

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 090**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2008 PCT/US2008/061123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08131374**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2008 E 08746526 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2139986**

54 Título: **Uso de baja temperatura y/o bajo pH en cultivo celular**

30 Prioridad:

23.04.2007 US 913382 P

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

12.12.2017

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**GOMES, JOSE, MANUEL y
HILLER, GREGORY, WALTER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 646 090 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

Uso de baja temperatura y/o bajo pH en cultivo celular

Esta solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º de Serie 60/913.382, presentada lunes, 23 de abril de 2007, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para mejorar la producción de proteínas por células cultivadas, especialmente células de mamífero. Específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos para preparar productos proteínicos, por ejemplo, productos de glucoproteínas, en los que las características del producto proteínico se controlan manipulando el ambiente de cultivo celular. La invención también se refiere a procedimientos para mejorar la eficacia terapéutica y/o la inmunogenicidad de los productos proteínicos, por ejemplo, los productos de glucoproteínas, producidos en células de mamífero, por ejemplo, manipulando la glucosilación de la proteína y reduciendo la agregación y el mal plegado de las proteínas, mediante la reducción de la temperatura y/o del pH del cultivo celular.

15 **Técnica antecedente relacionada**

Una gran proporción de los productos biotecnológicos, ya se encuentren disponibles comercialmente o en desarrollo, son agentes terapéuticos proteínicos. Existe una demanda grande y creciente de producción de proteínas en cultivos de células animales y de procedimientos mejorados relacionados con dicha producción. Dichos procedimientos mejorados son necesarios debido a que normalmente es necesaria la maquinaria celular de una célula animal para producir diversas formas de agentes terapéuticos proteínicos, tales como proteínas modificadas postraduccionalmente, en particular, proteínas glucosiladas.

Un problema común encontrado en los procedimientos de producción de proteínas a gran escala es que una parte significativa del producto proteico se produce en forma mal plegada o agregada, es decir, en forma de un agregado de alto peso molecular ("HMWA"). Por ejemplo, la sobreexpresión recombinante de polipéptidos en células puede sobrecargar a la maquinaria del retículo endoplasmático (RE), posibilitando que un mayor número de proteínas mal plegadas y/o agregadas se evadan de las vías degradativas y salgan del RE. Por lo tanto, los procedimientos de producción de proteínas actuales pueden dar como resultado una gran proporción de producto que se encuentra agregado, no funcional y por lo tanto, no usable en su forma producida. La presencia de proteína mal plegada y/o agregada no es deseable debido a que puede dar lugar a acontecimientos adversos tras su administración, incluyendo, pero sin limitación, un potencial de inmunogenicidad tras su administración (por ejemplo, activación de complemento o anafilaxia). Por lo tanto, un exceso de mal plegamiento y/o agregación de proteína terapéutica puede conducir a un fracaso en, por ejemplo, ensayos clínicos. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de nuevos procedimientos para limitar o reducir el mal plegamiento y/o la agregación de proteínas.

La glucosilación de proteínas es un proceso de modificación postraduccional común mediante el cual se añaden restos complejos de azúcar sobre una proteína a través de la acción de una serie de enzimas especializadas (glucosiltransferasas y glucosidasas) en el RE. Este proceso puede controlar el plegamiento adecuado de los polipéptidos recientemente sintetizados, de tal forma que salen del RE únicamente los polipéptidos correctamente plegados, mientras que las proteínas mal plegadas se degradan. Los patrones de glucosilación de proteínas afectan al direccionamiento de la proteína, la estructura, la estabilidad termodinámica y la actividad enzimática (véase, por ejemplo, Solá y col. (2007) Cell. Mol. Life Sci. 64:2133-52; Solá y Griebenow (2006) FEBS Lett. 580:1685-90). Por ejemplo, la sialilación de *N*-glucano se asocia con un aumento del tiempo de vida de las glucoproteínas debido a que dichas glucoproteínas no son reconocidas por los receptores de asialoglucoproteínas, que dirigen a las proteínas no sialiladas a su degradación (véase, por ejemplo, Bork y col. (2007) FEBS Letters 581:4195-98). Por lo tanto, las alteraciones en la glucosilación de proteínas pueden afectar a la calidad y la eficacia del producto.

Además, la glucosilación aberrante de las proteínas puede dar como resultado inmunogenicidad del producto proteico terapéutico final. Las proteínas producidas en condiciones no naturales subóptimas pueden adquirir azúcares y patrones de azúcar no hallados de manera natural en las proteínas humanas y por lo tanto, pueden dar como resultado una reacción inmunogénica en el sujeto (Jefferis (2006) Biotechnol. Prog. 21:11-16). Dichas glucosilaciones no naturales son especialmente prevalentes en agentes terapéuticos proteicos, tales como agentes terapéuticos de anticuerpos o agentes terapéuticos de Fc-proteína de fusión, por ejemplo, agentes terapéuticos de receptor de Fc soluble-proteína de fusión.

Por estos motivos, la FDA requiere que se mantengan dentro de límites estrictos los perfiles de glucoforma de las proteínas terapéuticas. Por lo tanto, existe la necesidad en la industria farmacéutica de un procedimiento de producción de proteínas terapéuticas en cultivo celular que permita el control del nivel de glucosilación de proteínas.

55

Sumario de la invención

1] Por lo tanto, la invención es un procedimiento para producir una proteína en un cultivo celular que comprende:

(a) cultivar células en cultivo celular a una temperatura reducida, en el que la temperatura reducida se encuentra dentro de un intervalo de 27,0°C a menos de 30,0°C; y

5 (b) cultivar células en el cultivo celular a pH reducido, en el que el pH reducido se encuentra dentro de un intervalo de 6,80 a menos de 7,00; para reducir la producción de proteínas mal plegadas y/o proteínas agregadas,

en el que el cultivo celular es un cultivo celular de mamífero,

en el que la proteína producida es un receptor soluble, en el que dicho receptor soluble es TNFR-Fc o sIL-13R.

10 En realizaciones preferidas, la invención se refiere a modificar los parámetros de pH y temperatura para reducir la producción de proteínas mal plegadas y/o agregadas en cultivo de células de mamífero y especialmente, en cultivo de células de ovario de hámster chino ("CHO").

15 En otro aspecto, la divulgación es un procedimiento para producir una proteína en un cultivo celular, en el que el nivel de glucosilación de proteína de la proteína producida se controla modificando la temperatura y/o el pH del cultivo celular. Por lo tanto, puede aumentarse el nivel de glucosilación, tal como, sin limitación sialilación de N-glucano, aumentando la temperatura y/o el pH o reducirse, reduciendo la temperatura y/o el pH.

En otro aspecto, la invención es un procedimiento para producir una proteína terapéutica controlando los parámetros descritos anteriormente. Aún en otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica producida mediante dicho procedimiento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1A** representa los números integrados de células viables (eje Y; IVC [células e⁹ normalizadas * día/l]), normalizados al IVC medio del día de recogida, de células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a 27,0°C [♦], 28,0°C [▲], 29,0°C [■] o 30,0°C [○] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo en días [d]); La **FIG. 1B** representa la viabilidad celular (eje Y) de las mismas células frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

25 La **FIG. 2A** representa el perfil de glucosa residual (eje Y; glucosa [g/l]) en el cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a 27,0°C [♦], 28,0°C [▲], 29,0°C [■] o 30,0°C [○] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]);

La **FIG. 2B** representa el perfil de glutamina (eje Y; glutamina [mM]) de las mismas células frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

30 La **FIG. 3A** representa la concentración de lactato en el medio (eje Y; lactato [g/l]) del cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a 27,0°C [♦], 28,0°C [▲], 29,0°C [■] o 30,0°C [○] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]);

La **FIG. 3B** representa el perfil de amonio (eje Y; NH₄⁺ [mM]) de las mismas células frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

35 La **FIG. 4A** representa las productividades específicas de células, representadas por la Qp media acumulativa (eje X; Qp. med. acum. [mg normalizados/e⁹ células/día]), normalizado a la media de Qp media acumulativa del día de cultivo, del cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a 27,0°C [♦], 28,0°C [▲], 29,0°C [■] o 30,0°C [○] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]); mientras que la **FIG. 4B** representa el título de TNFR-Fc (eje X; título de producto [mg normalizados/l]), normalizados al título medio del día de recogida, de las mismas células frente al tiempo (tiempo de cultivo [d]).

El efecto de variar las temperaturas de producción (eje X; [°C]) en el cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc sobre la producción de TNFR-Fc mal plegado y/o agregado (eje Y; % de producto mal plegado/agregado) se demuestra en la **FIG. 5A**; mientras que el efecto de las temperaturas sobre la producción de HMWA (eje Y; % de especies de alto peso molecular) se demuestra en la **FIG. 5B**.

45 El efecto de variar las temperaturas de producción (eje X; temperatura [°C]) en el cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc sobre el porcentaje de sialilación total (sialilación unida a N y O) de TNFR-Fc (eje Y; porcentaje de sialilación total del material de referencia) se demuestra en la **FIG. 6A**. El material de referencia usado fue una alícuota específica de TNFR-Fc con un patrón de glucosilación conocido y preferible con el que pueden compararse los resultados del ensayo. La **FIG. 6B** demuestra el efecto de variar las temperaturas de producción (eje X; temperatura [°C]) en el cultivo celular de las mismas células sobre el porcentaje de glucanos unidos en N sialilados (□) o no sialilados (●) (eje Y; porcentaje de glucanos unidos en N totales).

La **FIG. 7** demuestra el efecto de cultivar células a diferentes temperaturas (27,0°C [♦], 28,0°C [▲], 29,0°C [■] o 30,0°C [○]) sobre el pH del cultivo de células CHO (eje Y) frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

55 La **FIG. 8A** representa los números integrados de células viables (eje Y; IVC [células e⁹ normalizadas * día/l]), normalizados al IVC medio del día de recogida, de las células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a un punto de pH ajustado de 7,20 [◇], 7,10 [■], 7,00 [♦], 6,90 [●] o 6,80 [▲] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]); mientras que la **FIG. 8B** representa la viabilidad celular (eje Y) de las mismas células frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 9A** representa el perfil de glucosa (eje Y; glucosa [g/l]) del cultivo celular de células CHO transfectadas

con TNFR-Fc, cultivadas a un punto de pH ajustado de 7,20 [◇], 7,10 [■], 7,00 [◆], 6,90 [●] o 6,80 [▲] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]); mientras que la **FIG. 9B** representa el perfil de glutamina (eje Y; glutamina [mM]) de las mismas células frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 10A** representa la concentración de lactato en el medio (eje Y; lactato [g/l]) del cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a un pH fijo de 7,20 [□], 7,10 [■], 7,00 [◆], 6,90 [●] o 6,80 [▲] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]); mientras que la **FIG. 10B** representa el perfil de amonio (eje Y; NH_4^+ [mM]) de las mismas células frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 11A** representa las desviaciones del pH del cultivo celular respecto del punto de pH ajustado (eje X; pH del cultivo), donde las células CHO transfectadas con TNFR-Fc se cultivaron a un punto de pH ajustado de 7,20 [◇], 7,10 [■], 7,00 [◆], 6,90 [●] o 6,80 [▲] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]). La **FIG. 11B** representa la osmolaridad (eje X; osmolaridad [mOsm/kg]) de las mismas células cultivadas a un punto fijo de pH de 7,20 [◇], 7,10 [■], 7,00 [◆], 6,90 [●] o 6,80 [▲] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 12A** representa las productividades específicas de células, representadas por la Qp media acumulativa (eje X; Qp. med. acum. [mg normalizados/e⁹ células/día]), normalizado a la media de Qp media acumulativa del día de cultivo, del cultivo celular de células CHO transfectadas con TNFR-Fc cultivadas a un punto de pH ajustado de 7,20 [◇], 7,10 [■], 7,00 [◆], 6,90 [●] o 6,80 [▲] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]); mientras que la **FIG. 12B** representa el título de TNFR-Fc (eje X; título de producto [mg normalizados/l]), normalizados al título medio del día de recogida, de las mismas células frente al tiempo (tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 13A** representa el efecto de variar el punto ajustado de pH del cultivo (eje X; pH) de células CHO transfectadas con TNFR-Fc sobre la producción de TNFR-Fc mal plegado/agregado (eje Y; % de producto mal plegado/agregado). La **FIG. 13B** representa el efecto de variar el punto ajustado de pH del cultivo celular (eje X; pH) sobre la producción de HMWA (eje Y; % de especies de alto peso molecular).

El efecto de variar el punto ajustado de pH (eje X; pH) en el cultivo de células CHO transfectadas con el TNFR-Fc sobre el porcentaje de sialilación total de TNFR-Fc (eje Y; porcentaje de sialilación total del material de referencia) se demuestra en la **FIG. 14A**. La **FIG. 14B** demuestra el efecto de variar el punto ajustado de pH del cultivo celular (eje X; pH) en el cultivo celular de las mismas células sobre el porcentaje de glucanos unidos en N sialilados (□) o no sialilados (●) (eje Y; porcentaje de glucanos unidos en N totales).

La **FIG. 15** ilustra un perfil típico de fluorescencia (eje Y; fluorescencia, medida en mV) frente al tiempo de retención (eje X; minutos) que ilustra la sialilación unida a N de glucanos observada al someter a glucoformas de proteína marcadas con 2-aminobenzamida-(2-AB) liberadas por hidrazina a cromatografía en fase normal.

La **FIG. 16** ilustra los perfiles de fluorescencia (eje Y; mV) frente al tiempo de retención (eje X; minutos) que ilustran la sialilación unida a N de glucanos observada al someter a glucoformas de proteína marcadas con 2-aminobenzamida-(2-AB) liberadas por hidrazina a cromatografía en fase normal de las células CHO transfectadas con TNFR-Fc a diversos puntos ajustados de pH del cultivo.

