalmente, dichas células son líneas celulares obtenidas o derivadas de mamíferos y pueden crecer y sobrevivir cuando se introducen en cultivo monocapa o en cultivo en suspensión en medio que contiene los nutrientes adecuados.
- 10 Se pueden cultivar numerosos tipos de células de acuerdo con los procedimientos de la presente divulgación. Normalmente, las células son células animales o de mamífero que pueden expresar y secretar, o que pueden someterse a ingeniería molecular para expresar y secretar, grandes cantidades de una proteína de interés concreta, al medio de cultivo. Debe entenderse que la proteína producida por una célula huésped puede ser endógena u homóloga de la célula huésped. Como alternativa, la proteína es heteróloga, es *decir*, extraña, a la célula huésped, por ejemplo, una proteína humana producida y secretada por una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO).
- 15 En una realización, las proteínas de mamífero, es *decir*, las obtenidas inicialmente o derivadas de un organismo de mamífero, se consiguen mediante los métodos de la presente invención y son secretadas, preferentemente, por las células en el medio de cultivo.
- 20 Las proteínas de interés pueden incluir proteínas de fusión y polipéptidos, proteínas quiméricas y polipéptidos, así como fragmentos o porciones, o mutantes, variantes, o análogos de cualquiera de las proteínas y polipéptidos antes mencionados anteriormente también se incluyen entre las proteínas, polipéptidos y péptidos adecuados que pueden producirse mediante los métodos de la presente invención.
- 25 Ejemplos no limitantes de células huésped animales o de mamífero adecuadas para alojar, expresar y producir proteínas para el posterior aislamiento y/o purificación incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., Som. Cell Molec. Genet., 12:555-556 (1986); y Kolkekar et al., Biochemistry, 36:10901-10909 (1997)), línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), clon 13 de CHO (GEIMG, Génova, IT), clon B de CHO (GEIMG, Génova, IT), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), células CHO negativas para la dihidrofolato reductasa (CHO-DHFR, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), células dp12.CHO (patente de Estados Unidos n.º 5.721.121) y la línea celular de CHO defectiva en FUT8 (alfa-1,6-fucosiltransferasa), Ms704 (Naoko Yamane-Ohnuki et al., publicado online el 6 de agosto de 2004 en Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20151); células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC® CRL-1651); células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC® CCL-10); células de riñón de mono (CV1, ATCC® CCL-70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC® CRL-1587; VERO, ATCC® CCL-81); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC® CCL-2); células de riñón canino (MDCK, ATCC® CCL-34); células de pulmón humano (W138, ATCC® CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC® CCL-51); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL-1442); células TRI (Mather, Ann. NY Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MCR 5; células FS4. De acuerdo con la invención, las células son células CHO, tal como células CHO-DHFR y células CHO-GS.
- 45 Las células adecuadas para cultivar en los métodos y procedimientos de la presente invención pueden contener en su interior, *por ejemplo*, mediante transformación, transfección, infección o inyección, vectores de expresión (construcciones), tales como plásmidos y similares, que alojan secuencias de codificación, o porciones de las mismas, que codifican las proteínas para la expresión y la producción en el procedimiento de cultivo. Dichos vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Se pueden usar procedimientos bien conocidos y practicados para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican las proteínas y polipéptidos producidos, así como los elementos adecuados de control de la transcripción y la traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY (1989) y en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1989).
- 50 Los elementos control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas, que interactúan con las proteínas de las células huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Tales elementos pueden variar en su concentración y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y de la célula huésped utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles. En los sistemas de células de mamífero, se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Las construcciones para usar en los sistemas de expresión de proteínas están diseñados para contener al menos un promotor, una secuencia potenciadora (opcional para los sistemas de expresión en mamíferos) y otras secuencias
- 60
- 65

necesarias o requeridas para la adecuada transcripción y regulación de la expresión génica (*por ejemplo*, secuencias de iniciación y de terminación de la transcripción, sitios del origen de replicación, secuencias de poliadenilación).

5 Como apreciarán los expertos en la materia, la selección del vector adecuado, *por ejemplo*, el plásmido, componentes para la transcripción, expresión y aislamiento adecuados de las proteínas producidas en los sistemas de expresión eucarióticos (por ejemplo, de mamíferos) es conocida y determinada y practicada de forma rutinaria por los expertos en la técnica. La expresión de proteínas por las células cultivadas de acuerdo con los métodos de la presente invención se puede colocar bajo el control de promotores, tal como promotores virales, *por ejemplo*, de citomegalovirus (CMV), del virus del sarcoma de Rous (RSV), de la fosfoglicerol cinasa (PGK), de la timidina cinasa (TK) o de la α -actina. Además, los promotores regulados confieren capacidad de inducción por compuestos o moléculas concretos. Asimismo, se pueden usar promotores o elementos reguladores específicos del tejido (Swift, G. et al., Cell, 38:639-646 (1984)), en los casos donde sea necesario o se desee.

15 Las construcciones de expresión se pueden introducir en las células mediante diversos métodos de transferencia génica conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, métodos de transfección génica convencionales, tales como co-precipitación en fosfato cálcico, transfección liposomal, microinyección, electroporación e infección o transducción viral. La elección del método está dentro de la competencia del experto en la materia. Será evidente para los expertos en la técnica que uno o más construcciones portadores de secuencias de ADN para la expresión en células se pueden transfectar a las células de modo que los productos de expresión se producirán después y/o se obtendrán de las células.

En un aspecto concreto, se prefieren los sistemas de expresión de mamíferos que contienen secuencias control y reguladoras adecuadas para usar en las células de mamífero que expresan proteínas de la presente invención. Entre las secuencias de control eucarióticas de uso habitual para generar vectores de expresión en mamíferos se incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero, tales como, por ejemplo, el promotor del citomegalovirus (CMV) (vector CDM8) y el vector del virus del sarcoma aviar (ASV), (π LN). Entre otros promotores de uso habitual se incluyen los promotores tempranos y tardíos del virus de simio 40 (SV40) (Fiers et al., Nature, 273:113 (1973)), u otros promotores virales tales como los derivados del poliovirus, el adenovirus 2 y el virus del papiloma bovino. También se puede usar un promotor inducible, tal como hMTII (Karin et al., Nature, 299:797-802 (1982)).

Entre los ejemplos de vectores de expresión adecuados para las células huésped eucarióticas se incluyen, pero sin limitaciones, vectores para células huésped de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene), vectores retrovirales (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pcDNA-3 (Invitrogen), vectores adenovirales; vectores asociados con adenovirus, vectores de baculovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)), o formas modificadas de cualquiera de los anteriores. Los vectores también pueden contener secuencias potenciadores anteriores o posteriores a las secuencias de la región promotora para optimizar la expresión génica.

También se puede usar 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 para permitir su selección en un medio de selección adecuado. Puede usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV TK), (Wigler et al., Cell, 11:223 (1977)), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT), (Szybalska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202 (1992)) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell, 22:817 (1980)), que se pueden emplear en células tk-, hgprt- o aprt- (APRT), respectivamente.

50 La resistencia anti-metabolito también se puede usar como base de la selección para los siguientes ejemplos no limitantes de genes marcadores: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:357 (1980); y O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981)); glutamina sintasa (GS), que confiere resistencia a la metionina sulfoximina; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418 (Clinical Pharmacy, 12:488-505; Wu et al., Biotherapy, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596 (1993); Mulligan, Science, 260:926-932 (1993); Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62:191-121 (1993); TIB TECH, 11(5): 155-215 (May 1993); e higo, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene, 30:147 (1984)). Se pueden aplicar procedimientos habitualmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar los clones de células recombinantes necesarios y dichos procedimientos se describen en, por ejemplo, Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al., eds, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981).

65 Además, los niveles de expresión de una molécula de la proteína pueden aumentarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington, C.R. et al., Capítulo 8: "The use of vectors based on gene amplification

for the expression of cloned genes in mammalian cells", Glover, D.M., ed., DNA Cloning, Vol. 3: A Practical Approach, págs. 163-188, IRL Press Limited, publ. (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa una proteína se puede amplificar, un incremento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada se asocia con el gen codificador de la proteína, la producción de la proteína aumentará de forma concomitante (Crouse et al., Mol. Cell. Biol., 3:257 (1983)).

Los vectores que alojan el ácido nucleico que codifica la glutamina sintasa (GS) o la dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcadores seleccionables se pueden amplificar en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotrexato, respectivamente. Una ventaja de los vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares (por ejemplo, la línea celular del mieloma murino NSO) que son negativas para la glutamina sintasa. Los sistemas de expresión de glutamina sintasa también pueden funcionar en las células que expresan glutamina sintasa (por ejemplo, células de CHO) proporcionando inhibidor adicional para evitar el funcionamiento del gen endógeno.

Los vectores que expresan DHFR como marcador seleccionable incluyen, pero sin limitaciones, el plásmido pSV2-dhfr (Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1:854 (1981)). Los vectores que expresan glutamina sintasa como marcador seleccionable incluyen, pero sin limitaciones, el vector de expresión pEE6 descrito en Stephens et al., Nucl. Acids. Res., 17:7110 (1989). Un sistema de expresión de la glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: WO 87/04462; WO 86/05807; WO 89/01036; WO 89/10404; y WO 91/06657. Además, los vectores de expresión de glutamina sintasa que se pueden usar de acuerdo con la presente invención están disponibles comercialmente en suministradores, incluyendo, por ejemplo, Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH).

Tipos de cultivos celulares

En aras de la comprensión, aunque sin limitaciones, el experto en la materia apreciará que los cultivos celulares y los ciclos de cultivo para la producción de proteínas pueden incluir tres tipos generales; a saber, cultivo continuo, cultivo discontinuo y cultivo discontinuo con alimentación. En un cultivo continuo, por ejemplo, se proporciona a las células suplemento fresco del medio de cultivo (es decir, medio de alimentación) durante el periodo de cultivo, al tiempo que se retira el medio de cultivo a diario y el producto se recolecta, por ejemplo, a diario o de forma continua. En un cultivo continuo, el medio de alimentación se puede añadir a diario y se puede añadir de forma continua, es decir, en forma de goteo o de infusión. Para el cultivo continuo, las células pueden permanecer en cultivo todo el tiempo que se desee, mientras las células permanezcan vivas y se mantengan las condiciones ambientales y de cultivo.

En un cultivo discontinuo, las células se cultivan inicialmente en medio y este medio no se retira, ni se sustituye ni se suplementa, es decir, las células no son "alimentadas" con medio nuevo, ni durante ni antes del final del ciclo de cultivo. El producto deseado se recolecta al final del ciclo de cultivo.