La **FIG. 17** representa (A) la densidad de células viables (eje Y; células/ml), (B) la densidad celular total, que incluye las células tanto viables como no viables, (eje Y; células/ml), (C) la viabilidad celular (eje Y) y (D) los números integrados de células viables (IVC) (eje Y; e⁹ células*día/l) del cultivo celular de células que sobreexpresan sIL-13R cultivadas a 37,0°C [◆], 33,0°C [■], 32,0°C [●], 31,0°C [◇], 29,0°C [Δ] o TA [□] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 18** representa el título de sIL-13R, tanto en forma de dímero como de HMWA, (eje Y; sIL-13R [mg/l]) para los cultivos celulares que sobreexpresan sIL-13R, cultivados a 37,0°C [◆], 33,0°C [■], 32,0°C [●], 31,0°C [◇], 29,0°C [Δ] o TA [□] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 19A** representa la velocidad de producción diaria específica de sIL-13R (eje Y; Qp [ug/e⁹ células/d]) durante diversos intervalos de tiempo (eje X) para cultivos celulares que sobreexpresan sIL-13R, cultivados a 37,0°C, 33,0°C, 32,0°C, 31,0°C, 29,0°C o TA. La **FIG. 19B** representa las productividades medias acumulativas específicas de células (eje Y; Qp med. acum. [mg/e⁹ células/día]) frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]) para cultivos celulares que sobreexpresan sIL-13R, cultivadas a 37,0°C, 33,0°C, 32,0°C, 31,0°C, 29,0°C o TA.

La **FIG. 20** representa la velocidad de consumo de glucosa específica diaria (eje Y; Qglc [g/e⁹ células/d]) durante diferentes intervalos de tiempo (eje X) para cultivos celulares que sobreexpresan sIL-13R, cultivadas a 37,0°C, 33,0°C, 32,0°C, 31,0°C, 29,0°C o TA.

La **FIG. 21** representa la velocidad de consumo de glutamina específica diaria (eje Y; Qgln [mmol/e⁹ células/d]) durante diferentes intervalos de tiempo (eje X) para cultivos celulares que sobreexpresan sIL-13R, cultivadas a 37,0°C, 33,0°C, 32,0°C, 31,0°C, 29,0°C o TA.

La **FIG. 22** representa la concentración de lactato (eje Y; lactato [g/l]) en el medio de cultivo celular de células que sobreexpresan sIL-13R, cultivados a 37,0°C [◆], 33,0°C [■], 32,0°C [●], 31,0°C [◇], 29,0°C [Δ] o TA [□] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 23** representa la concentración de amonio (eje Y; amoniaco [mM]) en el medio de cultivo celular de células que sobreexpresan sIL-13R, cultivados a 37,0°C [◆], 33,0°C [■], 32,0°C [●], 31,0°C [◇], 29,0°C [Δ] o TA [□] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La **FIG. 24** representa el efecto de la temperatura de cultivo (eje X; temperatura de producción [°C]) sobre la producción de HMWA (eje Y; % de especies de alto peso molecular) en el día 9 de cultivo de células que sobreexpresan sIL-13R.

La **FIG. 25** representa el efecto de la temperatura de cultivo (eje X; temperatura de producción [°C]) sobre la producción de HMWA (eje Y; % de especies de alto peso molecular) en el día 18 de cultivo de células que sobreexpresan sIL-13R.

La **FIG. 26A** representa el porcentaje del dímero de sIL-13R (eje Y; % de dímero de sIL-13R) recuperado de la

proteína sIL-13R total producida en el medio condicionado de células que sobreexpresan sIL-13R cultivadas a 37,0°C [◆], 33,0°C [■], 32,0°C [●], 31,0°C [◇], 29,0°C [Δ] o TA [□] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]). La FIG. 26B representa el porcentaje de HMWA (eje Y; % de especies de elevado peso molecular) en relación con sIL-13R total en el medio condicionado de células que sobreexpresan sIL-13R frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

La FIG. 27 representa el título de dímero de sIL-13R (eje Y; solo dímero de sIL-13R [mg/l]) en el medio condicionado de células cultivadas a 37,0°C [◆], 33,0°C [■], 32,0°C [●], 31,0°C [◇], 29,0°C [Δ] o TA [□] frente al tiempo (eje X; tiempo de cultivo [d]).

Descripción detallada de la invención

La creencia predominante para producir proteínas terapéuticas en un cultivo de células de mamífero es que la temperatura durante la fase de producción debe ser de al menos 30,0°C y el pH debe ser de al menos 7,00. Sin embargo, el cultivo de células en un cultivo celular durante una fase de producción a temperaturas superiores a 30,0°C y a un pH por encima de 7,00 puede dar lugar a un aumento de la agregación de proteínas (también citada en el presente documento como formación de agregados de alto peso molecular o HMWA) y al mal plegamiento de proteínas y por lo tanto, a la producción de una menor cantidad de proteína funcional y usable.

La presente invención proporciona un procedimiento novedoso para la producción de proteínas en un cultivo celular, en el que el procedimiento da como resultado una reducción del mal plegado de proteínas y/o una reducción de la agregación de proteínas. En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para controlar el nivel de glucosilación de proteínas.

Proteínas producidas mediante los procedimientos de la divulgación

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "polipéptido" y "producto polipeptídico" son sinónimas de los términos "proteína" y "producto proteico", respectivamente y, tal como se entiende de manera general en la técnica, se refieren a al menos una cadena de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos secuenciales. En ciertas realizaciones, una "proteína de interés" o un "polipéptido de interés" o similares es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico exógena que se ha transfectado o transformado en una célula hospedadora, por ejemplo, se ha transfectado o transformado de manera transitoria o estable en una célula hospedadora. En ciertas realizaciones, en las que un ADN exógeno con el que se ha transfectado o transformado la célula hospedadora codifica la "proteína de interés", la secuencia de ácido nucleico del ADN exógeno determina la secuencia de aminoácidos. Esta secuencia puede ser una secuencia que se produzca en la naturaleza o, como alternativa, puede ser una secuencia diseñada por el hombre. En ciertas realizaciones, una "proteína de interés" es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico que es exógena para la célula hospedadora. La expresión de dicha proteína exógena de interés puede alterarse transfectando a una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico exógena que puede, por ejemplo, contener una o más secuencias reguladoras y/o codificar una proteína que potencia la expresión de la proteína de interés. En las realizaciones de la presente invención, se produce un polipéptido de interés en el cultivo celular, por ejemplo, para su posterior purificación.

El término "glucoproteína", "proteína glucosilada" y similares se refiere a proteínas que tienen restos de azúcar, por ejemplo, restos de oligosacáridos, unidos a sus cadenas laterales de asparagina (*N*-glucosilación) o a sus cadenas laterales de serina y/o treonina (*O*-glucosilación). Por ejemplo, un tipo común de *N*-glucosilación de proteínas es la sialilación de proteínas (también conocida como sialilación de *N*-glucanos). La mayoría de las proteínas secretoras y de membrana (por ejemplo, receptores de membrana) se glucosilan en el RE y/o el aparato de Golgi. Es conocido en la técnica que la glucosilación controla el plegamiento de las proteínas y su liberación en el RE. Además, en el Golgi se producen múltiples etapas de glucosilación/desglucosilación. Los conocimientos actuales acerca de los procesos de glucosilación de proteínas tanto en el RE como en el Golgi se revisan en Helenius y col. (2001) *Science* 291:2364-69; Parodi (2000) *Biochem. J.* 348:1-13; y Parodi (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69:69-93. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la presente invención, el polipéptido de interés es una glucoproteína de interés y la glucoproteína de interés se produce en cultivo celular, por ejemplo, para su posterior purificación. En una realización de la presente divulgación, la glucoproteína de interés es un receptor y puede ser un receptor soluble.

Pueden usarse los procedimientos y las composiciones de la presente divulgación para producir cualquier proteína de interés incluyendo, pero sin limitación, proteínas que tienen propiedades farmacéuticas, de diagnóstico, agrícolas y/o cualquiera de una serie de propiedades diferentes que son útiles en aplicaciones comerciales, experimentales y/u otras. Además, una proteína de interés puede ser un agente terapéutico proteico. A saber, un agente terapéutico proteico (o una proteína terapéutica) es una proteína que tiene un efecto biológico en una región del organismo sobre la que actúa o en una región del organismo sobre la que actúa de manera remota a través de intermedios. En ciertas realizaciones, las proteínas producidas usando procedimientos y/o composiciones de la presente invención puede procesarse y/o modificarse, antes de su administración a un sujeto en forma de una proteína terapéutica.

La presente divulgación puede usarse para cultivar células para la producción ventajosa de cualquier proteína terapéutica, tal como enzimas, receptores, fusiones de receptor, receptores solubles, fusiones de receptor soluble, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales), fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, proteínas de fusión de Fc, SMIP, citocinas, hormonas, factores reguladores, factores de crecimiento,

factores de coagulación o agentes de unión a antígeno farmacéutica o comercialmente relevantes. La lista anterior de proteínas es únicamente ilustrativa en cuanto a su naturaleza y no pretende ser una cita limitante. Una persona normalmente versada en la materia conocerá otras proteínas que pueden producirse de acuerdo con la presente divulgación y serán capaces de usar los procedimientos desvelados en el presente documento para producir dichas proteínas.

El término "anticuerpo" incluye una proteína que comprende al menos uno y típicamente dos, dominios VH o porciones de los mismos y/o al menos uno y típicamente dos, dominios VL o porciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se interconectan mediante, por ejemplo, enlaces disulfuro. Los anticuerpos o una porción de los mismos pueden obtenerse de cualquier origen, incluyendo, pero sin limitación, roedor, primate (por ejemplo, primate humano y no humano), camélido, tiburón así como producidos de manera recombinante, por ejemplo, quiméricos, humanizados y/o generados *in vitro*, por ejemplo, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

La divulgación también abarca "fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos", que incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro a la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; (vi) un dominio variable de camélido o camelizado, por ejemplo, un dominio VHH; (vii) un Fv monocatenario (scFv); (viii) un anticuerpo biespecífico; e (ix) uno o más fragmentos de unión a antígeno de una inmunoglobulina fusionado a una región Fc. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite fabricarlos como una proteína monocatenaria en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-26; Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83). Se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados en la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y se evalúa la función de los fragmentos del mismo modo que los anticuerpos intactos.

La divulgación también abarca anticuerpos de un solo dominio. Los anticuerpos de un solo dominio pueden incluir anticuerpos cuyas regiones determinantes de la complementariedad forman parte de un polipéptido de un solo dominio. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de un solo dominio derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, anticuerpos diseñados y armazones de un solo dominio distintos de los obtenidos de anticuerpos. Los anticuerpos de un solo dominio pueden cualquiera de la técnica o cualquier anticuerpo de un solo dominio futuro. Los anticuerpos de un solo dominio pueden proceder de cualquier especie incluyendo, pero sin limitación, ratón, humano, camello, llama, cabra, conejo, vaca y tiburón. De acuerdo con un aspecto de la divulgación, un anticuerpo de un solo dominio tal como se usa en el presente documento es un anticuerpo de un solo dominio de origen natural conocido como anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. Dichos anticuerpos de un solo dominio se divulgan, por ejemplo, en el documento WO 9404678. Por motivos de claridad, este dominio variable procedente de un anticuerpo de cadena pesada desprovisto de manera naturalmente de cadenas ligeras se conoce en el presente documento como un VHH o nanobody para distinguirlo de la VH convencional o las inmunoglobulinas de cuatro dominios. Dicha molécula VHH puede proceder de anticuerpos generados en especies de camélidos, por ejemplo, en camello, llama, dromedario, alpaca y guanaco. Otras especies aparte de los camélidos pueden producir anticuerpos de cadena pesada desprovistos naturalmente de cadena ligera; dichos VHH se encuentran dentro del alcance de la divulgación. Los anticuerpos de un solo dominio también incluyen IgNAR de tiburón; véase, por ejemplo, Dooley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103:1846-1851 (2006).

Aparte de los anticuerpos "bienespecíficos" o "bifuncionales", se entiende que un anticuerpo tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" es un híbrido de anticuerpo artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véanse, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

En las realizaciones donde la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo, este puede incluir al menos una o dos cadenas pesadas de longitud completa y al menos una o dos cadenas ligeras. Como alternativa, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos pueden incluir únicamente un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario). El anticuerpo o el fragmento del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal o de una sola especificidad. El anticuerpo o el fragmento del mismo también puede ser un anticuerpo humano, humanizado, quimérico, con CDR injertadas o generado *in vitro*. En otras realizaciones más, el anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada seleccionada entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra realización, el anticuerpo tiene una cadena ligera seleccionada entre, por ejemplo, kappa o lambda. En una realización, la región constante se encuentra alterada, por ejemplo, mutada, para modificar las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, para aumentar o reducir uno o más de: la unión al receptor Fc, la glucosilación del

anticuerpo, el número de restos de cisteína, la función celular efectora o la función de complemento). Típicamente, el anticuerpo o el fragmento del mismo se une específicamente a un antígeno predeterminado, por ejemplo, un antígeno asociado con un trastorno, por ejemplo, un trastorno neurodegenerativo, metabólico, inflamatorio, autoinmunitario y/o maligno.

- 5 Las proteínas descritas en el presente documento, opcionalmente, incluyen además un resto que potencia uno o más de, por ejemplo, estabilidad, función celular efectora o fijación a complemento. Por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno puede incluir además un resto pegilado, albúmina o una región constante de cande pesada y/o ligera.

10 Los anticuerpos se producen generalmente, por ejemplo, mediante técnicas de hibridoma tradicionales (Kohler y col., *Nature* 256:495 499 (1975)), procedimientos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567) o técnicas de presentación en fagos usando bibliotecas de anticuerpos (Clackson y col., *Nature* 352:624 628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222:581 597 (1991)). Para varias otras técnicas de producción de anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow y col., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

15 Además, los anticuerpos pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Estos marcadores incluyen radioetiquetas (por ejemplo, 131I o 99Tc), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) y otros restos químicos (por ejemplo, biotina).

20 Los fármacos "inmunofarmacéuticos modulares pequeños" (SMIP™) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA) son polipéptidos monocatenarios compuestos de un dominio de unión para una estructura afin, tal como un antígeno, un contrarreceptor o similares, un polipéptido de región bisagra que tiene uno o ningún resto de cisteína y dominios CH2 y CH3 de inmunoglobulina (véase también www.trubion.com). Los SMIP y sus usos y aplicaciones se desvelan en, por ejemplo, las Solicitudes Publicadas de Patente de los Estados Unidos n.º 2007/002159, 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534 y 2005/0238646 y la familia de patentes relacionadas con las mismas, todas las cuales se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad.

25 En una realización de la divulgación, la proteína de interés es un receptor soluble, por ejemplo, una proteína de fusión de receptor soluble. Las proteínas de membrana, por ejemplo, receptores, son normalmente proteínas glucosiladas. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención son particularmente beneficiosos para producir proteínas de fusión de receptor soluble no agregadas, plegadas adecuadamente y glucosiladas.

30 Las proteínas solubles, por ejemplo, receptores solubles, pueden producirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. En una realización de la divulgación, un receptor soluble comprende una región extracelular del receptor o un fragmento de la región extracelular del receptor. En otra realización de la divulgación, un receptor soluble comprende dos polipéptidos. El primer polipéptido comprende un receptor de longitud completa; como alternativa, el primer polipéptido comprende menos de la longitud completa del receptor, por ejemplo, una porción extracelular del receptor. En una realización de la divulgación, el primer polipéptido es un receptor de citocinas de longitud completa; como alternativa, el primer polipéptido tiene menos de la longitud completa del receptor de citocinas, por ejemplo, una porción extracelular del receptor de citocinas. Dicho receptor soluble también puede comprender un polipéptido adicional, por ejemplo, una secuencia de polipéptido de GST, Lex-A, MBP o una cadena de inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fc, una región constante de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE.

40 En una realización de la divulgación, un segundo polipéptido es preferentemente soluble. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido potencia la semivida, (por ejemplo, la semivida en suero o en circulación) del polipéptido unido. En realizaciones preferidas, el segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. Se conocen en la técnica polipéptidos de fusión de inmunoglobulina y se describen en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.516.964; 5.225.538; 5.428.130; 5.514.582; 5.714.147; y 5.455.165. Se sabe que las proteínas de fusión solubles son susceptibles a la agregación durante la producción y por lo tanto, los procedimientos de acuerdo con la divulgación proporcionan un beneficio particular en relación con cultivos celulares que producen proteínas de este tipo.

45 En algunas realizaciones, el segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa. Como alternativa, el segundo polipéptido comprende menos de la longitud completa del polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena pesada, cadena ligera, Fab, Fab₂, Fv o Fc. El segundo polinucleótido puede incluir la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. El segundo polipéptido puede incluir la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

50 En una realización de la invención, una proteína de fusión de receptor soluble comprende un inhibidor de factor de necrosis tumoral. En ciertas realizaciones, los inhibidores de factor de necrosis tumoral, en forma de receptores alfa y beta de factor de necrosis tumoral (TNFR-1; documento EP 417.563, publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014, publicado el 20 de marzo de 1991, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad) se expresan de acuerdo con sistemas y procedimientos de la presente invención (para una revisión, véase Naismith y Sprang, *J. Inflamm.* 47(1-2):1-7, 1995-96, incorporado al presente

documento por referencia en su totalidad). De acuerdo con algunas realizaciones, un inhibidor de factor de necrosis tumoral comprende un receptor de TNF soluble. En ciertas realizaciones, los inhibidores de TNF de la presente invención son formas solubles de TNFRI y TNFRII. En ciertas realizaciones, los inhibidores de TNF de la presente invención son proteínas de unión a TNF solubles. En ciertas realizaciones, los inhibidores de TNF de la presente invención son proteínas de fusión de TNFR, por ejemplo, TNFR-Ig o TNFR-Fc. Tal como se usa en el presente documento, "etanercept", se refiere a un TNFR-Fc, que es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor de TNF-alfa p75, consistiendo cada molécula en una porción de Fc de 235 aminoácidos de IgG1 humana. De acuerdo con la invención, las células que expresan TNFR-Fc se cultivan en un cultivo celular a una temperatura reducida y/o a un pH reducido para reducir la cantidad de proteína mal plegada y/o de agregados de alto peso molecular durante la producción de TNFR-Fc. En ciertas realizaciones, las células que expresan TNFR-Fc se cultivan en un cultivo celular a una temperatura reducida y/o a un pH reducido para modular la glucosilación durante la producción de TNFR-Fc.

En otra realización de la invención, la proteína de fusión de receptor soluble es el sIL-13R. Tal como se usa en el presente documento, el receptor soluble de IL-13 (sIL-13R) se refiere a una proteína de fusión recombinante que incluye el dominio extracelular (ECD) del receptor de la interleucina (IL)-13-alfa2 humana y la región Fc de la cadena pesada de IgG1. sIL-13R está compuesto de dos cadenas de polipéptido idénticas (es decir, dímero de dos cadenas de polipéptido) que parece estar unido mediante enlaces disulfuro intermoleculares. La proteína de fusión de receptor sIL-13R soluble y sus usos se divulgan en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.710.023, incorporada al presente documento por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, el segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo silvestre. La función efectora de Fc incluye, por ejemplo, la unión al receptor Fc, fijación al complemento y actividad eliminadora de linfocitos T (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.136.310). Los procedimientos para evaluar la actividad eliminadora de linfocitos T, la función efectora de Fc y la estabilidad de los anticuerpos se conocen en la técnica. En una realización, el segundo polipéptido tiene una afinidad baja o nula por el receptor de Fc. En una realización alternativa, el segundo polipéptido tiene una afinidad baja o nula por la proteína de complemento C1q.

Las proteínas de fusión, por ejemplo, proteínas de fusión de receptor soluble, pueden incluir adicionalmente una secuencia enlazadora que une el receptor soluble o un fragmento del mismo al segundo resto. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un enlazador peptídico, por ejemplo, un enlazador peptídico de aproximadamente 2 a 20, más preferentemente de aproximadamente 5 a 10, aminoácidos de longitud.

En otras realizaciones, pueden añadirse secuencias de aminoácidos adicionales al extremo N o C-terminal de la proteína de fusión para facilitar su expresión, detección y/o aislamiento o purificación. Por ejemplo, la proteína de fusión de receptor soluble puede unirse a uno o más restos adicionales, por ejemplo, GST, etiqueta His6, etiqueta FLAG. Por ejemplo, la proteína de fusión puede unirse adicionalmente a una proteína de fusión de GST en la que las secuencias de la proteína de fusión están fusionadas al extremo C-terminal de las secuencias de GST (es decir, glutatión-s-transferasa). Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la solubilidad, es decir, aumentan el plegamiento preciso y por lo tanto, mejoran la purificación de la proteína de fusión.

Procedimientos de producción de proteínas en cultivo celular

Los términos "cultivo" y "cultivo celular" se usan en el presente documento para referirse a una población de células que se pone en contacto con un medio de cultivo celular en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Tal como se usa en el presente documento, estos términos pueden referirse a la combinación que comprende la población celular (por ejemplo, el cultivo de células animales) y el medio con el que se pone en contacto la población.

Las células usadas en la presente invención pueden ser células hospedadoras recombinantes, por ejemplo, células hospedadoras eucariotas, es decir, células transfectadas con una construcción de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, incluyendo células animales. La expresión "células animales" abarca células de invertebrado, de vertebrado no mamífero (por ejemplo, de ave, reptil y anfibio) y de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de invertebrado incluyen las siguientes células de insecto: *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de seda/polilla de la seda). En realizaciones preferidas, el cultivo celular es un cultivo de células de mamífero.

Una serie de líneas celulares de mamífero son células hospedadoras adecuadas para la expresión recombinante de polipéptidos de interés. Las líneas celulares hospedadoras de mamífero incluyen, por ejemplo, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, células L, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, células Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, mielomas murinos (por ejemplo, SP2/0 y NS0) y células C2C12, así como líneas celulares de primate transformadas, hibridomas, células diploides normales y cepas celulares procedentes del cultivo *in vitro* de tejido primario y de explantes primarios. Puede usarse cualquier célula eucariota que sea capaz de expresar el polipéptido de interés en los procedimientos divulgados. Hay disponibles numerosas líneas celulares de fuentes comerciales, tales como la

American Type Culture Collection (ATCC). En una realización de la invención, el cultivo celular, por ejemplo, el cultivo celular a gran escala, emplea células CHO.

5 Aunque en determinadas realizaciones el cultivo celular comprende células de mamífero, un experto en la materia comprenderá que es posible producir de manera recombinante polipéptidos de interés en eucariotas inferiores, tales como levaduras o en procariotas, tales como bacterias. Un experto en la materia sabrá que las condiciones de cultivo para los cultivos celulares de levaduras y bacterias diferirán de las condiciones de cultivo de células animales y comprenderán cómo han de ajustarse estas condiciones para optimizar el cultivo celular y/o la producción de proteína.

10 Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar el polipéptido de interés. La expresión en bacterias puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Por lo tanto, puede ser necesario el repliegamiento de la proteína recombinante para producir un material activo o más activo. Se conocen en la técnica varios procedimientos para obtener proteínas heterólogas plegadas de manera adecuada a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos procedimientos implican generalmente solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión, después, desnaturalizar la proteína completamente usando un agente caotrópico. Cuando hay presentes restos de cisteína en la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína, normalmente es necesario llevar a cabo el repliegamiento en un ambiente que permite la correcta formación de enlaces disulfuro (un sistema redox). Se conocen en la técnica procedimientos generales de repliegamiento y se divulgan en, por ejemplo, Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185:187-95, el documento EP 0433225 y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.399.677.

20 Las cepas de levadura adecuadas para la producción de polipéptidos incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar el polipéptido de interés.

25 El término "biorreactor", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier vaso usado para el cultivo de un cultivo de células eucariotas, por ejemplo, un cultivo de células animales (por ejemplo, un cultivo de células de mamífero). El biorreactor puede ser de cualquier tamaño en tanto que sea útil para el cultivo de células, por ejemplo, células de mamífero. Típicamente, el biorreactor será de al menos 30 ml y puede ser de al menos de 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más o cualquier volumen intermedio. Las condiciones internas del biorreactor, incluyendo, pero sin limitación, el pH y la temperatura, se controlan típicamente durante el periodo de cultivo. La expresión "biorreactor de producción", tal como se usa en el presente documento, se refiere al biorreactor final usado en la producción del polipéptido o la proteína de interés. El volumen de un biorreactor de producción de cultivo celular a gran escala es por lo general mayor de 100 ml, típicamente de al menos aproximadamente 10 litros y puede ser de 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000 litros o más o de cualquier volumen intermedio. Un biorreactor o biorreactor de producción adecuado puede estar compuesto de (es decir, hecho de) cualquier material que sea adecuado para contener cultivos celulares suspendidos en medio en las condiciones de cultivo de la presente invención y favorezca el crecimiento y la viabilidad celular, incluyendo vidrio, plástico o metal; los materiales no deben interferir con la expresión o la estabilidad del producto producido, por ejemplo, un producto de proteína terapéutica. Una persona normalmente versada en la materia será consciente de, y será capaz de seleccionar, biorreactores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención.

40 Los términos "medio", "medio de cultivo celular", y "medio de cultivo", tal como se usan en el presente documento, se refiere a una solución que contiene nutrientes que alimentan a las células animales en crecimiento, por ejemplo, células de mamífero y también puede referirse a medio en combinación con células. La expresión "medio de inoculación" se refiere al medio que se usa para formar un cultivo celular. El medio de inoculación puede diferir o no en la composición del medio usado durante el resto de la fase de crecimiento celular. Típicamente, las soluciones de medio proporcionan, sin limitación, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos que necesita la célula para un crecimiento al menos mínimo y/o su supervivencia. La solución también puede contener componentes que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa normal, incluyendo hormonas y factores de crecimiento. La solución se formula, preferentemente, con un pH y una concentración de sal óptima para la supervivencia y la proliferación celular. En al menos una realización, el medio es un medio definido. Los medios definidos son medios en los que todos los componentes tienen una estructura química conocida. En otras realizaciones de la invención, el medio puede contener aminoácidos procedentes de cualquier fuente o procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, aminoácidos procedentes de adiciones de un solo aminoácido o de adiciones de peptona o de hidrolizado de proteína (incluyendo fuentes animales o vegetales). En otras realizaciones más de la invención, el medio usado durante la fase de crecimiento celular puede contener medio concentrado, es decir, medio que contiene una concentración mayor de nutrientes que la normalmente necesaria y proporcionada normalmente a un cultivo en crecimiento. Un experto en la materia reconocerá qué medio celular, medio de inoculación, etc. es adecuado para cultivar una célula particular, por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHO) y la cantidad de glucosa y otros nutrientes (por ejemplo, glutamina, hierro, oligoelementos D) o agentes diseñados para controlar otras variables de cultivo (por ejemplo, la cantidad de espumante, osmolalidad) que debe contener el medio (véase, por ejemplo, Mather, J.P., y col. (1999) "Culture media, animal cells, large scale production", Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2:777-85; Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos n.º 2006/0121568; incorporándose ambas al presente documento por referencia en su totalidad). La presente invención