Para los cultivos discontinuos con alimentación, el tiempo del ciclo de cultivo se aumenta suplementando el medio de cultivo con medio fresco durante el ciclo, es decir, las células son "alimentadas" con medio nuevo ("medio de alimentación") durante el periodo de cultivo. Los cultivos discontinuos con alimentación pueden incluir diversos 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 discontinuos con alimentación se pueden alimentar de forma continua con medio de alimentación.

Después, el producto deseado se recolecta al final del ciclo de cultivo/producción.

Una realización de la presente divulgación abarca cultivos celulares discontinuos con alimentación en los que se añaden factores de crecimiento, tales como insulina y/o IGF en un momento después de la inoculación.

De acuerdo con la invención, se puede llevar a cabo el cultivo celular y las células pueden producir proteínas, en condiciones para la producción de proteínas a pequeña o gran escala, usando vasos de cultivo y/o aparatos de cultivo que se emplean convencionalmente para el cultivo de células animales o de mamífero. Tal como apreciarán los expertos en la materia, a escala de laboratorio normalmente se usan placas de cultivo tisular, matraces T y matraces giratorios. Para el cultivo a mayor escala, (por ejemplo, 500 l, 5000 l y similares, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos asignadas conjuntamente 7.541.164 y 7.332.303, y la solicitud de patente de Estados Unidos 2009, 0252749 A1 (n.º de serie 12/086.786), presentada el 19 de diciembre de 2006, incluyendo los procedimientos, aunque no de forma limitativa, un biorreactor de lecho fluidizado, un biorreactor de fibra hueca, cultivo en frasco giratorio o sistemas de biorreactor en tanque con agitación. Los microtransportadores pueden usarse o no con el frasco giratorio o sistemas de biorreactor en tanque con agitación. Los sistemas pueden funcionar en modo discontinuo, continuo o discontinuo con alimentación. De forma adicional, el aparato o sistema de cultivo puede estar o no equipado con un separador celular usando filtros, gravedad, fuerza centrífuga y similares.

Fases del cultivo celular y parámetros asociados

El término "inoculación" se refiere a la adición de células al medio de partida para comenzar el cultivo.

La fase de crecimiento de un cultivo es la fase durante la cual la densidad de células viables en cualquier punto de tiempo es superior a la de cualquier punto de tiempo anterior.

5 La fase estacionaria de un cultivo es la fase durante la cual la densidad de células viables es aproximadamente constante (es decir, dentro de un error de medición) durante un periodo de tiempo de cualquier duración.

10 La fase de muerte de un cultivo es la fase siguiente a la fase de crecimiento o siguiente a la fase de crecimiento y la fase estacionaria, y durante la cual la densidad de células viables en cualquier punto de tiempo es menor que la de cualquier punto de tiempo anterior durante esa fase.

15 En una realización de la invención, el medio de cultivo se suplementa ("alimenta") durante la fase de producción para soportar la producción continua de proteína, particularmente en una fase de producción extendida, y para conseguir cantidades grandes de producto proteico de alta calidad. La alimentación se puede producir a diario o de acuerdo con otros programas para soportar la viabilidad celular y la producción de proteína.

20 El proceso de cultivo de acuerdo con la presente invención puede dar lugar a la supervivencia de más células viables hasta el final del periodo de cultivo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, cuando mayor es el número de células que sobreviven, más células producen el producto deseado. Esto, a su vez, tiene como resultado una cantidad acumulada mayor de un producto deseado al final del procedimiento de cultivo, permaneciendo la velocidad de producción de proteínas por células individuales, *es decir*, la productividad específica celular, igual. La productividad específica celular o la velocidad específica de las células, tal como se conoce en la materia, normalmente se refiere a la velocidad específica de expresión del producto producido por la célula o por medida de la masa o volumen celular. La productividad específica celular se mide en gramos de proteína producida por célula al día, por ejemplo, y se puede medir de acuerdo con un método integral que implica las fórmulas siguientes:

$$dP/dt = q_p X, \quad \int_0^t X dt$$

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

30 en la que q_p es la constante de productividad celular específica; X es el número de células o el volumen celular o los equivalentes de masa celular; y dP/dt es la velocidad de la producción de proteína. Por lo tanto, q_p se puede obtener a partir de un gráfico de la concentración del producto frente a la integral del tiempo de las células viables ($\int_0^t X dt$ "días de células viables"). De acuerdo con esta fórmula, cuando la cantidad del producto proteico producido se representa frente a los días de células viables, la pendiente es equivalente a la velocidad celular específica. Las células viables se pueden determinar mediante varias medidas, por ejemplo, biomasa, tasa de captación de O_2 , lactato deshidrogenasa (LDH), hematocrito o turbidez. (*por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.705.364 de Etcheverry, T. et al.)

40 Producción de una proteína de fusión aCD40L mediante los métodos de cultivo de la presente invención

En otras realizaciones abarcadas por la presente invención, los métodos de cultivo celular de la invención se utilizan para producir una proteína de fusión aCTLA4 soluble, como se ilustra en el **Clon A** y el **Clon B** descritos en el presente documento.

45 La aCD40L soluble es un polipéptido anticuerpo que se une específicamente a CD40L humano. El polipéptido de anticuerpo es un anticuerpo de dominio (dAbs) que comprende un dominio variable. El aCD40L soluble es útil en el tratamiento de enfermedades que implican la activación de CD40L, tales como enfermedades autoinmunes. La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 61/655.110, presentada el 4 de junio de 2012 describe el dAb del aCD40L.

50 En otra realización, el aCD40L soluble se produce mediante células huésped sometidas a ingeniería recombinante. De acuerdo con la invención, la proteína de aCD40L soluble es producida de forma recombinante por las células CHO transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica aCD40L. La proteína de fusión aCD40L soluble se produce en cantidades altas y cuando 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, del producto proteico aCD40L soluble como se muestra en los ejemplos 3, 4 y 5; las figuras 4, 6 y 9.

60 Producción de una proteína de fusión miostatina mediante los métodos de cultivo de la presente invención

En otras realizaciones abarcadas por la presente invención, los métodos de cultivo celular de la invención se utilizan para producir una proteína de fusión miostatina soluble, como se ilustra en el **Clon C** descrito en el presente documento.

En otra realización, la proteína de fusión miostatina se produce mediante células huésped sometidas a ingeniería recombinante. De acuerdo con la invención, la proteína de fusión miostatina se puede producir de forma recombinante por las células CHO transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión miostatina. La proteína de fusión miostatina se produce en cantidades altas y cuando se cultiva de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. La invención proporciona la producción de niveles altos de producto de la proteína de fusión miostatina, recuperable, como se muestra en los ejemplos 3 y 4; las figuras 7 y 10.

Producción de una proteína de fusión CTLA4Ig mediante los métodos de cultivo de la presente invención

En otras realizaciones abarcadas por la presente invención, los métodos de cultivo celular de la invención se utilizan para producir una proteína de fusión CTLA4Ig soluble, como se ilustra en el **Clon D** descrito en el presente documento. CTLA4Ig es una proteína de fusión soluble que consiste en el dominio extracelular del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) ligado a la porción Fc modificada (dominios bisagra, CH2 y CH3) de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1). CTLA4 está indicado para reducir los signos y síntomas, induciendo una respuesta clínica mayor, inhibiendo la progresión del daño estructural y mejorando la función física en pacientes adultos con artritis reumatoide activa de moderada a grave. La proteína de fusión CTLA4Ig puede ser producida de forma recombinante por las células CHO transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica CTLA4Ig, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.844.095 de Linsley, P.S. et al.

En otra realización, el CTLA4Ig soluble se produce mediante células huésped sometidas a ingeniería recombinante. De acuerdo con la invención, la proteína CTLA4Ig soluble puede ser producida de forma recombinante por las células CHO transfectadas con un vector que contiene la secuencia de ADN que codifica CTLA4Ig. La proteína de fusión CTLA4Ig soluble se produce en cantidades altas y cuando se cultiva de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. La invención proporciona la producción de niveles altos del producto de la proteína CTLA4Ig soluble recuperable, como se muestra en los ejemplos 3 y 4; las figuras 8 y 12.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes exponen aspectos específicos de la invención para ilustrar la invención y proporcionan una descripción de los presentes métodos para los expertos en la técnica. Los ejemplos no deben interpretarse como que limitan la invención, ya que los ejemplos simplemente proporcionan metodología y ejemplos específicos que son útiles en la comprensión y la práctica de la invención y sus varios aspectos.

Los Ejemplos 1-5, tal como se exponen a continuación, describen experimentos relacionados con el proceso de cultivo de la invención con y sin factores de crecimiento.

Ejemplo 1

Las células CHO fueron capaces de crecer en condiciones sin GF

1. Descongelar un nuevo vial de células en el pase temprano y cultivar en medio de plataforma (con insulina de 1 o 10 mg/l de insulina) para 2 pases.
2. En el pase 3, transferir las células a los medios basales sin insulina y mantener la división cada 3 a 4 días a una densidad de $0,6 \times 10^6$ células/ml.
3. En los primeros pases en condiciones sin insulina, el crecimiento celular puede ralentizarse significativamente y la viabilidad puede disminuir (~ 90 %). Mientras tanto, la producción de amonio puede aumentar debido a la absorción insuficiente de glucosa y a la oxidación de aminoácidos como fuente de energía. Como resultado, el pH en los frascos puede aumentar. El nivel de CO₂ puede tener que ajustarse/incrementarse en consecuencia para controlar el pH en un intervalo de 7,0-7,3. Esto es muy importante para mantener las células en un estado saludable.
4. En general, el medio gastado transportado en un nuevo pase debe ser menor del 30 %. En el caso de que el crecimiento celular sea demasiado lento para satisfacer el criterio, las células podrían centrifugarse y transferirse a un número deseado a un nuevo matraz que contenga 30 % de medio agotado y 70 % de medio fresco.
5. Cuando las células están totalmente adaptadas, el crecimiento celular se recuperará y la viabilidad volverá a más del 95 %. Puede requerir hasta 7-9 pases adaptar las células a la condición sin insulina dependiendo del clon específico.
6. Parámetros de cultivo celular: velocidad de agitación: 150 rpm; matraz de agitación: matraces de agitación con deflectores de 250 ml o 500 ml (Corning Inc.) con un volumen de trabajo e 100 ml o 200 ml; temperatura: 37 °C; CO₂: 6 % en general, se pueden ajustar para controlar el pH a 7,0-7,3 (hasta el 8 % de CO₂).