- 5 también contempla variantes de dichos medios conocidos, incluyendo, por ejemplo, variantes enriquecidas en nutrientes de dichos medios. La expresión "densidad celular", tal como se usa en el presente documento, se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio. La expresión "densidad celular viable", tal como se usa en el presente documento, se refiere al número de células vivas presentes en un volumen de medio dado bajo un conjunto de condiciones experimentales determinado.
- 10 La expresión "viabilidad celular", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir bajo un conjunto dado de condiciones de cultivo o de variaciones experimentales. La expresión, tal como se usa en el presente documento, también se refiere a aquella porción de células que se encuentran vivas en un momento concreto en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.
- 15 Las expresiones "densidad celular viable integrada", "número integrado de células viables" o "IVC", tal como se usa en el presente documento, se refieren a la densidad media de células viables a lo largo del cultivo multiplicado por la cantidad de tiempo que se ha llevado a cabo el cultivo. Cuando la cantidad de proteína producida es proporcional al número de células viables presentes durante el transcurso del cultivo, la densidad de células viables integrada es una herramienta útil para estimar la cantidad de proteína producida durante el transcurso del cultivo celular.
- 20 Los procedimientos de la presente invención pueden aplicarse a células cultivadas en un cultivo discontinuo, un cultivo discontinuo alimentado, un cultivo en perfusión, un cultivo discontinuo alimentado modificado (véase la Solicitud Provisional de los Estados Unidos número 60/954.922), cultivo discontinuo realimentado o cualquier combinación de los mismos.
- 25 La expresión "cultivo discontinuo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que todos los componentes que se usarán en última instancia para cultivar las células, incluyendo el medio así como las propias células, se proporcionan al inicio del proceso de cultivo. Normalmente, un cultivo discontinuo se interrumpe en un momento concreto y se recogen las células y/o los componentes en el medio y opcionalmente, se purifican.
- 30 La expresión "cultivo discontinuo alimentado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento determinado posterior al inicio del proceso de cultivo. Los componentes proporcionados comprenden típicamente suplementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. Normalmente, un cultivo discontinuo alimentado se interrumpe en un momento concreto y se recogen las células y/o los componentes en el medio y opcionalmente, se purifican.
- 35 La expresión "cultivo en perfusión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento para cultivar células en el que se proporciona medio fresco adicional, ya sea de manera continua durante un periodo de tiempo concreto o de manera intermitente durante un periodo de tiempo concreto, al cultivo (posterior al comienzo del proceso de cultivo) y simultáneamente, se retira el medio gastado. El medio fresco normalmente proporciona suplementos nutricionales para las células que se han agotado durante el proceso de cultivo. El producto polipeptídico, que puede estar presente en el medio gastado, se purifica opcionalmente. La perfusión también permite la eliminación de productos de desecho celular (aclorado) del cultivo celular que crece en el biorreactor.
- 40 La expresión "cultivo discontinuo alimentado modificado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento para cultivar células que combina tanto el procedimiento de cultivo discontinuo alimentado como el procedimiento de cultivo de perfusión. El procedimiento de cultivo discontinuo alimentado se describe en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos número 60/954.922, incorporada al presente documento por referencia en su totalidad.
- 45 La invención también puede ponerse en práctica con procedimientos de realimentación discontinuos. Se cree que el pH reducido proporcionará un mejor manejo para reducir el mal plegamiento y/o la agregación de proteínas y para modificar la glucosilación en este tipo de cultivo celular.
- 50 En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende inocular, en primer lugar, el cultivo celular con el medio de inoculación durante la fase de crecimiento del cultivo celular y posteriormente, cambiar las células a la fase de producción, en el que se ajusta la temperatura y/o el pH del cultivo celular a una temperatura reducida y/o a un pH reducido. La fase de crecimiento, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una etapa en el cultivo celular en la que las células se cultivan para lograr la densidad celular óptima para la producción de proteínas.
- 55 En otra realización, después de la fase de crecimiento, puede cambiarse a las células a la fase de producción, que puede producirse a una temperatura diferentes y/o a un pH diferente a la fase de crecimiento, por ejemplo, a temperatura reducida y/o a pH reducido. En realizaciones, el cultivo celular puede cambiarse de la fase de crecimiento a la fase de producción un día después de la inoculación. En otras realizaciones, el cultivo celular puede cambiarse de la fase de crecimiento a la fase de producción cinco días después de la inoculación. Cuando se cambia el cultivo celular de la fase de crecimiento a la fase de producción, el cambio puede ser relativamente gradual. Como alternativa, el cambio puede ser abrupto. Con un cambio gradual, pueden ajustarse la temperatura

y/o el pH escalonadamente, por ejemplo, reducirse. Como alternativa, pueden ajustarse la temperatura y/o el pH mediante intervalos discretos.

5 La fase de producción del cultivo celular es una etapa en el cultivo celular en el que las células se cultivan en condiciones óptimas para producir el polipéptido de interés, por ejemplo, una proteína terapéutica. Durante la fase de producción, la temperatura y/o el pH reducido del cultivo celular pueden seleccionarse basándose en la temperatura y/o el pH al cual el cultivo celular permanece viable, al cual se produce un alto nivel de proteína, al cual la producción y la acumulación de productos de desecho metabólicos, por ejemplo, ácido láctico y amoníaco, se minimizan, al cual la calidad del producto de la proteína se ha controlado de manera adecuada y/o cualquier combinación de estos u otros factores considerados como importantes por el experto en la materia.

10 En una realización alternativa de la invención, el procedimiento de la invención comprende inocular el cultivo celular a una temperatura reducida y/o a un pH reducido, de tal forma que no es necesario un cambio de temperatura o pH al comienzo de la fase de producción. Un experto en la materia sabrá controlar la temperatura y el pH del cultivo celular de tal forma que la temperatura y el pH no se desvíen respecto de los puntos ajustados de temperatura y pH establecidos. Por ejemplo, un experto en la materia sabrá usar una base, por ejemplo, base de carbonato de sodio, para impedir que los cultivos se desvíen por debajo del pH establecido.

15 En los ejemplos más adelante en el presente documento, el medio de cultivo celular comenzó a un pH por encima del punto establecido de pH diana y no se produjo un ajuste deliberado del punto establecido de pH. Sin embargo, también podría incluirse el uso de un ajuste de pH durante el transcurso del cultivo celular, tal como comprenderán los expertos en la materia. De forma análoga, también es posible iniciar el cultivo a baja temperatura sin ajuste. Por ejemplo, el proceso puede comprender únicamente una fase de producción.

20 "Temperatura reducida", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una temperatura por debajo de la temperatura convencional para el cultivo celular (la temperatura a la que normalmente se cultivan las células) para ese tipo de célula. Por ejemplo, en realizaciones de la presente divulgación, donde las células son células de mamífero, el cultivo celular en la fase de producción se encuentra preferentemente dentro del intervalo de 24,0°C a menos de 30,0°C y más preferentemente, en un intervalo de 27,0°C a menos de 30,0°C. Por ejemplo, la temperatura reducida del cultivo celular es de 24,0°C, 24,5°C, 25,0°C, 25,5°C, 26,0°C, 26,5°C, 27,0°C, 27,5°C, 28,0°C, 28,5°C, 29,0°C, 29,5°C, 29,6°C, 29,7°C, 29,8°C y 29,9°C. En la realización más preferida de la invención descrita en el presente documento, la temperatura reducida del cultivo celular es una temperatura de aproximadamente 29,5°C. La temperatura reducida para células distintas de las de mamífero puede determinarse individualmente para cada caso por una persona normalmente versada en la materia.

25 "pH reducido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un punto establecido de pH por debajo del pH convencional para el cultivo celular (el pH al que normalmente se cultivan las células) de ese tipo de célula concreto. En realizaciones de la presente divulgación, donde las células son células de mamífero, el pH del cultivo celular en la fase de producción es inferior a 7,00. En realizaciones de la divulgación, el pH reducido del cultivo celular se encuentra en un intervalo de 6,50 a menos de 7,00, preferentemente, en un intervalo de 6,80 a menos de 7,00. Por ejemplo, el pH reducido del cultivo celular es de 6,80, 6,85, 6,90, 6,95, 6,96, 6,97, 6,98 y 6,99. En la realización más preferida de la invención, el pH reducido del cultivo celular es de aproximadamente 6,95. El pH reducido para células distintas de las de mamífero puede determinarse individualmente para cada caso por una persona normalmente versada en la materia.

30 Un experto en la materia entenderá que, dependiendo del tipo celular del cultivo celular, diferirán la temperatura y el pH convencionales (a diferencia de la temperatura y el pH reducido). Por ejemplo, la temperatura y el pH convencionales para la mayoría de células de mamífero, por ejemplo, células CHO, es superior a 30,0° (tal como, por ejemplo, 37,0°C) y por encima de 7,00 (tal como, por ejemplo, 7,20), respectivamente. Un experto en la materia también entenderá que debido a que la temperatura y el pH convencionales para otros tipos celulares, por ejemplo, células de insecto, pueden diferir respecto de la temperatura convencional para células de mamífero, los procedimientos de la invención utilizarán una temperatura reducida diferente y un pH reducido diferente para dichas células.

35 En determinadas realizaciones de la presente invención, el experto en la materia considerará beneficioso o necesario controlar periódicamente las condiciones particulares del cultivo celular en crecimiento. A modo de ejemplos no limitantes, puede ser necesario o beneficioso controlar, por ejemplo, la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la densidad celular, la viabilidad celular, la densidad celular viable integrada, los niveles de lactato, los niveles de amonio, los niveles de glucosa, los niveles de glutamina, la osmolalidad, el título del polipéptido expresado, etc. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas para medir dichas condiciones/criterios. Por ejemplo, la densidad celular puede medirse usando un hemocitómetro, un dispositivo de recuento de células automatizado (por ejemplo, un contador Coulter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) o el examen de la densidad celular (por ejemplo, CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA). La densidad de células viables puede determinarse tiñendo una muestra de cultivo con azul de tripano. Los niveles de lactato, amonio, glucosa y glutamina, así como el oxígeno disuelto y el pH pueden medirse, por ejemplo, con el analizador de química BioProfile 400 (Nova Biochemical, Waltham, MA), que toma mediciones de nutrientes clave, metabolitos y gases en el medio de cultivo celular. El oxígeno disuelto y el pH también pueden medirse usando, por ejemplo, un analizador de gases en sangre (por

ejemplo, un analizador de pH/gases en sangre Rapidlab 248 de Bayer (Bayer Healthcare LLC, East Walpole, MA)). La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto también pueden medirse mediante, por ejemplo, diversos tipos de sondas *in situ*. La osmolalidad del cultivo celular puede medirse mediante, por ejemplo, un osmómetro de punto de congelación. Puede usarse HPLC para determinar, por ejemplo, los niveles de lactato, amonio o del polipéptido o proteína expresado. En una realización de la invención, pueden determinarse los niveles de polipéptido expresado usando, por ejemplo, HPLC de proteína A. Como alternativa, puede determinarse el nivel de polipéptido o proteína expresado mediante técnicas convencionales, tales como tinción de Coomassie de geles de SDS-PAGE, transferencia de Western, ensayos Bradford, ensayos Lowry, ensayos biuret y absorbancia de UV. Puede ser necesario monitorizar las modificaciones postraduccionales del polipéptido o la proteína expresado, por ejemplo, glucosilación. También puede ser beneficioso monitorizar otras modificaciones postraduccionales de la proteína, por ejemplo, la fosforilación, etc. Para monitorizar determinadas condiciones de cultivo, puede ser necesario retirar pequeñas alícuotas del cultivo para su análisis. Una persona normalmente versada en la materia entenderá que dicha retirada puede potencialmente introducir contaminación en el cultivo celular y tomará las precauciones adecuadas para minimizar el riesgo de dicha contaminación.

En una realización de la invención, un experto en la materia monitorizará el número integrado de células viables a la temperatura reducida de cultivo celular y/o al pH reducido. Preferentemente, el cultivo de células a temperatura reducida y/o a pH reducido reduce la densidad integrada de células viables en un 20%, más preferentemente menos de un 20% (por ejemplo, un 15%). En otra realización de la invención, un experto en la materia monitorizará la viabilidad celular a la temperatura reducida de cultivo celular y/o al pH reducido. Preferentemente, el cultivo de células a temperatura reducida y/o a pH reducido reduce la viabilidad celular menos de un 15%, más preferentemente menos de un 5%.

La glucosa es la principal fuente de energía para el cultivo celular. Una desviación significativa en el consumo de glucosa en el cultivo celular podría indicar un efecto negativo de las condiciones de cultivo celular sobre la salud del cultivo celular. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el cultivo de células a la temperatura reducida y/o al pH reducido da como resultado un cambio mínimo, por ejemplo, reducción, en el consumo de glucosa del cultivo celular.

La glutamina es una fuente de energía alternativa para el cultivo celular y es una fuente importante de nitrógeno para diversas moléculas, por ejemplo, aminoácidos, en el cultivo celular. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el cultivo de células a la temperatura reducida y/o al pH reducido da como resultado un cambio mínimo, por ejemplo, reducción, en el consumo de glutamina del cultivo celular.

En otra realización de la invención, un experto monitorizará la producción de productos de desecho, por ejemplo, la producción de lactato y amoniaco, en el cultivo celular. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el cultivo de células a la temperatura y/o al pH reducidos da como resultado un cambio mínimo, por ejemplo, aumento, en la producción de lactato y amoniaco. En algunas realizaciones de la invención, el cultivo de células a una temperatura y/o un pH reducidos puede minimizar la producción de lactato y amoniaco.

Además, en una realización preferida de la presente invención, el cultivo de células a una temperatura y/o un pH reducidos da como resultado una reducción en la productividad media acumulativa y en el título del producto. El término "título", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad total del polipéptido de interés, por ejemplo, una glucoproteína de interés, producida por un cultivo celular (por ejemplo, un cultivo de células animales), dividida entre una cantidad dada de volumen de medio; por lo tanto, "título" se refiere a una concentración. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de polipéptido por litro de medio. Preferentemente, cualquier reducción en la productividad celular y en el título del producto experimentados en el cultivo celular se ve compensada por la reducción en la producción de producto proteico agregado o mal plegado, por ejemplo, una producción reducida de HMWA.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "proteína agregada" se refiere a los agrupamientos de proteína, es decir, agregados de elevado peso molecular, que producen un producto proteico no funcional, subóptimo o no deseado. La expresión "proteína mal plegada" se refiere a una proteína plegada de un modo inadecuado, normalmente, una proteína que ya no puede mostrar una actividad biológica normal, por ejemplo, una actividad enzimática normal. Un experto en la materia sabrá que los agregados de proteína pueden comprender proteínas tanto correctamente plegadas como mal plegadas. Las proteínas agregadas o mal plegadas se forman normalmente en cultivo celular de sobreexpresión, por ejemplo, un cultivo celular que sobreexpresa una proteína de interés, por ejemplo, una glucoproteína de interés. Por ejemplo, la agregación puede estar causada por interacciones hidrófobas no específicas de cadenas polipeptídicas no plegadas o mediante la interacción con intermedios de plegamiento. En una realización de la invención, el cultivo de células a la temperatura reducida y/o al pH reducido da como resultado una reducción de al menos el 50% en el mal plegamiento/la agregación de la proteína, preferentemente, una reducción de aproximadamente el 60% en el mal plegamiento/la agregación de proteína. Un experto en la materia conocerá las técnicas necesarias para monitorizar la agregación/el mal plegamiento de la proteína, por ejemplo, HPLC de interacción hidrófoba (HIC-HPLC).

La expresión "agregado de alto peso molecular" (HMWA) se refiere a un subproducto no deseado de la producción de proteína que es el resultado de la asociación entre al menos dos proteínas. Un "agregado de alto peso molecular"

- puede ser una asociación entre al menos dos de las mismas proteínas y/o la asociación entre la proteína de interés y otras proteínas halladas en el cultivo celular, por ejemplo, proteínas de la célula hospedadora. La asociación puede surgir mediante cualquier procedimiento, incluyendo, pero sin limitación, reticulación covalente, no covalente, por disulfuro y/o no reducible. Un experto en la materia comprenderá que cuando una proteína se encuentra activa en una forma multimérica (por ejemplo, una forma de dímero), es decir, cuando se necesita más de una cadena de polipéptido para la actividad de la proteína, la expresión "agregados de alto peso molecular" se referirá a una asociación entre dos o más de dichas formas multiméricas. En una realización de la invención, una proteína que está activa en una forma multimérica es un receptor, por ejemplo, un receptor de citocinas (por ejemplo, sIL-13R). En una realización, el cultivo de células a una temperatura y/o un pH reducidos da como resultado una reducción de aproximadamente un 10%, preferentemente una reducción de aproximadamente un 40%, más preferentemente, una reducción de aproximadamente un 50% y aún más preferentemente una reducción de aproximadamente un 80% o más en los agregados de alto peso molecular o cualquier valor intermedio. Un experto en la materia conocerá las técnicas necesarias para monitorizar la producción de agregados de alto peso molecular, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños (SEC-HPLC).
- En otro aspecto de la divulgación, la temperatura y/o el pH en un cultivo celular se usan para cambiar la glucosilación de proteínas, por ejemplo, la sialilación de proteínas, a un nivel predeterminado. Por ejemplo, la reducción del pH y/o la temperatura del cultivo celular puede dar lugar a la reducción en la glucosilación tanto unida a *N* como a *O*, por ejemplo, una reducción en la sialilación de *N*-glucano. El cambio en la glucosilación de proteínas (por ejemplo, sialilación) puede afectar a la estabilidad, la actividad enzimática, el tiempo de vida en circulación y la inmunogenicidad de la proteína terapéutica. Un experto en la materia puede controlar el grado de glucosilación (por ejemplo, sialilación) para asegurar que el cambio de la temperatura y/o el pH logra un tipo y nivel deseado de glucosilación de las proteínas. Pueden usarse técnicas cromatográficas, por ejemplo, cromatografía en fase normal (NPC) para monitorizar la glucosilación de proteína del producto proteico.
- Al final de la fase de producción, se cosechan las células y se recoge y purifica el polipéptido de interés. Preferentemente, al final de la fase de producción, el polipéptido de interés muestra un mal plegamiento y/o una agregación reducidos, a la vez que se conserva un patrón de glucosilación aceptable. En una realización de la invención, el polipéptido de interés al final del proceso de producción se encuentra en una forma soluble (por ejemplo, el polipéptido de interés es un receptor soluble, por ejemplo, un receptor soluble de citocinas). Dichas formas solubles del polipéptido pueden purificarse a partir de un medio condicionado.
- Las formas unidas a membrana del polipéptido pueden purificarse preparando una fracción total de membrana de las células expresoras y extrayendo las membranas con un detergente no iónico, tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA). Las proteínas citosólicas o nucleares pueden prepararse lisando las células hospedadoras (mediante fuerza mecánica, Parrbomb, sonicación, detergente, etc.), retirando la fracción de membrana celular por centrifugación y reteniendo el sobrenadante.
- El polipéptido puede purificarse usando otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede concentrarse un polipéptido producido mediante los procedimientos divulgados usando un filtro para la concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración AMICON® o PELLICON® (Millipore, Billerica, MA). Después de la etapa de concentración, puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación, tal como un medio de filtración en gel. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónico (por ejemplo, una columna MonoQ, Amersham Biosciences, Piscataway, NH); dicha resina contiene una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetil (DEAE) o polietilenimina (PEI) colgantes. Las matrices usadas para la purificación pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede usarse una etapa de intercambio catiónico para la purificación de proteínas. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo (por ejemplo, columnas S-SEPHAROSE®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).
- La purificación del polipéptido del sobrenadante de cultivo también puede incluir una o más etapas en columna sobre resinas de afinidad, tales como concanavalina A-agarosa, AF-HEPARIN650, heparina-TOYOPEARL® o azul Cibacron 3GA SEPHAROSE® (Tosoh Biosciences, San Francisco, CA); columnas de cromatografía de interacción hidrófoba usando resinas tales como éter de fenilo, éter de butilo o éter de propilo; o columnas de inmunofinidad usando anticuerpos para la proteína marcada. Finalmente, pueden usarse una o más etapas HPLC que emplean medio HPLC hidrófobo, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes (por ejemplo, columnas de Ni-NTA), para purificar adicionalmente la proteína. Como alternativa, los polipéptidos pueden expresarse de manera recombinante en una forma que facilita su purificación. Por ejemplo, los polipéptidos pueden expresarse en forma de una fusión con proteínas, tales como proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX); se encuentran comercialmente disponibles kits para la expresión y purificación de dichas proteínas de fusión de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ) e Invitrogen (Carlsbad, CA), respectivamente. Las proteínas también pueden etiquetarse con un epítipo pequeño (por ejemplo, etiquetas His, myc o Flag) y posteriormente identificarse o purificarse usando un anticuerpo específico para el epítipo seleccionado. Hay disponibles de numerosas fuentes comerciales anticuerpos para epítipos comunes. Pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores en diversas combinaciones o con otros procedimientos conocidos, para purificar un polipéptido de interés, por ejemplo, una proteína terapéutica, producida

mediante los procedimientos de la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

En determinadas realizaciones de la invención, las proteínas producidas de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención pueden ser útiles en la preparación de agentes farmacéuticos. Las proteínas producidas de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse en primer lugar para su suministro por cualquier ruta disponible, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, la ruta parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen típicamente una proteína purificada expresada por una línea celular de mamífero, un agente de suministro (por ejemplo, un polímero catiónico, transportador molecular peptídico, tensioactivo, etc., como se ha descrito anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye materiales no tóxicos que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos, por ejemplo, disolventes, medio de dispersión, recubrimiento, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Las características del transportador dependerán de la vía de administración. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios a las composiciones.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con la vía de administración prevista. Cuando se administra la proteína terapéutica producida de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención en una forma oral, la composición farmacéutica se encontrará en forma de comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener además un vehículo sólido, tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contendrán de aproximadamente un 5 a un 95% de agente de unión y preferentemente, de aproximadamente un 25 a un 90% de agente de unión. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, tales como aceite de sésamo, aceite de cacahuete (teniendo en cuenta la aparición de reacciones alérgicas en la población), aceite mineral, aceite de soja, aceite de sésamo o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene de aproximadamente un 0,5 a un 90% en peso del agente de unión y preferentemente, de aproximadamente un 1 a un 50% en peso del agente de unión.

Cuando se administra la proteína terapéutica producida de acuerdo con uno o más procedimientos de la presente invención mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína terapéutica se encontrará en forma de una solución acuosa despirogenada, parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones de proteína parenteralmente aceptables, en lo referente al pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la materia. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además de la proteína terapéutica, un vehículo isotónico, tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer lactada u otros vehículos que se conocen en la materia. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otro aditivo conocido por los expertos en la materia.

La formulación adicional de las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas terapéuticas producidas mediante uno o más procedimientos de la presente invención será conocida por los expertos en la materia. Una persona normalmente versada en la materia será consciente de las formulaciones en dosis unitaria adecuadas para proteínas producidas de acuerdo con la presente invención.

Los contenidos íntegros de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente citadas a lo largo de la presente solicitud se incorporan al presente documento por referencia.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se exponen para ayudar a comprender la invención pero no pretenden ser y no deben interpretarse de modo alguno como, limitantes del alcance de la invención. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de procedimientos convencionales, por ejemplo, clonación, transfección y aspectos básicos de procedimientos para sobreexpresar proteínas en líneas celulares. Dichos procedimientos son de sobra conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 1

Producción de proteína TNFR-Fc

Ejemplo 1.1: Efectos de la temperatura reducida en el rendimiento de cultivo celular de células CHO recombinantes y sobre la cantidad de producto de proteína de fusión de TNFR-Fc

Ejemplo 1.1.1: Materiales y procedimientos

Se inocularon células de ovario de hámster chino (CHO) que sobreexpresaban la glucoproteína recombinante TNFR-Fc a concentraciones y en condiciones idénticas en cuatro biorreactores de laboratorio separados a 37,0°C. Las células se cultivaron en un cultivo discontinuo alimentado durante un día, seguido de un cambio de temperatura a 30,0°C, 29,0°C, 28,0°C o 27,0°C. El límite inferior de punto de pH establecido del cultivo fue de 7,00. Se retiró una muestra de células del cultivo cada día para medir diversas condiciones del cultivo celular, por ejemplo, números integrados de células viables, viabilidades celulares, perfil de glucosa residual, perfil de glutamina residual, concentraciones de lactato y amoniaco, productividad celular media acumulativa (Qp), título de producto, niveles de producto mal plegado/agregado, niveles de agregados de elevado peso molecular, niveles de sialilación y pH.

Los números integrados de células viables (IVC) se calcularon midiendo la densidad celular usando examen de la densidad celular (por ejemplo, CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA) y se normalizaron al IVC medio del día de recogida. El IVC medio del día de recogida se determinó calculando la media aritmética de la densidad integrada de células viables del día de recogida (por ejemplo, el día 10) para todas las condiciones experimentales ensayadas. Después, se escalaron todos los valores de IVC individuales al IVC medio en la recogida para generar valores normalizados.

Las viabilidades celulares se midieron tiñendo con azul de tripano usando examen de la densidad celular (por ejemplo, CEDEX®, Innovatis, Malvern, PA). Además, se midieron el perfil de glucosa residual y el perfil de glutamina residual en el cultivo celular usando el analizador de química BioProfile (Nova Biochemical, Waltham, MA). Las concentraciones de los productos de desecho, lactato y amoniaco, se midieron usando el analizador de química BioProfile (Nova Biochemical, Waltham, MA).

La productividad celular media acumulativa (Qp) y el título de producto se midieron usando HPLC de proteína A y se normalizaron a la Qp media acumulativa y al título medio del día de la recogida. El título medio del día de la recogida se determinó calculando la media aritmética del título del día de la recogida (por ejemplo, día 10) para todas las condiciones experimentales ensayadas. Después, se escalaron todos los valores del título individuales al título medio en el día de la recogida para generar valores normalizados. La Qp media acumulativa en el día de la recogida se determinó calculando la media aritmética de la Qp media acumulativa del día de la recogida para todas las condiciones experimentales ensayadas. Después, se escalaron todos los valores individuales al título medio en el día de la recogida para generar valores normalizados.

Los niveles de producto mal plegado/agregado se midieron usando HIC-HPLC y los niveles de agregados de elevado peso molecular se midieron usando SEC-HPLC. Se midieron los niveles de sialilación de glucano total y unida a N sometiendo a glucoformas de proteína marcadas con 2-aminobenzamida (2-AB) a cromatografía en fase normal (NPC). La cantidad de sialilación normal (unida a N y O) se definió como el porcentaje en relación a la cantidad de sialilación total del material de referencia, es decir, una alícuota de TNFR-Fc con un patrón de sialilación conocido y preferible. El pH del cultivo celular se determinó mediante una medición *off-line* mediante un analizador de gases en sangre (analizador de pH/gases en sangre Rapidlab 248 de Bayer (Bayer Healthcare LLC, East Walpole, MA)).

Ejemplo 1.1.2: Resultados

El cultivo de células a una temperatura reducida tuvo efectos mínimos en el número de IVC. Específicamente, las menores temperaturas operativas dieron como resultado un número de IVC final menor; sin embargo, el efecto de reducir la temperatura de cultivo celular a 27°C fue menor, se observó una reducción de solo el 20% en el número de IVC (**FIG. 1A**). Las viabilidades celulares no se vieron afectadas en gran medida mediante la reducción de la temperatura; la condición de temperatura mínima (es decir, 27°C) proporcionó una viabilidad en el día de la recogida un 5% menor (**FIG. 1B**).

Además, las temperaturas operativas reducidas dieron como resultado un perfil de glucosa residual mayor, que indicó un menor consumo de glucosa del cultivo celular (**FIG. 2A**); sin embargo, los perfiles de glutamina no se alteraron significativamente mediante las temperaturas reducidas (**FIG. 2B**).

En algunos casos, más tarde en el cultivo celular, también pueden consumirse el ácido láctico y el amoniaco por el cultivo celular. El cese de la producción de ácido láctico y amoniaco o el consumo de ácido láctico y amoniaco promueven la viabilidad celular, la productividad celular y pueden tener el efecto de aumentar el título de producto polipeptídico. El cultivo de células a la temperatura reducida tuvo el efecto de alterar el consumo neto de lactato en la segunda mitad del cultivo discontinuo alimentado (**FIG. 3A**). Las temperaturas reducidas también dieron como resultado una mayor producción de amoniaco (**FIG. 3B**). Las temperaturas reducidas dieron como resultado menores productividades específicas de células (Qp menor) (**FIG. 4A**) y un menor título de producto (**FIG. 4B**). El menor título de producto es el resultado de una menor productividad celular específica y de un menor número integrado de células viables. Sin embargo, el título de producto y la productividad celular reducidos se vieron compensados por una proporción significativamente reducida de producto mal plegado y agregado (**FIG. 5A**). Además, la reducción de la temperatura del cultivo celular redujo significativamente la proporción de los agregados de elevado peso molecular en el cultivo celular (**FIG. 5B**). Por lo tanto, la reducción de la temperatura dio como resultado un producto de proteína TNFR-Fc mejorado.

Esta reducción de la temperatura se correlacionó con una reducción en la sialilación total de producto (sialilación unida tanto a *N* como a *O*) (**FIG. 6A**). De hecho, hubo una relación directa entre reducir la temperatura de cultivo celular y reducir la proporción de glucanos unidos a *N* sialilados (**FIG. 6B**), lo que indica que la temperatura de producción ha de seleccionarse para equilibrar el efecto beneficioso de reducir los HMWA y el mal plegamiento de proteínas y el efecto desfavorable de reducir la glucosilación. Por ejemplo, el cultivo de células a una temperatura reducida de 29,5°C redujo significativamente la concentración de TNFR-Fc tanto mal plegado como agregado, a la vez que tuvo efectos mínimos en la glucosilación de TNFR-Fc.

Las diferencias en el consumo neto de lactato entre los cultivos celulares cultivados a diferentes temperaturas dieron lugar a una diferencia en el pH del cultivo celular en el momento de la recogida (**FIG. 7**). Esto se debe al hecho de que un mayor consumo neto de lactato (ácido láctico) ocasionó un mayor aumento en el pH de cultivo ya que el ácido se estaba retirando del ambiente.

Ejemplo 1.2: Efectos del pH reducido en el rendimiento de cultivo celular de células CHO recombinantes y sobre la cantidad de producto de proteína de fusión de TNFR-Fc

Ejemplo 1.2.1: Materiales y procedimientos.