La Figura 1 y la Figura 2 muestran la adaptación del Clon A y el Clon B, respectivamente, al crecimiento en medio sin factores de crecimiento. Se observaron resultados similares para otros Clones C y D.

Ejemplo 2

La eliminación de la insulina no afectó drásticamente a la vía mTOR

La finalidad de este estudio fue utilizar una matriz de anticuerpos para comparar el nivel de fosforilación/expresión de las proteínas implicadas en mTOR en células cultivadas con y sin factor de crecimiento, insulina, demostrando de este modo que desde una perspectiva de biología molecular y celular que las células son capaces de crecer en condiciones sin GF.

5

Preparación de muestras de matrices de anticuerpos

El clon A se cultivó en medio basal sin insulina o con insulina. El día 3 se obtuvieron muestras de 5×10^6 células viables para cada condición. Las células se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos y a 4 °C. Las células se lavaron con 10 ml de 1 x PBS enfriado con hielo y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos y a 4 °C. Las células se mantuvieron siempre en hielo o a 4 °C durante el procesamiento de la muestra. Después de retirar el PBS, las células se congelaron a -70 °C inmediatamente y se almacenaron a -70 °C hasta el análisis de la matriz de anticuerpo.

15 Protocolo de matrices de anticuerpos

Extracción de proteínas

Lavar las células con 1X PBS enfriado con hielo. Añadir a la muestra esferas de lisis y tampón de extracción. Mezclar enérgicamente con vórtex durante 30 segundos. Incubar la mezcla en hielo durante 10 minutos. Repetir la agitación en vórtex durante 30 segundos a intervalos de 10 minutos durante 60 minutos. Incubar la mezcla en hielo entre las agitaciones en vórtex. Centrifugar la mezcla a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Utilizar columnas de giro para cambiar el tampón en el sobrenadante a tampón de marcaje. Medir la concentración de proteínas. Nota: los inhibidores de la fosfatasa se incluyen en el tampón de extracción y el tampón de marcaje.

Marcaje de proteínas

Añadir 100 µl de DMF a 1 mg de reactivo de biotina para dar una concentración final de 10 µg/µl. Añadir el tampón de marcaje a la muestra de proteína para llevar el volumen a 75 µl. Añadir 3 µl de biotina/DMF a la muestra de proteína con tampón de marcaje. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante dos horas con mezclado. Añadir 35 µl de reactivo de parada. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con mezclado.

Acoplamiento

Bloqueo: Sumergir la micromatriz de anticuerpos en tampón de bloqueo. Agitar durante 40 minutos a temperatura ambiente. Lavar el portaobjetos con agua de calidad MILLI-Q®.

Incubar el portaobjetos en la cámara de acoplamiento con 85µg de la muestra de proteínas marcadas en 6 ml de solución de acoplamiento en un agitador orbital durante 2 horas a temperatura ambiente. Retirar el portaobjetos de la cámara de acoplamiento. Lavar el portaobjetos tres veces con un tampón de lavado recién preparado. Lavar abundantemente con agua DI.

Detección

Añadir 30 µl de Cy3-estreptavidina (1 mg/ml) a la botella de 60 ml que contiene el tampón de detección. Sumergir el portaobjetos en 30 ml de solución de Cy3-estreptavidina. Incubar en un agitador orbital durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Lavar el portaobjetos tres veces con un tampón de lavado recién preparado. Lavar abundantemente con agua DI. Secar el portaobjetos con nitrógeno comprimido. Escanear en el escáner Axon GenePix Array Scanner.

Datos del ensayo

Para cada punto de la matriz, la intensidad del punto mediano se extrae de la imagen de la matriz. Usando la intensidad mediana, determinar la señal promedio de los puntos duplicados para cada anticuerpo. Los datos están etiquetados como el *Promedio de la señal de los puntos duplicados en la matriz*. EL CV de los duplicados en la matriz es el coeficiente de variación de los puntos duplicados para cada anticuerpo. Para la normalización, dentro de cada portaobjetos de la matriz se determina el valor medio del promedio de la señal de todos los anticuerpos en la matriz. Este valor se presenta como la *Señal media*.

60

Datos normalizados= promedio de la señal de los puntos duplicados/señal media

Usando los datos normalizados, determinar el cambio entre las muestras control y tratadas.

65 *Cambio de la señal* = Tratadas/Control

Ejemplo 3

Los medios sin GF/Proteínas/Péptidos libres mejoran el rendimiento del procedimiento

5 Células: Clon A, B, C y D.

Parámetros de cultivo celular en matraces de agitación:

10 Velocidad de agitación: 150 rpm; matraz de agitación: matraces de agitación con deflectores de 250 ml o 500 ml (Corning Inc.) con un volumen de trabajo de 100 ml o 200 ml; temperatura: 37 °C; CO₂: 6 % en general.

Parámetros de cultivo celular en reactores:

15 Agitación 120 rpm; Reactor de 5 l con un volumen de cultivo inicial de 1,3 l; temperatura: 37 °C; oxígeno disuelto (DO) controlado a 50 %; pH a de 7,0 a 7,3.

Densidad de la siembra: 0,3 o 0,6 x 10⁶ células/ml.

20 Basal: Medio 171 para el Clon A, B y C con o sin insulina; Medio 127G para el Clon D con o sin insulina.

Alimentación: Medio derivado 154A-1 o 154A-1 (M154A1B para el Clon A y B) con o sin insulina.

25 Estrategia de alimentación: la alimentación comienza el día 3, alimentar con 3,64 %del volumen del cultivo inicial hasta el día 14.

Obtención de muestras: a los puntos de tiempo designados, se tomaron muestras para medir la densidad y la viabilidad celulares con CEDEX®, título con HPLC y especies de alto peso molecular con cromatografía de exclusión por tamaño (SE).

30 **Ejemplo 4**

Adición de GF suplementario al crecimiento celular reforzado por condiciones sin GF y células de producción de proteínas: Clon B productor de la proteína de fusión aCD40L.

35 Parámetros de cultivo celular:

Agitación: 120 rpm; Reactor de 5 l con un volumen de cultivo inicial de 1,3 l; temperatura: 37 °C; oxígeno disuelto (DO) controlado a 50 %.

40 Basal: medio con o sin insulina.

Alimentación: con o sin insulina y LONG®R3.

45 sin INS: sin insulina en basal, sin insulina y sin LONG®R3 en la alimentación.

INS: 1 mg/l de insulina en basal, 10 mg/l de insulina en alimentación.

50 Suplementación con INS: Se añadió un suplemento con 1 mg/l de insulina y 10 mg/l de insulina a los medios basal y de alimentación, respectivamente. El inóculo eran células sin insulina.

Estrategia de alimentación: la alimentación comienza el día 3, alimentar con 3,64 %del volumen del cultivo inicial hasta el día 14.

55 Obtención de muestras: a los puntos de tiempo designados, se tomaron muestras para medir la densidad y la viabilidad celulares con CEDEX®, título con HPLC y especies de alto peso molecular con cromatografía de exclusión por tamaño (SE).

Ejemplo 5

60 Los medios sin GF/Proteínas/Péptidos libres mejoran el rendimiento del procedimiento

Células: Clon 63C2 productor de la proteína de fusión aCD40L.

Parámetros de cultivo celular:

65 Agitación: 120 rpm; Reactor de 5 l con un volumen de cultivo inicial de 1,3 l; temperatura: 37 °C; oxígeno disuelto

ES 2 633 960 T3

(DO) controlado a 50 %.

Basal: con o sin insulina.

5 Alimentación: con o sin insulina y LONG®R3.

Sin INS + LR3: Se añadieron 4 µg/l de LR3 y 40 µg/l de LR3 a medio basal y de alimentación, respectivamente. El inóculo carecía de GF.

10 INS + LR3: Se añadieron 4 µg/l de LR3 y 40 µg/l de LR3 al medio basal con 1 mg/l y al medio de alimentación con 10 mg/l de insulina, respectivamente. El inóculo estaba en el basal con 1 mg/l de insulina.

Estrategia de alimentación: la alimentación comienza el día 3, alimentar con 3,64 %del volumen del cultivo inicial hasta el día 14.

15 Obtención de muestras: a los puntos de tiempo designados, se tomaron muestras para medir la densidad y la viabilidad celulares con CEDEX®, título con HPLC y especies de alto peso molecular con cromatografía de exclusión por tamaño (SE).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de disminución de la agregación de una proteína de interés durante la fase de producción del cultivo celular en células CHO, que comprende:
- a) adaptar células CHO que expresan la proteína de interés a los medios sin factor de crecimiento, proteínas y péptidos; y
 - b) cultivar las células CHO adaptadas en los medios sin factor de crecimiento, proteínas y péptidos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína de interés es una proteína aCD40L soluble.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína de interés es una proteína de fusión miostatina soluble.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína de interés es una proteína de fusión CTLA4Ig soluble.