Se inocularon células CHO que sobreexpresaban la glucoproteína recombinante TNFR-Fc a concentraciones idénticas a 37,0°C y a un punto establecido de pH de 7,20, 7,10, 7,00, 6,90 o 6,80. Se utilizó la adición de base de carbonato de sodio para impedir que los cultivos se desviasen por debajo del punto establecido de pH. No se utilizó control de pH por encima del punto de pH establecido. Se cambió la temperatura de los biorreactores a 30,0°C en el día 1 (día uno después de la inoculación, es decir, un día después del comienzo del experimento). Como se describe en el ejemplo 1.1.1, se midieron diversas condiciones del cultivo celular.

Ejemplo 1.2.2: Resultados

El cultivo de células a puntos de pH establecidos desviados en 0,2 unidades de pH del pH 7,00 ocasionó un IVC ligeramente reducido; específicamente, el cultivo de células a un pH de 6,80 dio lugar a una reducción de aproximadamente el 15% en el IVC en comparación con células cultivadas a un pH de 7,00 (**FIG. 8A**). Además, el cultivo de células a un pH de 7,20 dio lugar a una menor viabilidad celular (**FIG. 8B**).

Además, los menores puntos de pH establecidos operativos dieron como resultado un menor consumo de glucosa (**FIG. 9A**). Los perfiles de glutamina no se vieron alterados de manera significativa al cultivar células a puntos de pH establecidos de 6,80 a 7,10 (**FIG. 9B**).

No es sorprendente que, unos mayores puntos de pH establecidos operativos ocasionaron una mayor producción de lactato (**FIG. 10A**). A un punto establecido de pH de 6,80, no se produjo consumo neto de lactato en la segunda mitad del cultivo discontinuo alimentado. Los menores puntos de pH establecidos operativos dieron como resultado una mayor producción de amoníaco (**FIG. 10B**).

Las diferencias en el consumo neto de lactato en la segunda mitad del experimento ocasionaron una desviación del pH de los cultivos respecto del punto de pH establecido operativo, ya que solo se usó adición de base y no de ácido para mantener el pH (**FIG. 11A**). Como consecuencia de las diferencias en los puntos de pH establecidos, los perfiles de lactato y las adiciones de agente de titulación, la osmolaridad también difirió entre las condiciones de pH (**FIG. 11B**).

La operación de cultivos a puntos de pH establecidos de 0,2 unidades de pH respecto del pH 7,00 dieron lugar a productividades específicas de células (es decir, Q_p) ligeramente menores (**FIG. 12A**). La utilización de un punto de pH establecido de 6,80 o 7,20 dio como resultado menores títulos de producto debido tanto a la menor productividad específica de células como a menores números integrados de células viables (**FIG. 12B**).

Sin embargo, los menores puntos de pH establecidos operativos dieron como resultado una reducción en el mal plegamiento y la agregación del producto (**FIG. 13A**). Además, se observó una reducción significativa en la proporción de agregados de elevado peso molecular a puntos de pH establecidos más bajos (**FIG. 13B**).

Los menores puntos de pH establecidos operativos dieron como resultado una menor sialilación total (glucanos unidos tanto a *N* como a *O*) (**FIG. 14A**), así como una menor proporción de sialilación de glucanos unida a *N* (**FIG. 14B**). Debido a que la cantidad de sialilación normal (unida a *N* y *O*) se definió como el porcentaje en relación a la cantidad de sialilación total del material de referencia, cualquier valor por debajo del 100% representó una reducción en la sialilación total y los valores por encima del 100% representaron un aumento en la sialilación total. El patrón de glucosilación puede ilustrarse como el perfil de glucanos de la glucoproteína (**FIG. 15**). El cultivo de células al pH reducido dio como resultado una alteración significativa del perfil de glucosilación general (**FIG. 16**). Aunque no se detectaron glucoformas nuevas al pH reducido, las proporciones de glucoformas presentes se alteraron de manera significativa; el cultivo de células al pH reducido dio como resultado la reducción de glucoformas complejas di y mono-sialiladas. Debido al efecto potencialmente desfavorable del pH reducido en la glucosilación de proteínas, el pH del cultivo celular ha de seleccionarse de tal modo que se compensen los efectos perjudiciales de la glucosilación de proteínas por los efectos beneficiosos de la reducción de proteínas mal plegadas y/o agregadas. Por ejemplo, el

cultivo de células a un pH reducido de 6,95 redujo significativamente la proporción de proteína TNFR-Fc mal plegada y agregada, a la vez que tuvo efectos mínimos en la glucosilación de TNFR-Fc.

Ejemplo 1.3: Discusión

5 Estos estudios demuestran que dentro de un intervalo de temperatura de 27,0°C a 30,0°C o dentro de un intervalo de punto establecido de pH de 6,80 a 7,20, el cultivo celular y la productividad específica del cultivo celular pueden verse afectados de manera significativa. Sin embargo, aunque la alteración de la temperatura fue tan solo de 1-2°C y de los puntos de pH establecidos de tan solo 0,1-0,2, esta no afecta significativamente al crecimiento celular y a la productividad específica, puede observarse una diferencia significativa (favorable) en el plegamiento de proteína y la agregación de proteína. Por lo tanto, las pequeñas diferencias en las condiciones de cultivo celular que no afectan significativamente al crecimiento celular, la viabilidad o la productividad, pueden alterar significativamente la calidad del producto, por ejemplo, reducir el plegamiento de proteínas y la agregación de proteínas o afectar a la glucosilación.

Ejemplo 2

15 Efectos de la temperatura en la producción de sIL-13R y evaluación de una nueva línea celular productora de sIL-13R

Ejemplo 2.1: Materiales y procedimientos

20 Se sembraron células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de manera estable que expresaban glucoproteína recombinante sIL-13R en biorreactores Applikon a razón de 3×10^5 células/ml en un medio de inoculación con antiespumante (Dow Corning Corporation, Midland, MI). Se añadió antiespumante adicional según fuese necesario. Se usó un medio nutriente concentrado como medio de alimentación. El límite inferior del punto de pH establecido fue de 6,80. El punto establecido de dO_2 fue del 23% utilizando un 7% de $CO_2/93\%$ de gas de burbujeo, mientras que la agitación fue a 200 rpm. Se cambió la temperatura de los biorreactores de 37,0°C en el día 5. La temperatura de la fase de producción fue de 37,0°C, 33,0°C, 32,0°C, 28,0°C o temperatura ambiente (TA; aproximadamente 24,0°C). Las pautas de alimentación para las condiciones experimentales se resumen en la tabla 1. Los volúmenes de alimentación se listan como porcentaje de volumen de cultivo en el biorreactor. El cambio de temperatura para los cultivos celulares se produjo a aproximadamente 6×10^6 células/ml.

Tabla 1. Pautas de alimentación de biorreactor

Condición experimental:	37,0°C	33,0°C	32,0°C	31,0°C	29,0°C	TR
DÍA						
3	10,2%	10,2%	10,2%	10,2%	10,2%	10,2%
5	5%	5%	5%	5%	5%	5%
6	5%					
7	10,2%	5%	5%	5%	5%	5%
9	10,2%	5%	5%	5%	5%	5%
11	5%	5%	5%	5%	5%	5%
13	5%		5%	5%	5%	5%
16			5%	5%	5%	5%

Ejemplo 2.2. Resultados

30 Las densidades de células viabilidades logradas después del cambio de temperatura fueron ligeramente menores a TA (aproximadamente 6×10^6 células/ml) y a 29,0°C (aproximadamente 7×10^6 células/ml) que a temperaturas mayores (aproximadamente 8×10^6 células/ml) (FIG. 17A). De forma análoga, las densidades celulares totales logradas después del cambio de temperatura fueron ligeramente menores a TA (aproximadamente $6,5 \times 10^6$ células/ml) y a 29,0°C (aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células/ml) que a temperaturas mayores (aproximadamente de 8 a 9×10^6 células/ml) (FIG. 17B). Las viabilidades se mantuvieron mejor a lo largo del cultivo discontinuo alimentado a menores temperaturas (FIG. 17C). La velocidad de reducción de la viabilidad varió dependiendo de la temperatura; los perfiles de viabilidad de los cultivos a TA y a 29,0°C fueron significativamente mayores que los cultivos restantes a 31,0°C, 32,0°C, 33,0°C y 37,0°C (FIG. 17C).

40 Al final del cultivo discontinuo alimentado de 18 días, se logró el título más elevado (título de dímero y HMWA de sIL-13R combinados) mediante el cultivo a 31,0°C, seguido del cultivo a 32,0°C (188 mg/l), el cultivo a 29,0°C (178 mg/l) y el cultivo a 33,0°C (151 mg/l) (FIG. 18). Los cultivos a TA y a 37,0°C tuvieron títulos significativamente menores. La productividad celular específica o la velocidad de producción específica de sIL-13R diaria (Qp), de la línea celular

productora de sIL-13R se redujo significativamente a TA y a 37,0°C (**FIG. 19A**). Además, las productividades específicas acumulativas medias o la Qp media acumulativa, también fueron menores a 37,0°C y a TA (**FIG. 19B**). De manera interesante, los grandes aumentos en las productividades específicas observados al final de los cultivos a 37,0°C, 33,0°C, 32,0°C y 31,0°C correspondieron a reducciones significativas en las viabilidades del cultivo (datos no mostrados).

El consumo específico de glucosa (Qglc) se redujo a medida que se redujo la temperatura (**FIG. 20**). El consumo específico de glutamina (Qgln) también pareció reducirse a medida que se redujo la temperatura (**FIG. 21**). Sin embargo, cabe destacar que los datos acerca del consumo específico de glutamina no tuvieron en cuenta la degradación de la glutamina en el medio, que se produjo en mayor medida con el aumento de la temperatura. Por lo tanto, el impacto de la temperatura en el consumo específico de glutamina puede estar sesgado. Los perfiles de concentración de lactato para los cultivos a TA, 29,0°C, 31,0°C y 32,0°C fueron similares, alcanzando la concentración de lactato un máximo aproximadamente en el día del cambio de temperatura, y después reduciéndose a entre 0,7 y 2,0 g/l en el día 18 (**FIG. 22**). Para los cultivos a 33,0°C y 37,0°C, los perfiles de lactato fueron similares a los otros cultivos durante la fase de crecimiento, pero fueron significativamente diferentes durante la fase de producción. Para el cultivo a 33,0°C, la concentración de lactato no se redujo después del cambio de temperatura y en su lugar, permaneció esencialmente constante. Para el cultivo a 37,0°C, el lactato aumentó durante toda la duración del cultivo discontinuo alimentado.

La concentración de amoníaco varió durante la fase de producción de manera acorde a la temperatura (**FIG. 23**). Para el cultivo a 29,0°C, la concentración de amoníaco alcanzó un máximo aproximadamente en el día del cambio de temperatura, se redujo durante la etapa intermedia del cultivo discontinuo alimentado y después aumentó durante la última etapa del cultivo discontinuo alimentado. Con el aumento de la temperatura por encima de los 29,0°C, el aumento de la concentración de amoníaco en la última etapa del cultivo discontinuo alimentado fue mayor y se produjo de una manera más temprana. Para el cultivo a 37,0°C, la concentración de amoníaco aumentó durante todo el transcurso del cultivo discontinuo alimentado. Para el cultivo a TA, los niveles de amoníaco permanecieron aproximadamente constantes después del cambio de temperatura.

Las muestras de medio condicionado de estos ciclos de biorreactor se analizaron respecto de los agregados de elevado peso molecular (HMWA) mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) de eluatos del lote unidos a proteína A. Una tendencia evidente extraída de los resultados de la línea celular fue el aumento relativo en el porcentaje de HMWA presente en el medio condicionado a medida que se aumentó la temperatura (**FIG. 24 y FIG. 25**). Por lo tanto, el hecho de llevar a cabo los cultivos a temperaturas más bajas dio como resultado una reducción de la agregación de producto de sIL-13R.

La reducción en el porcentaje de dímero sIL-13R se correlacionó con el aumento en el porcentaje de HMWA. (**FIG. 26A y 26B**). El cultivo a TA tuvo un menor % de HMWA que otros cultivos (**FIG. 26B**), así como un mayor porcentaje de formación de dímero. (**FIG. 26A**). El cultivo a TA y el cultivo a 31,0°C proporcionaron un título similar de solo dímero, mientras que el cultivo a 29,0°C proporcionó el título más elevado de solo dímero (**FIG. 27**).

Para corroborar las conclusiones extraídas del análisis de SEC, se analizaron muestras de medio condicionado usando transferencias de Western. Se examinaron las diferencias cualitativas en la cantidad de sIL-13R presente en forma de especies de HMWA frente a dímero. Las transferencias de Western demuestran la tendencia de que la cantidad de agregados de HMWA presente en el medio condicionado en relación con la cantidad de dímero presente aumentó a medida que aumentó la temperatura (datos no mostrados).

Estos experimentos demuestran la importancia de la interrelación entre las variables de la viabilidad dependientes de la temperatura y la densidad de células viables, la productividad específica y la formación de HMWA en la producción volumétrica de dímero de sIL-13R. Aunque el cultivo a 31,0°C logró el título más elevado (las medidas incluyeron HMWA y dímero), los cultivos a menores temperaturas (por ejemplo, 29,0°C) pueden proporcionar una productividad volumétrica comparable o mejorada cuando se mide en términos únicamente de dímero.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una proteína en un cultivo celular que comprende:
 - (a) cultivar células en cultivo celular a una temperatura reducida, en el que la temperatura reducida se encuentra dentro de un intervalo de 27,0°C a menos de 30,0°C; y
 - (b) cultivar células en el cultivo celular a pH reducido, en el que el pH reducido se encuentra dentro de un intervalo de 6,80 a menos de 7,00; para reducir la producción de proteínas mal plegadas y/o proteínas agregadas,en el que el cultivo celular es un cultivo de células de mamífero,
en el que la proteína producida es un receptor soluble, en el que dicho receptor soluble es TNFR-Fc o sIL-13R.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo es un cultivo de células CHO.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el receptor soluble es TNFR-Fc.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la temperatura reducida es de 29,5°C.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que el pH reducido es de 6,95.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el receptor soluble es sIL-13R.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende una etapa de aislar la proteína del cultivo celular.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la proteína se purifica o procesa adicionalmente para su formulación.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la proteína se formula en una composición farmacéutica.

FIG. 1A

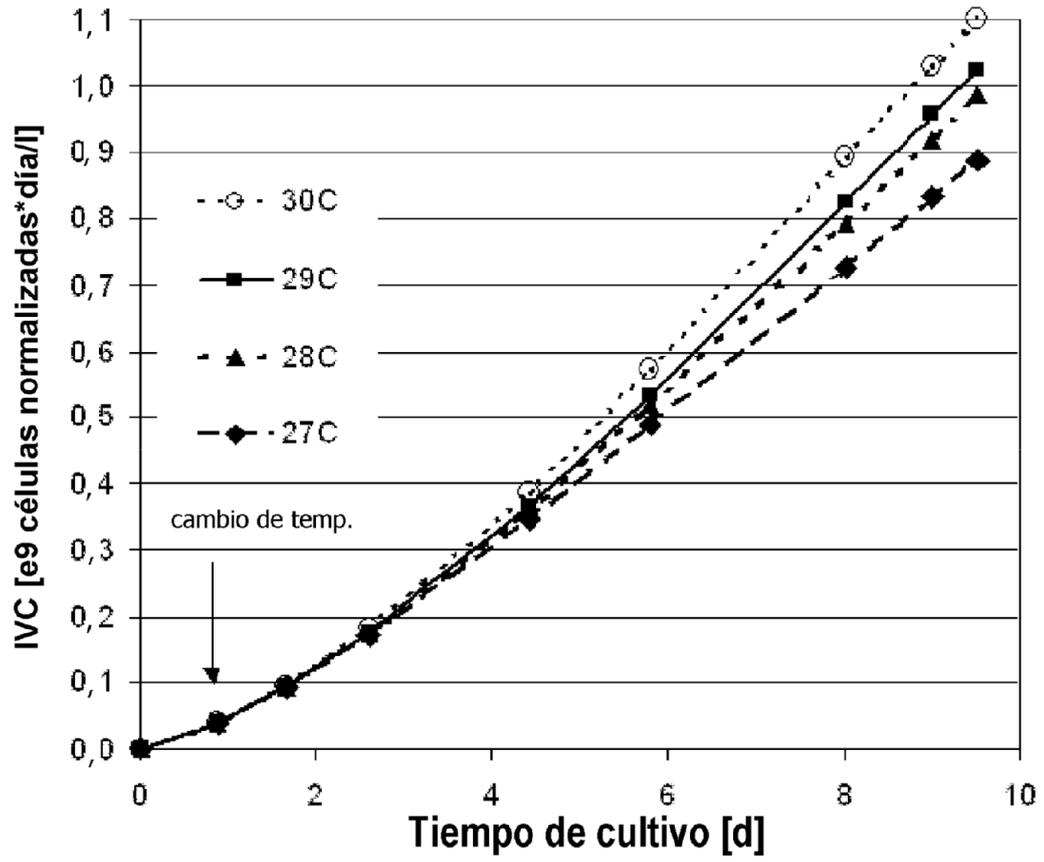


FIG.1B

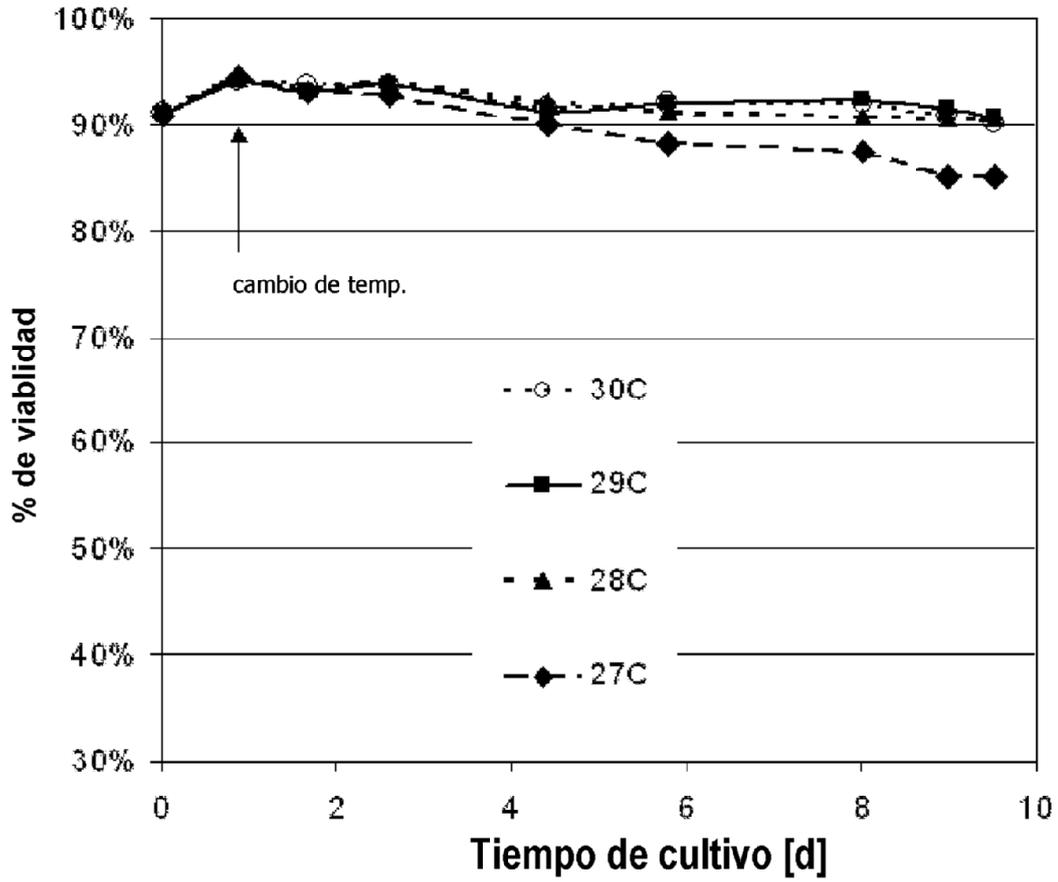


FIG. 2A

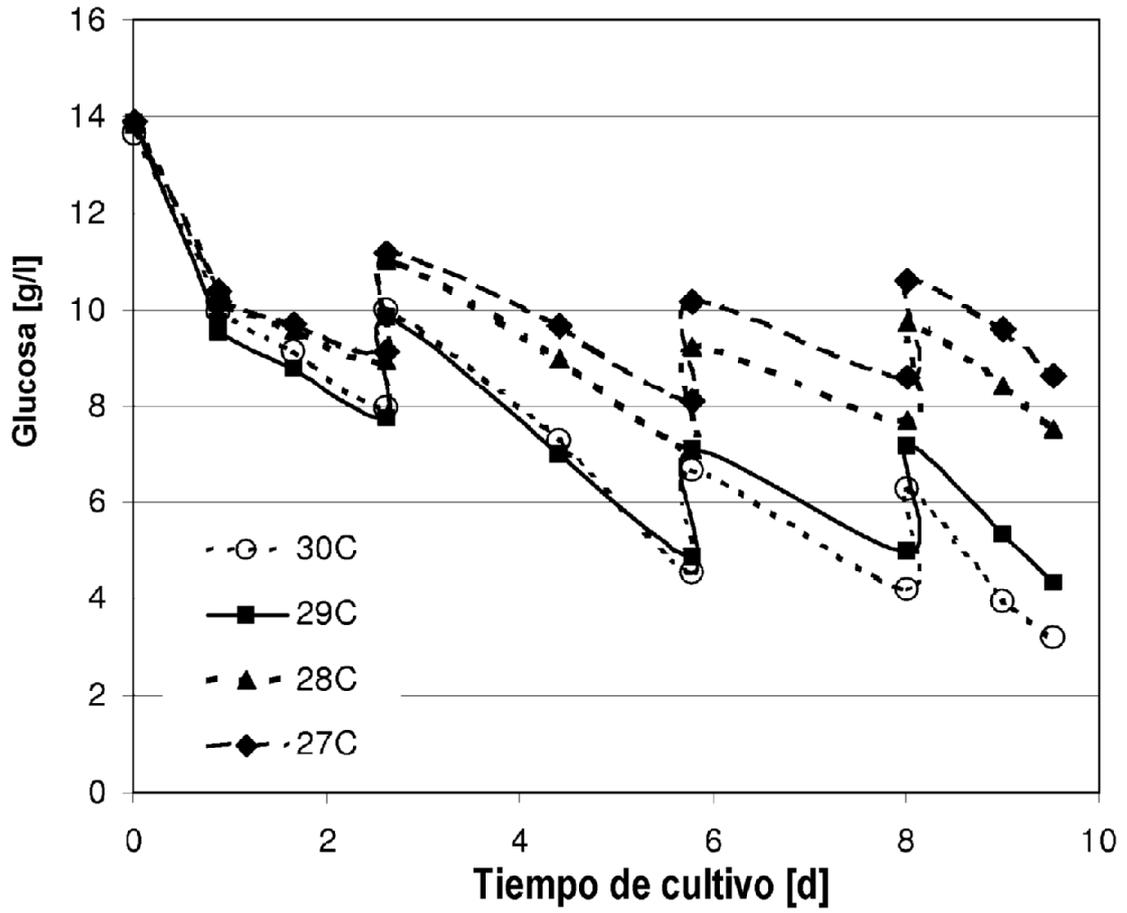


FIG. 2B

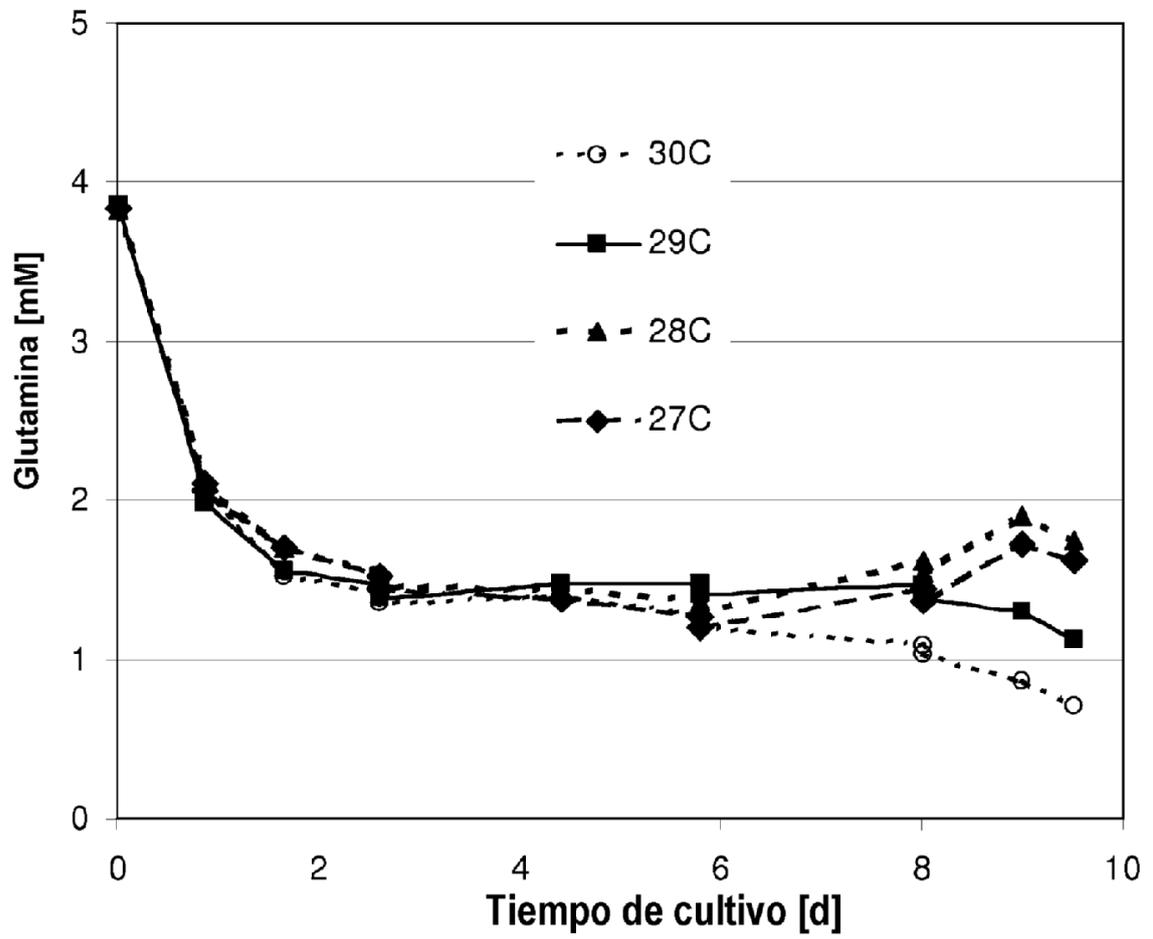


FIG. 3A