FIG. 1

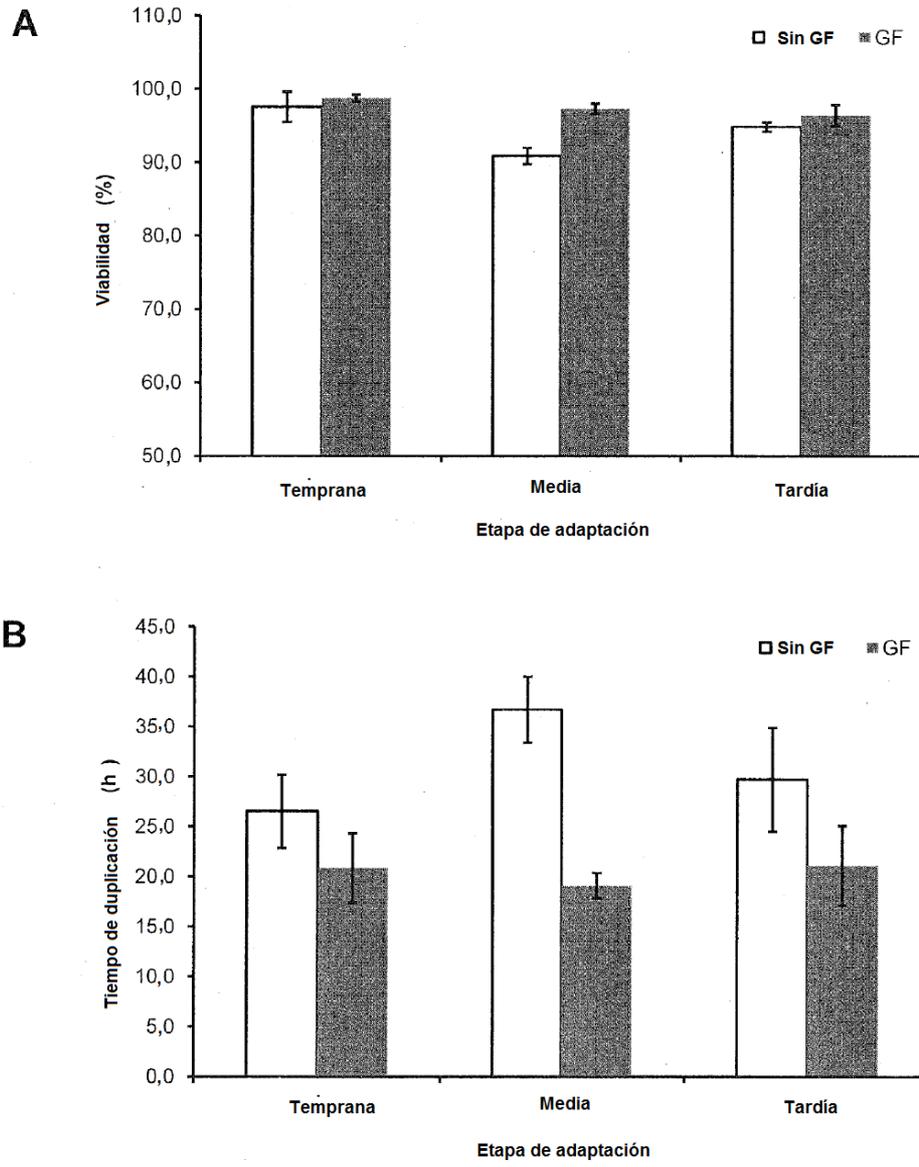


FIG. 2

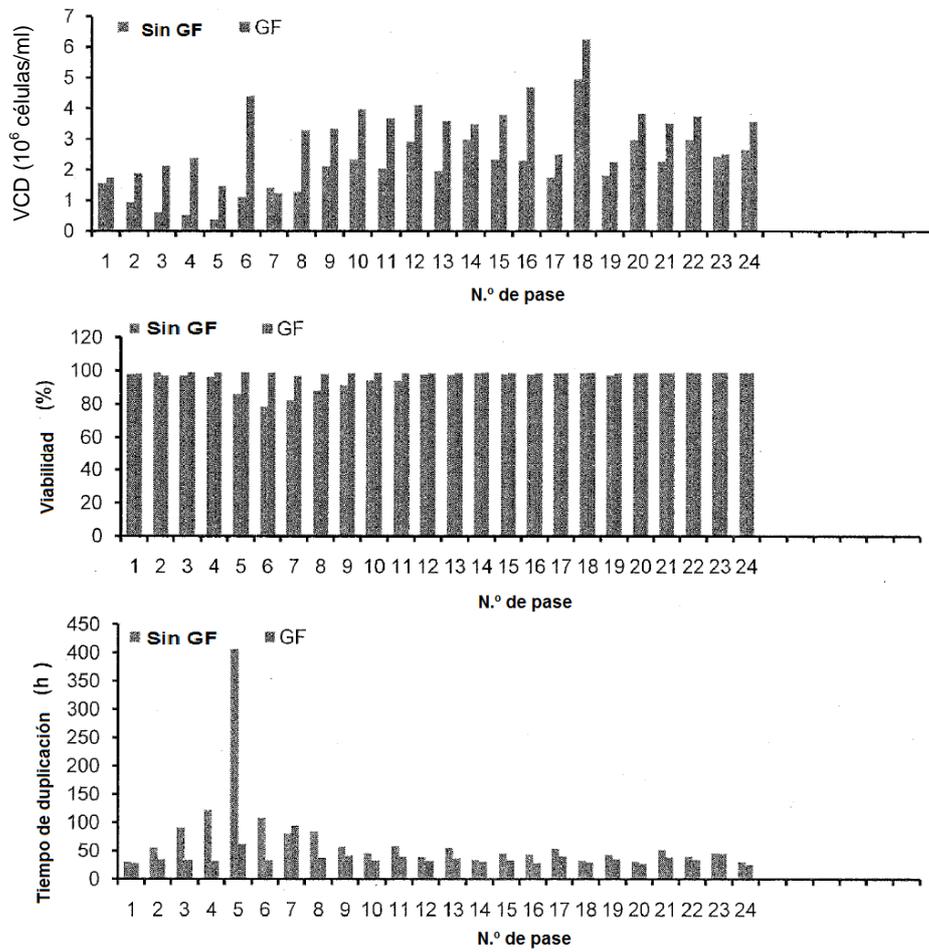


FIG. 3

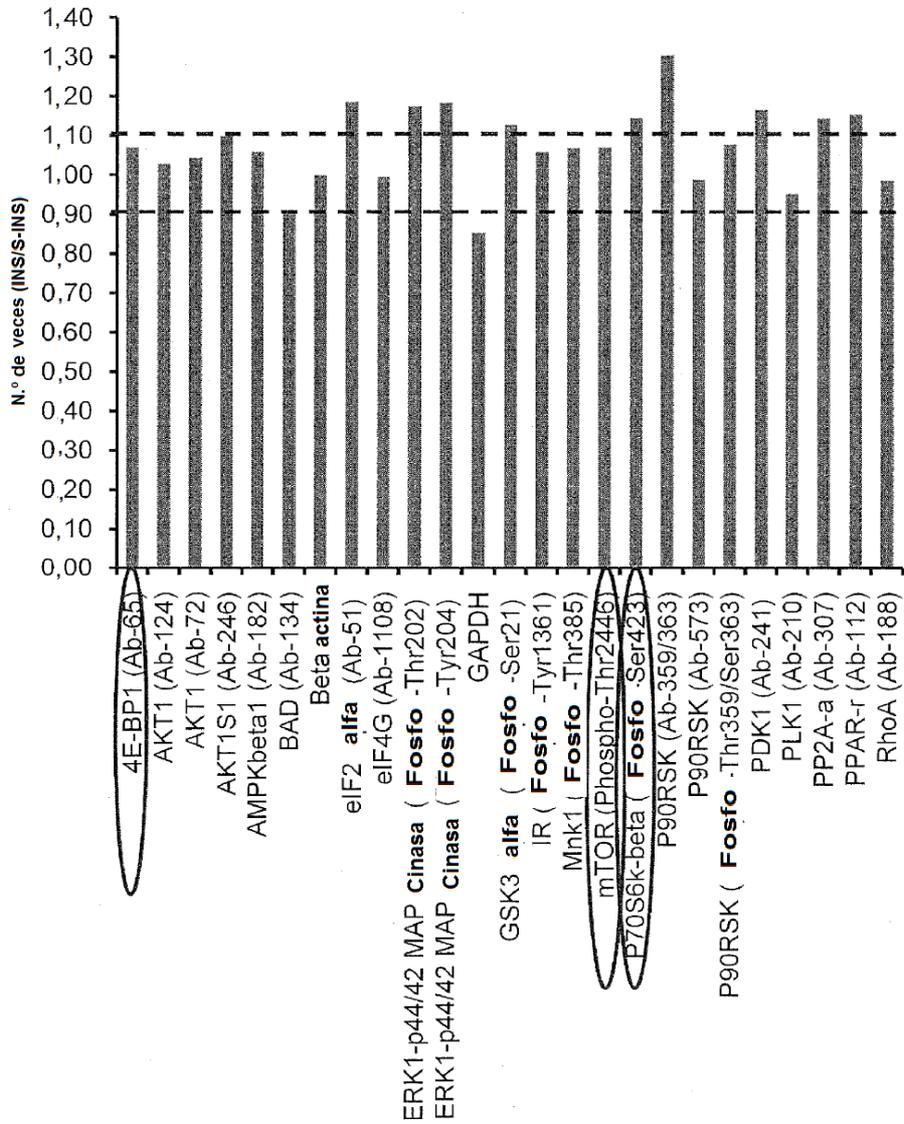


FIG. 4

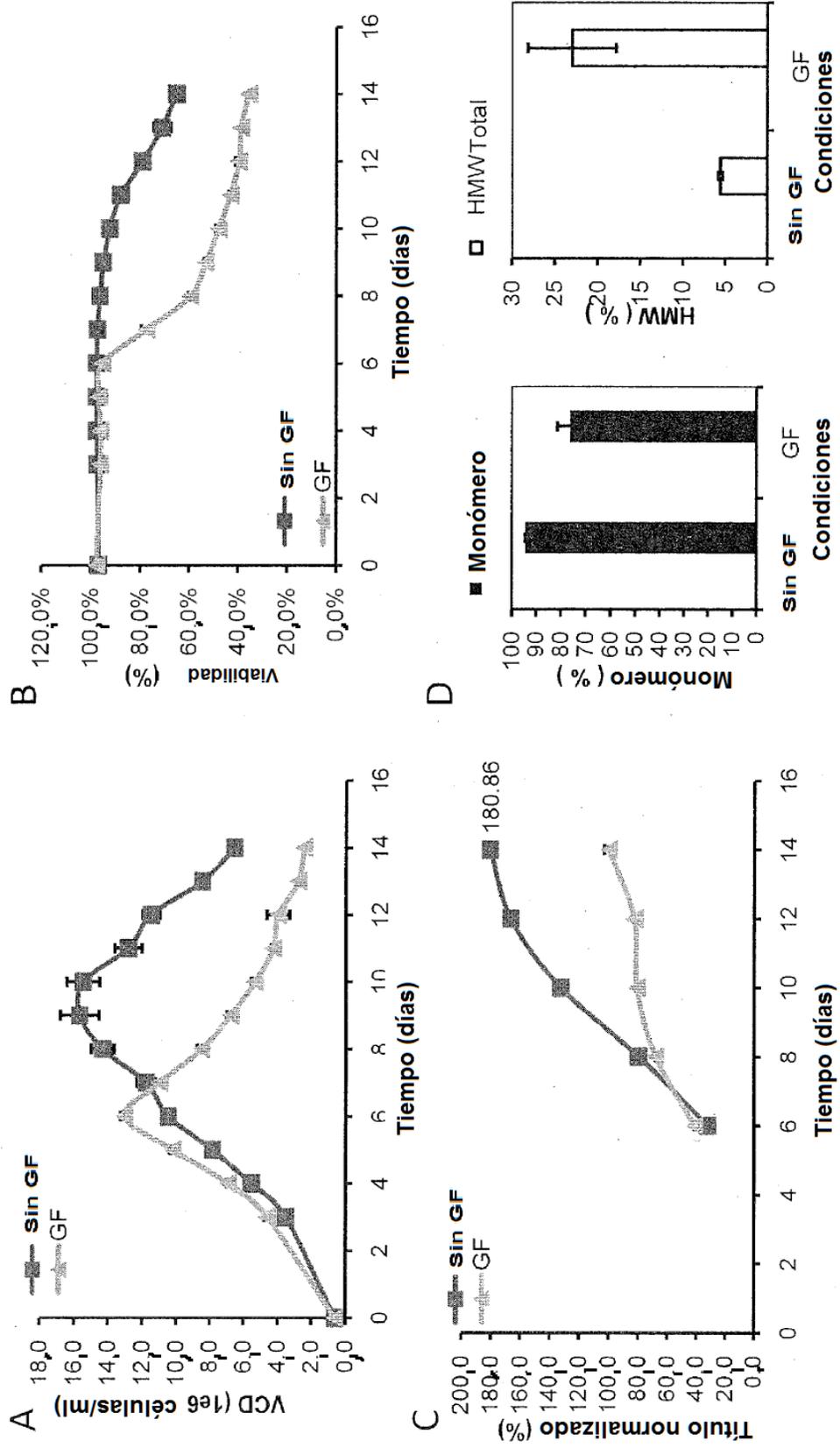


FIG. 5

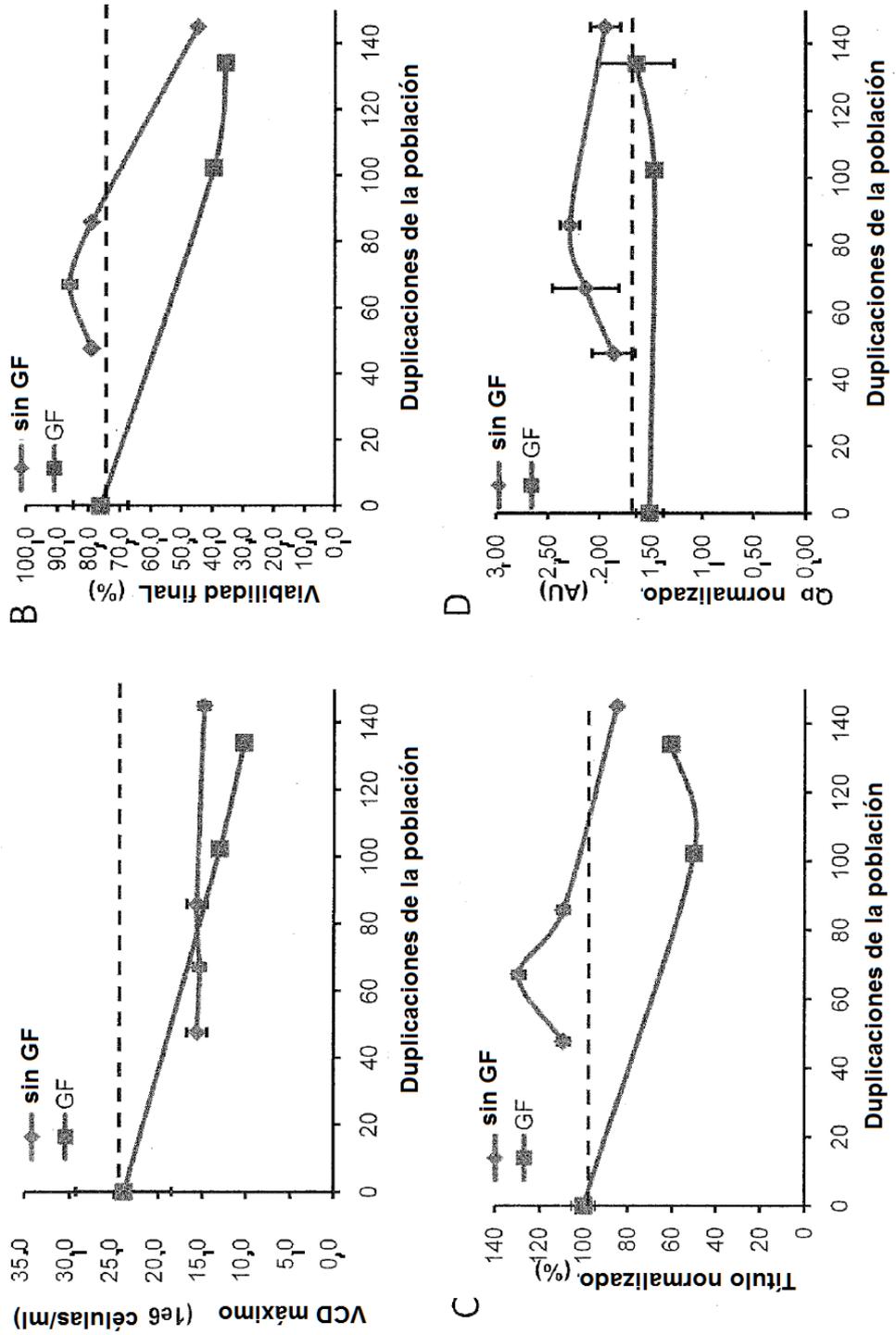


FIG. 6

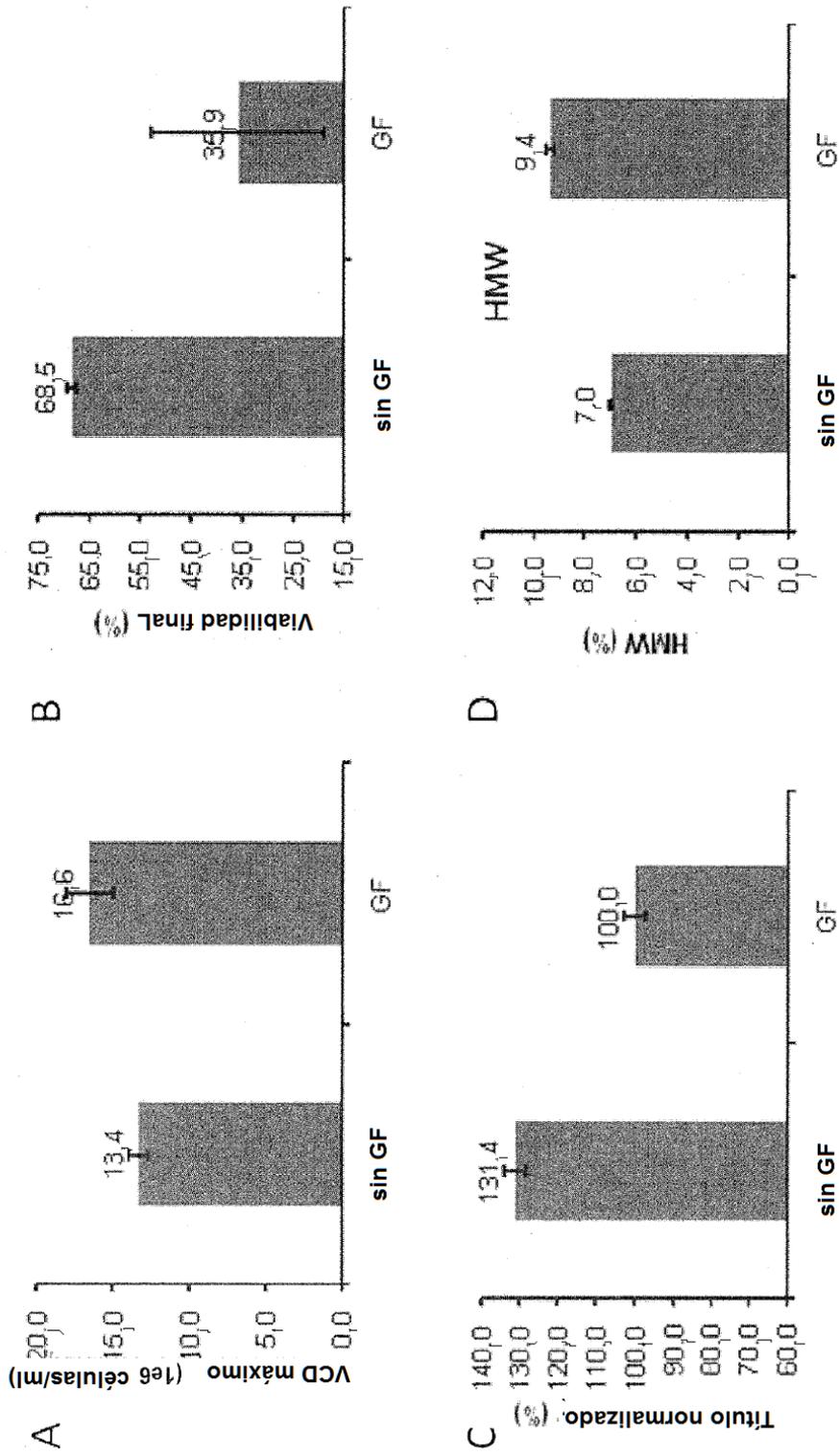


FIG. 7

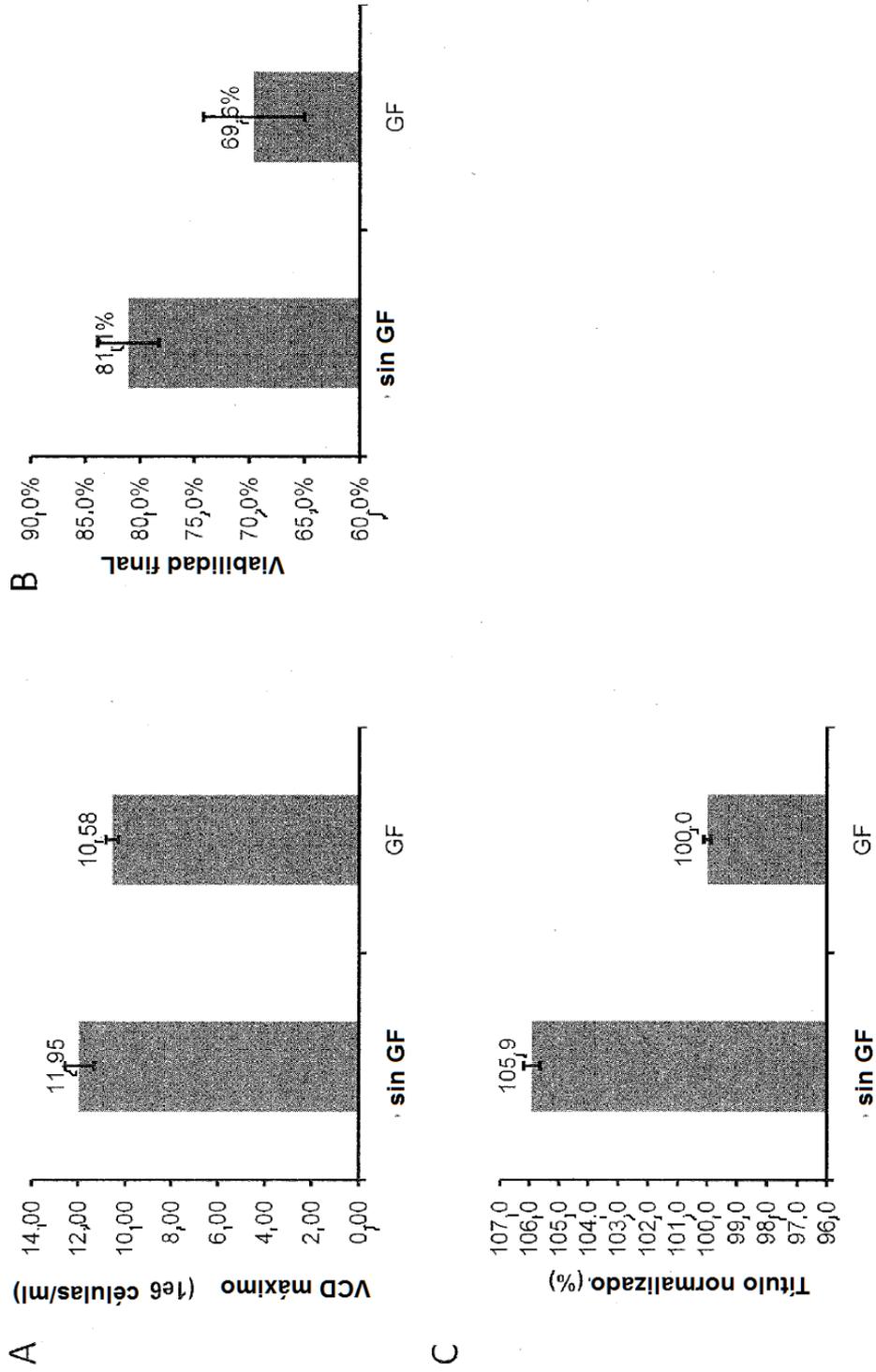


FIG. 8

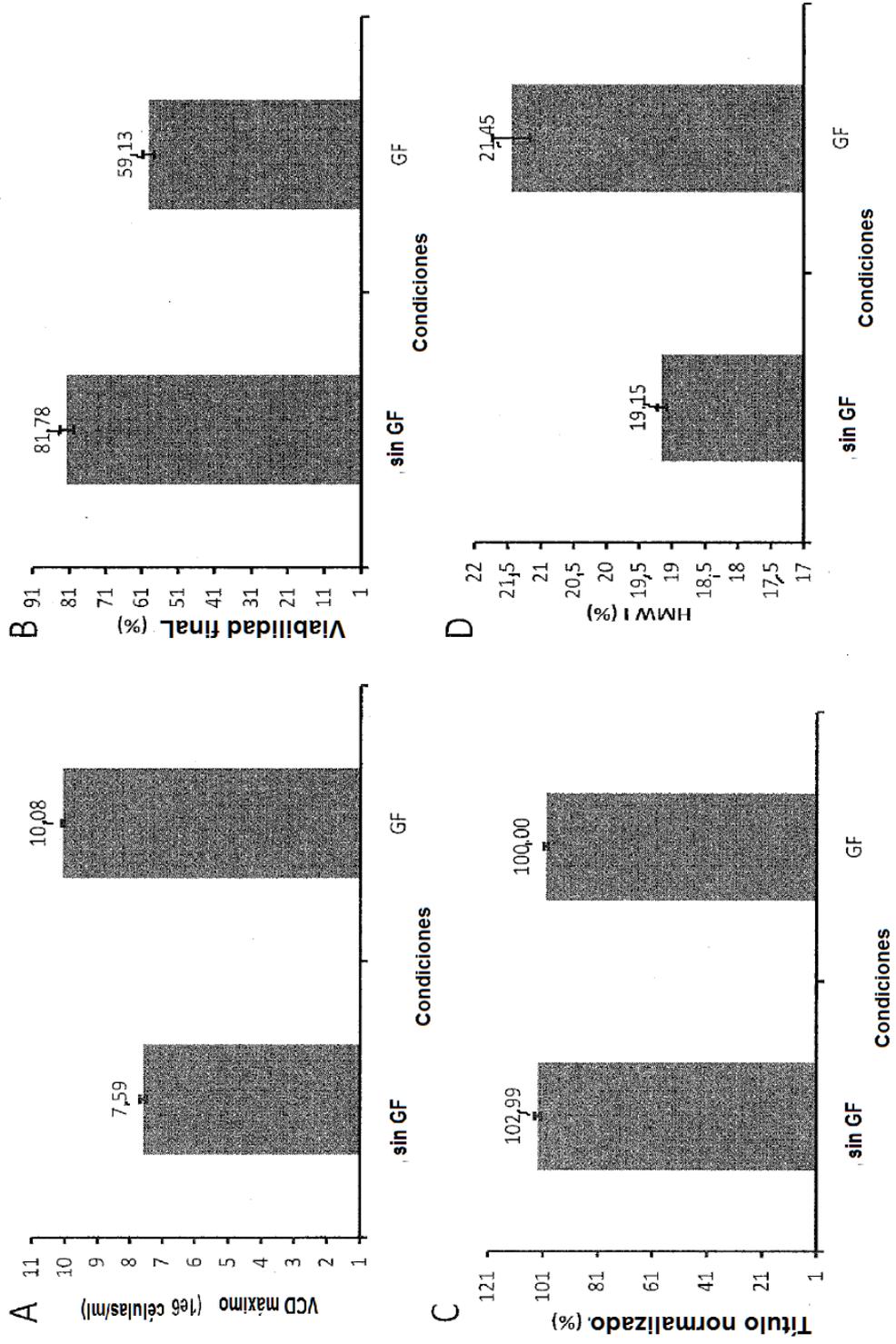


FIG. 9

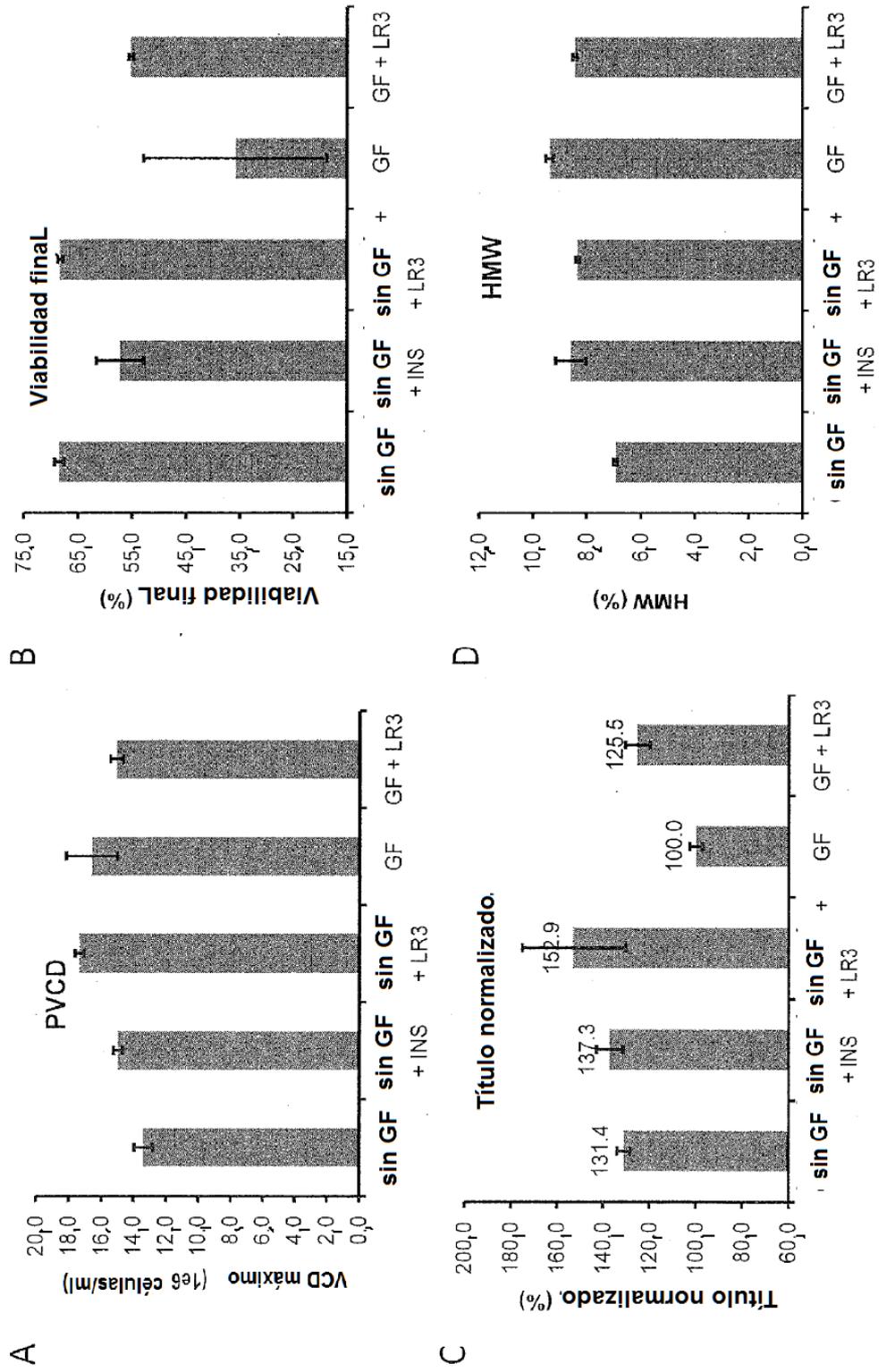


FIG. 10

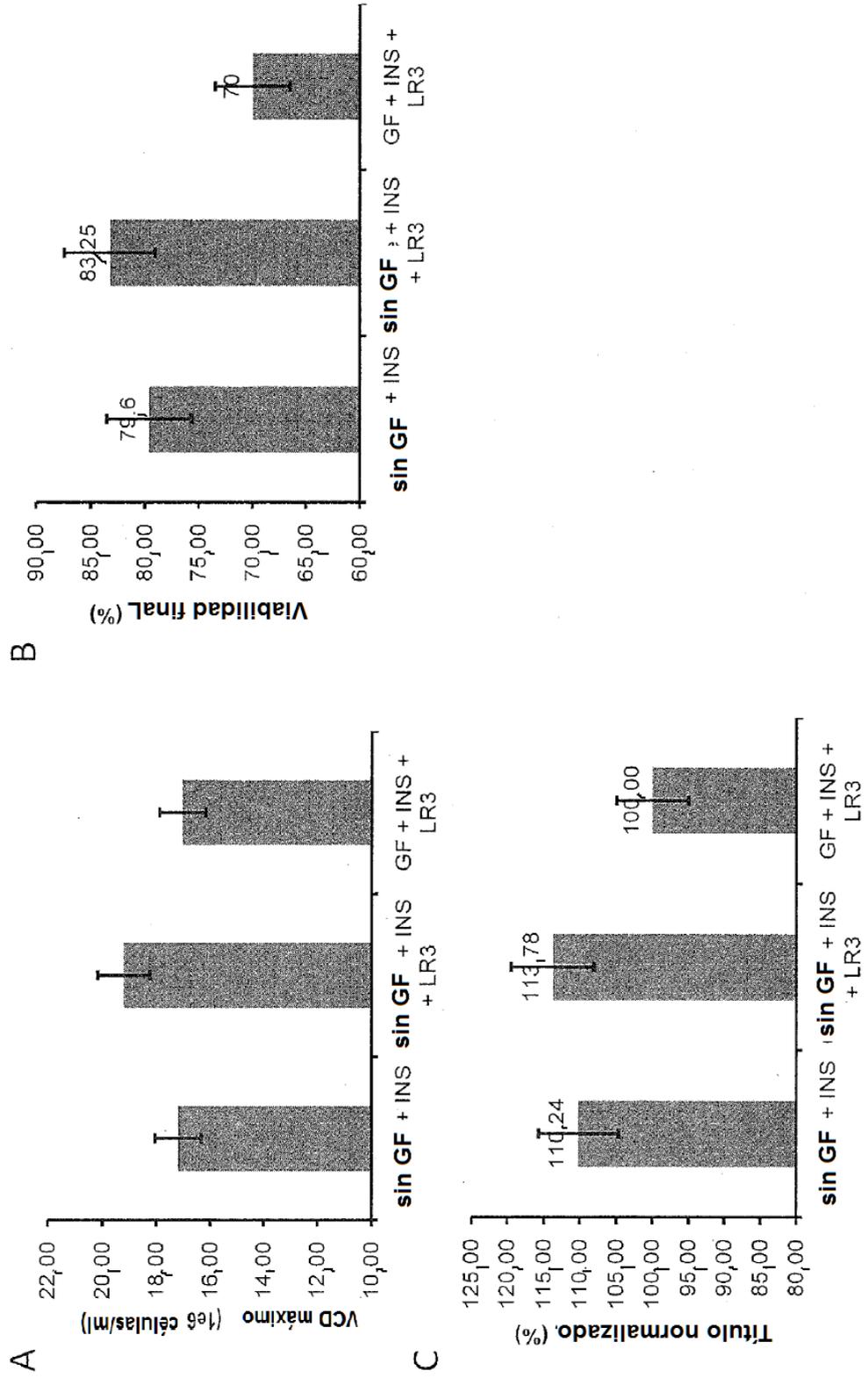


FIG. 11

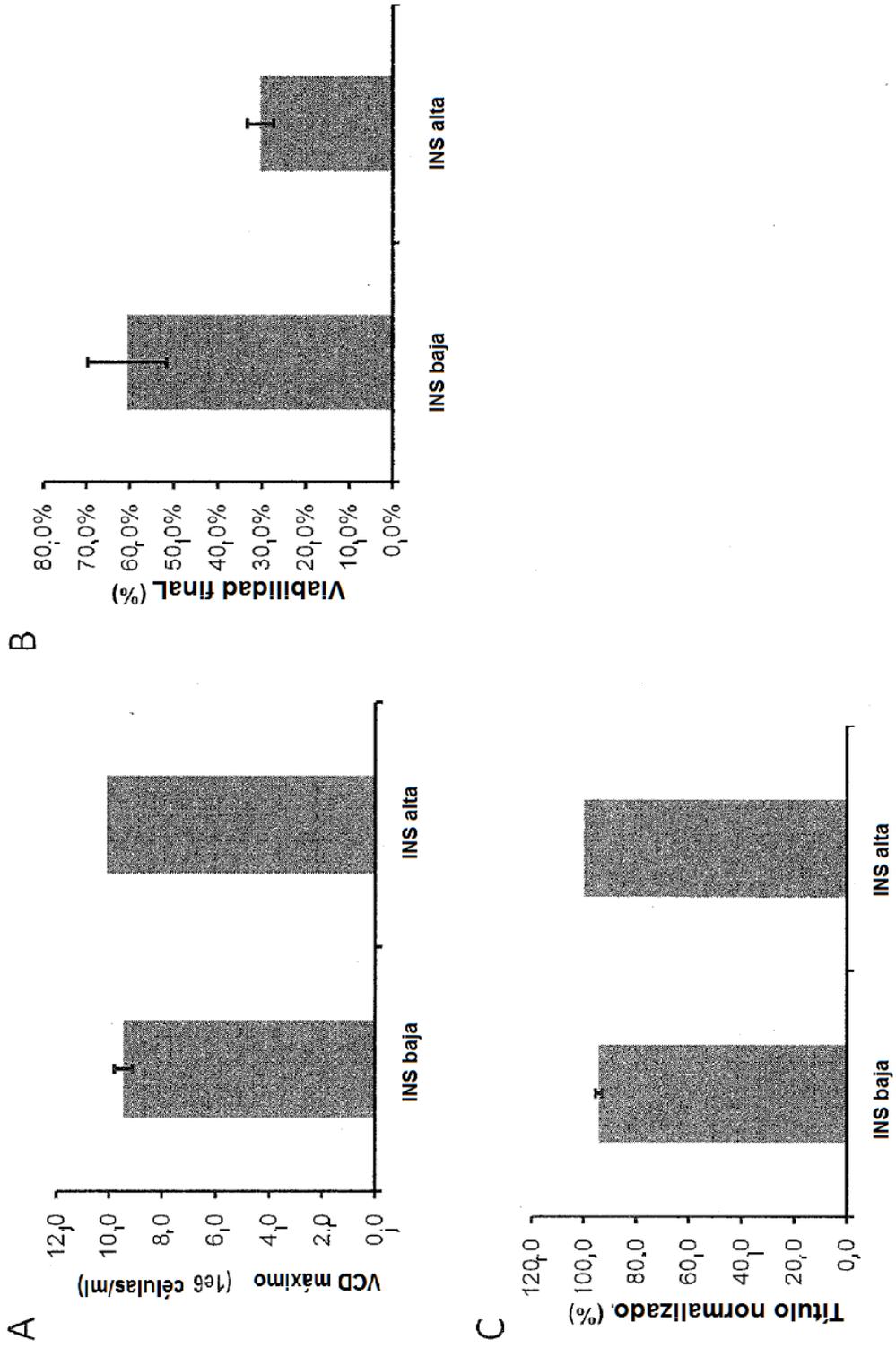


FIG. 12

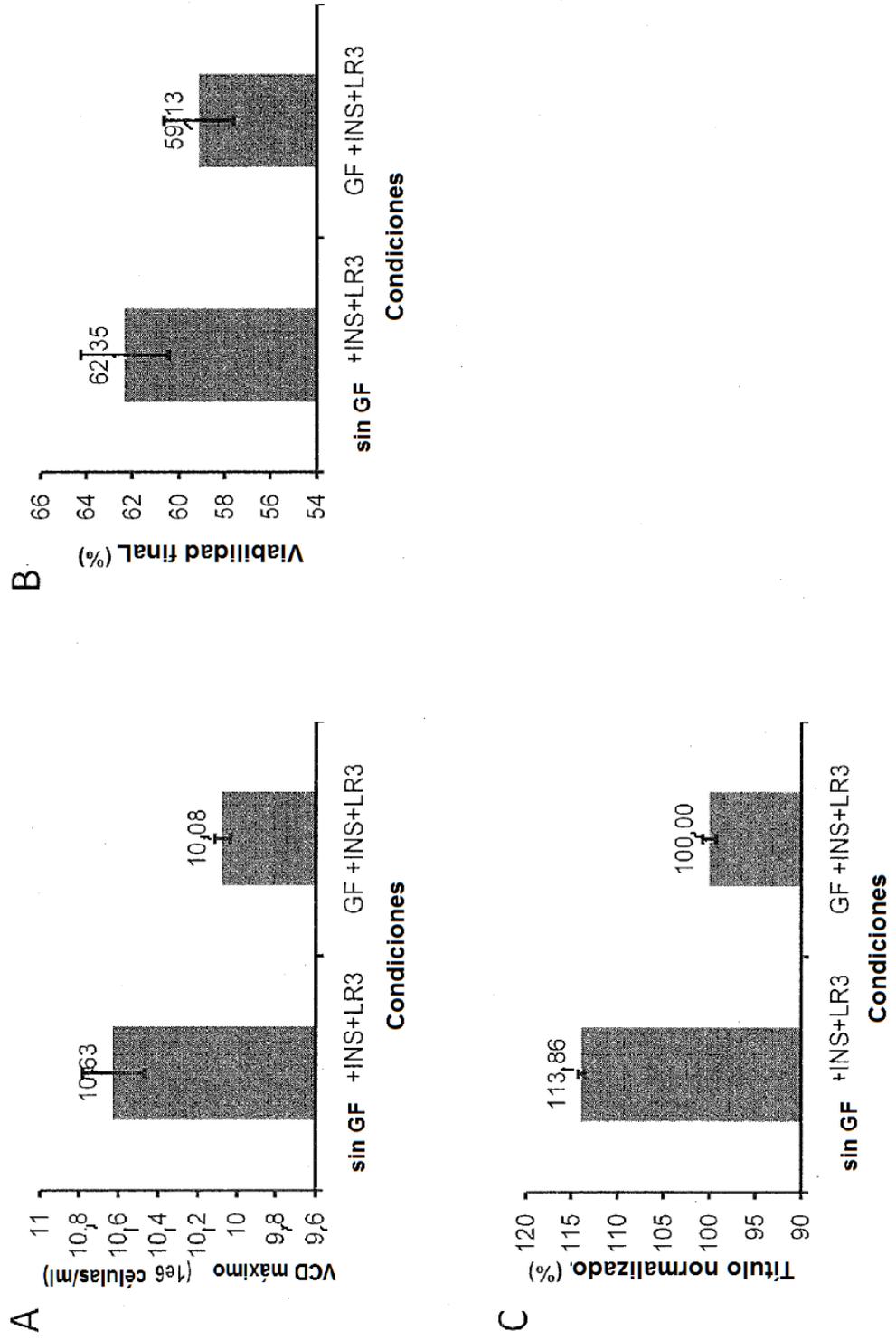


FIG. 13

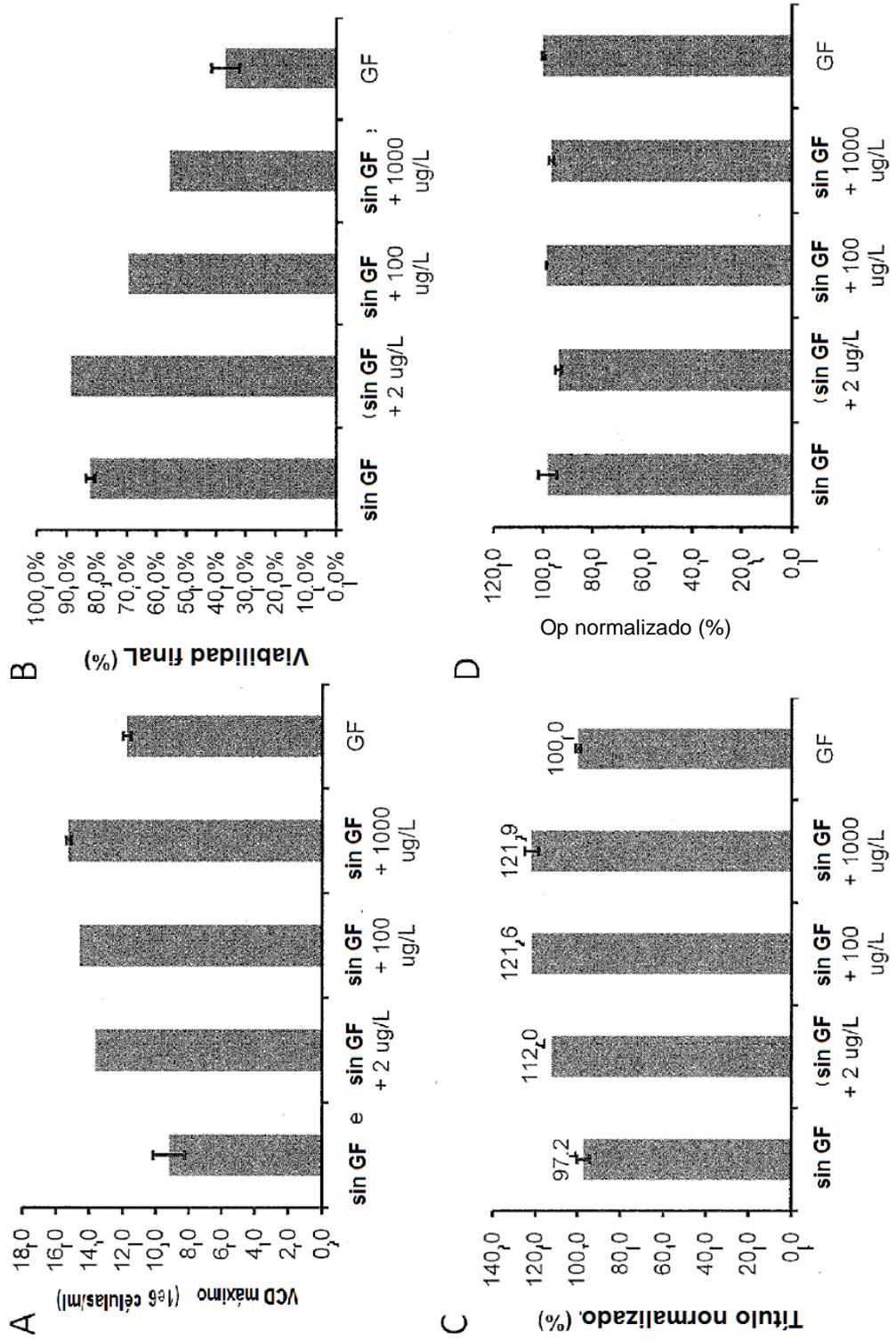


FIG. 14

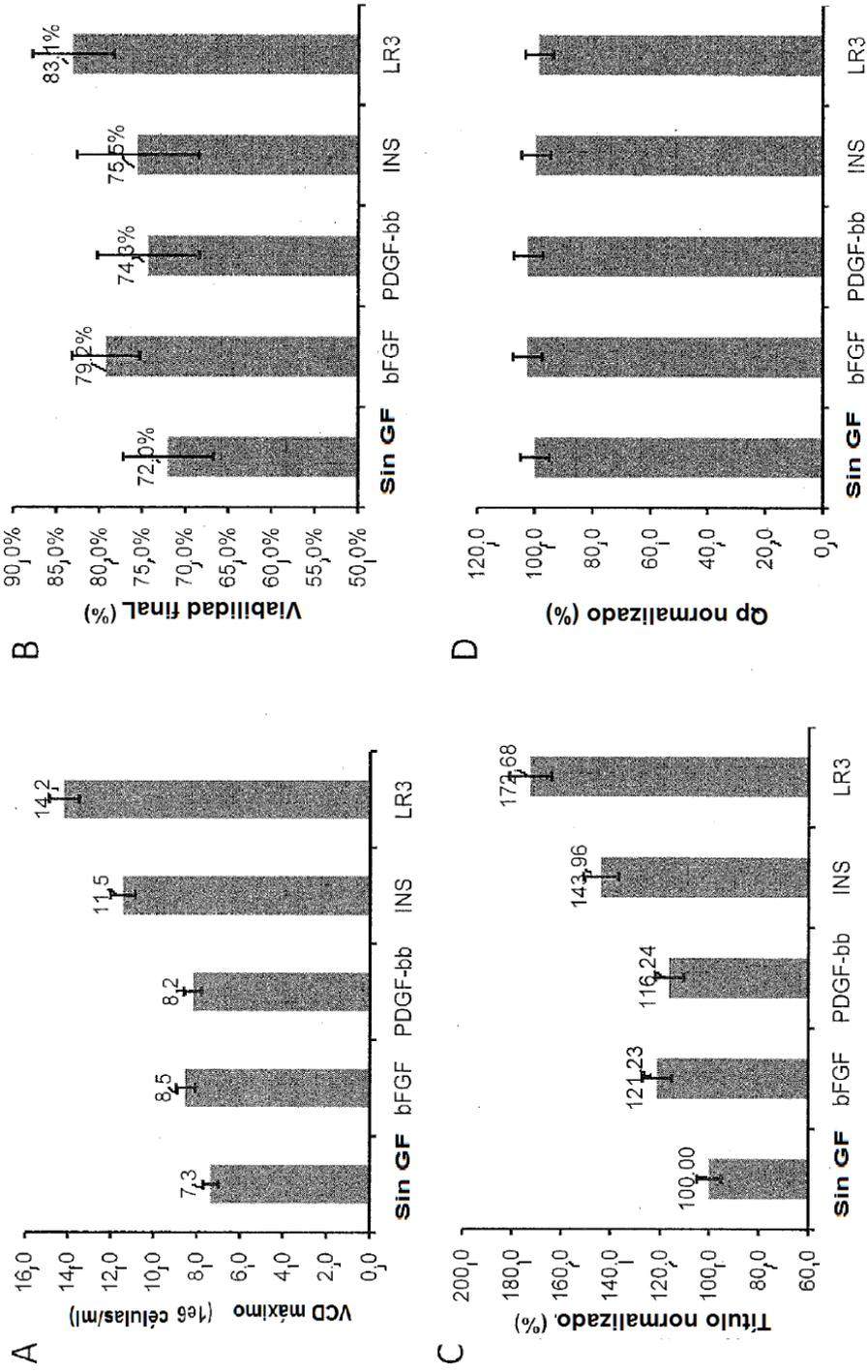
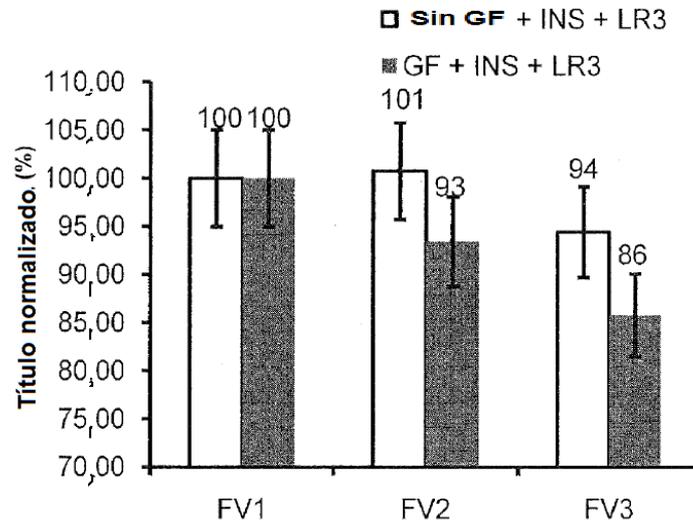


FIG. 15

A



B

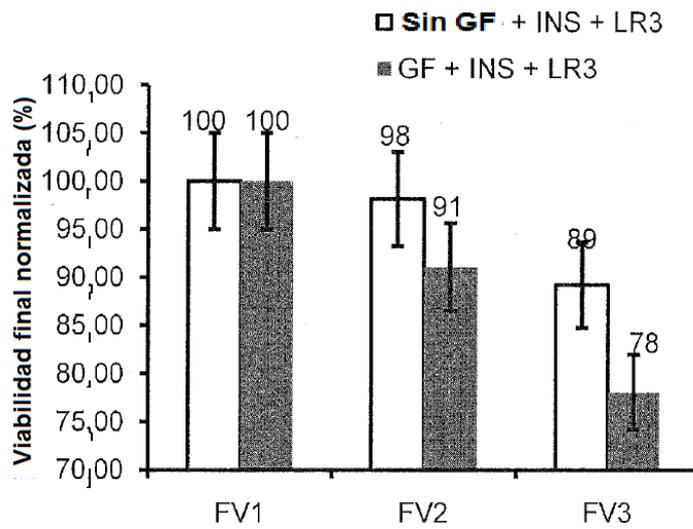


FIG. 16