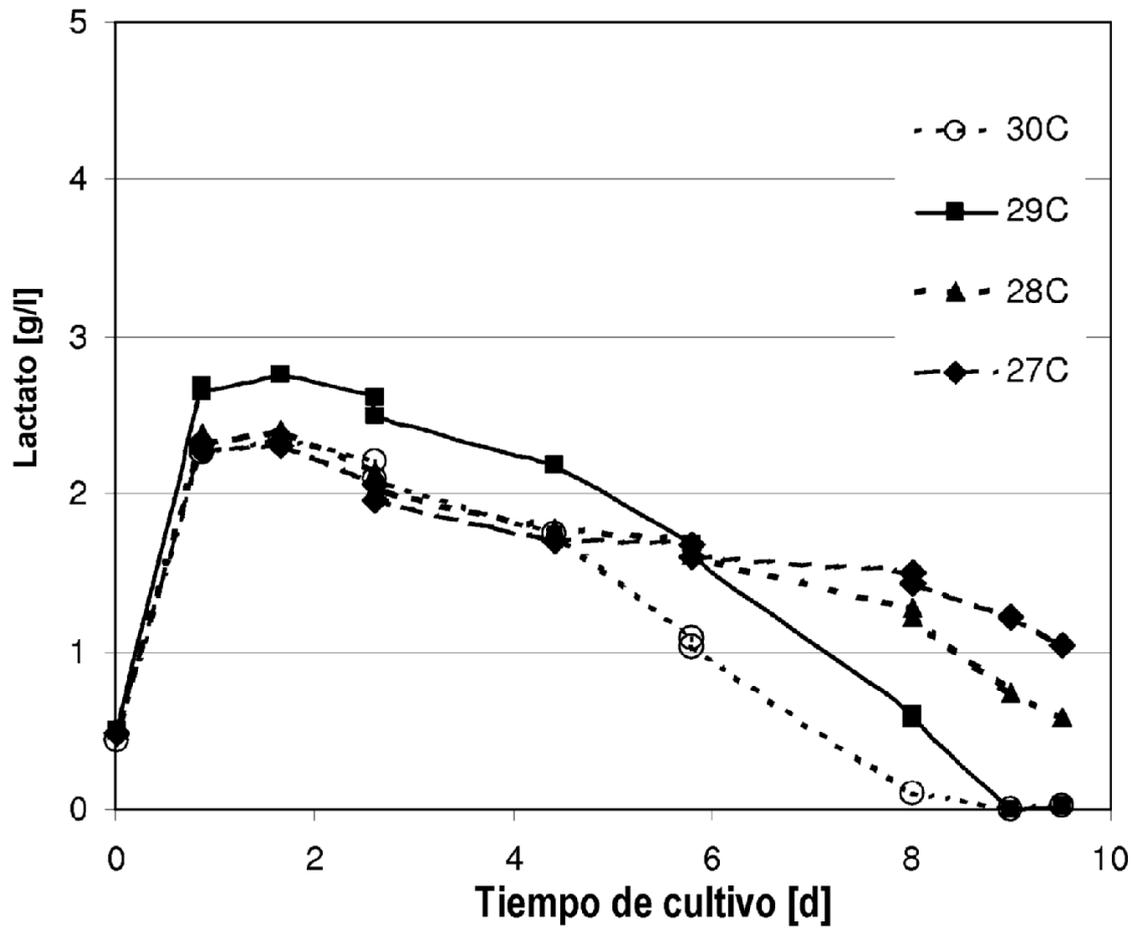


FIG. 3B

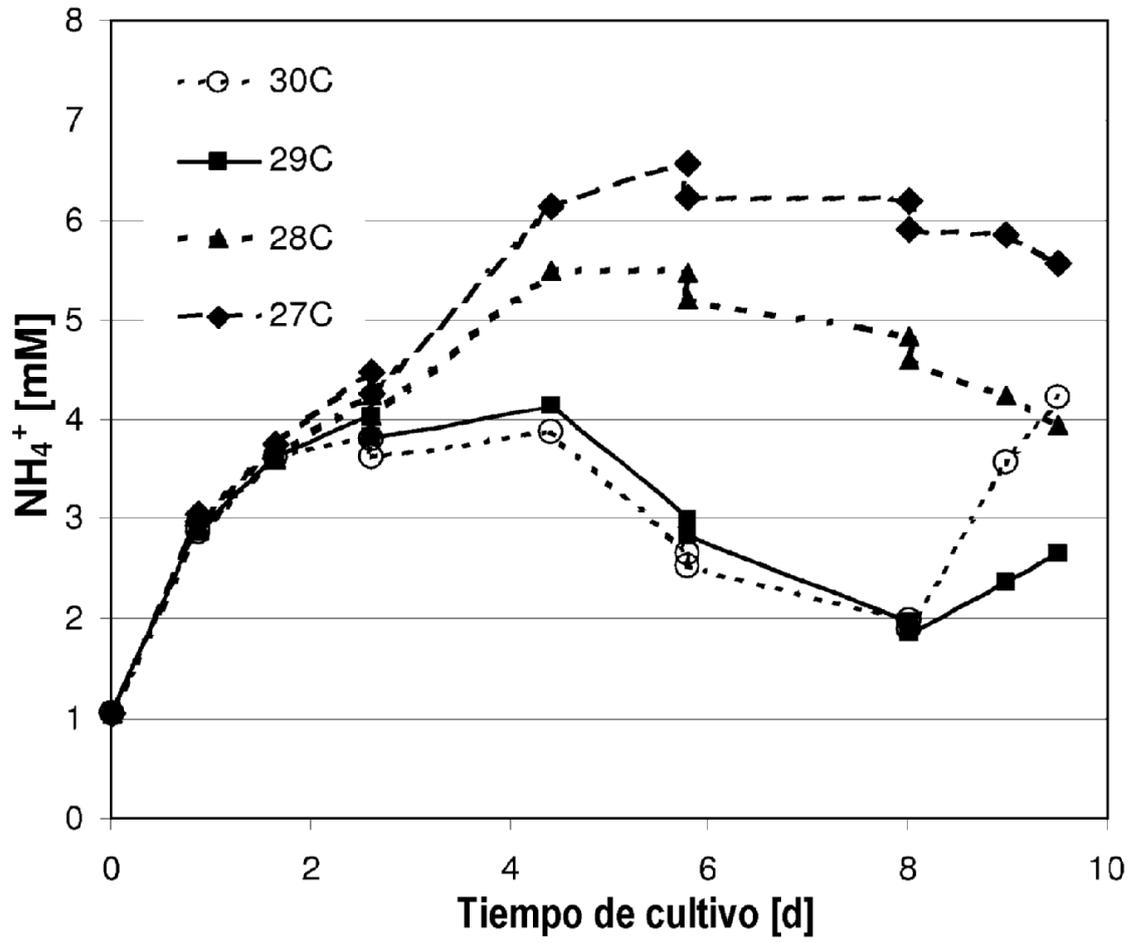


FIG. 4A

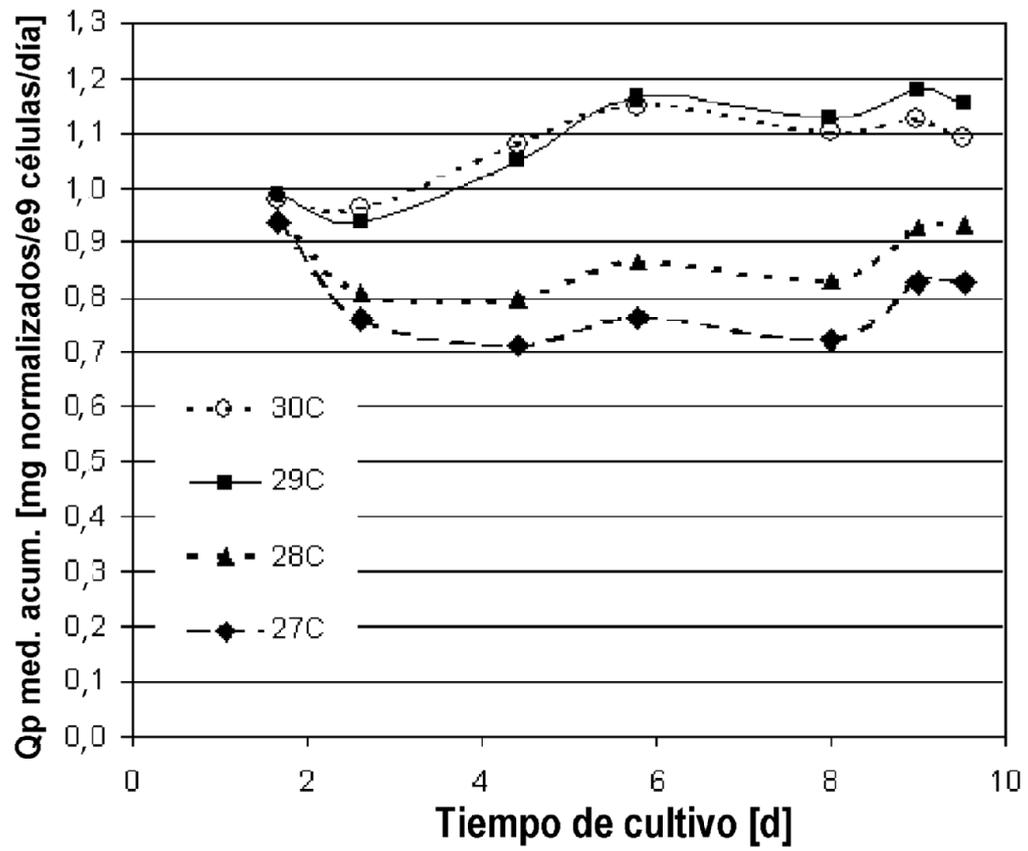


FIG. 4B

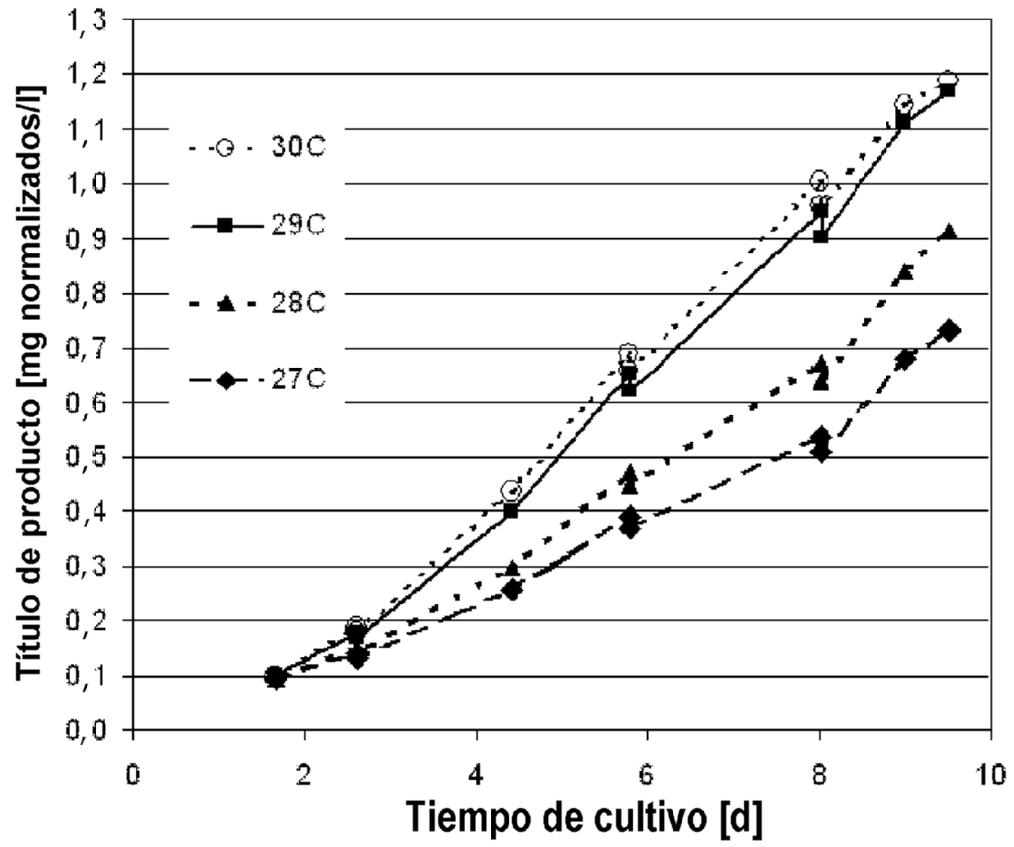


FIG. 5A

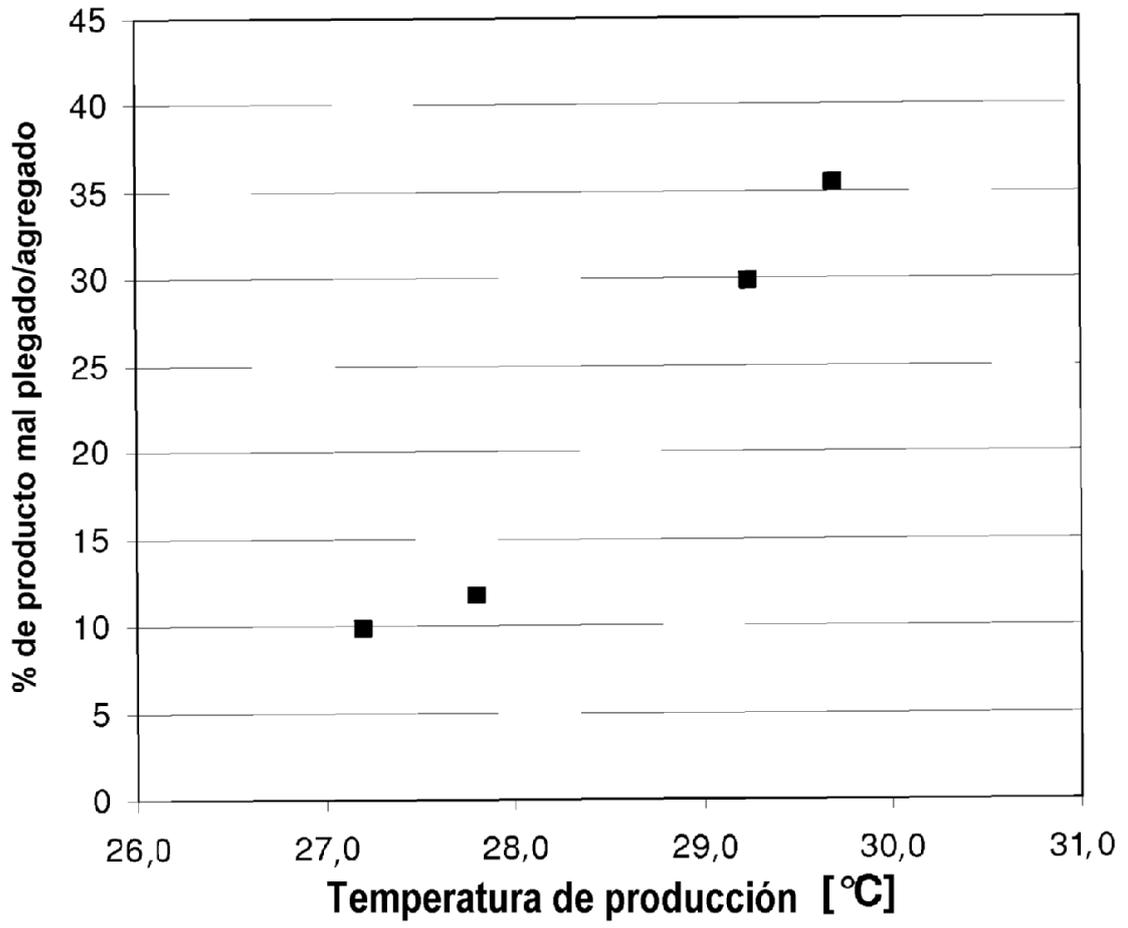
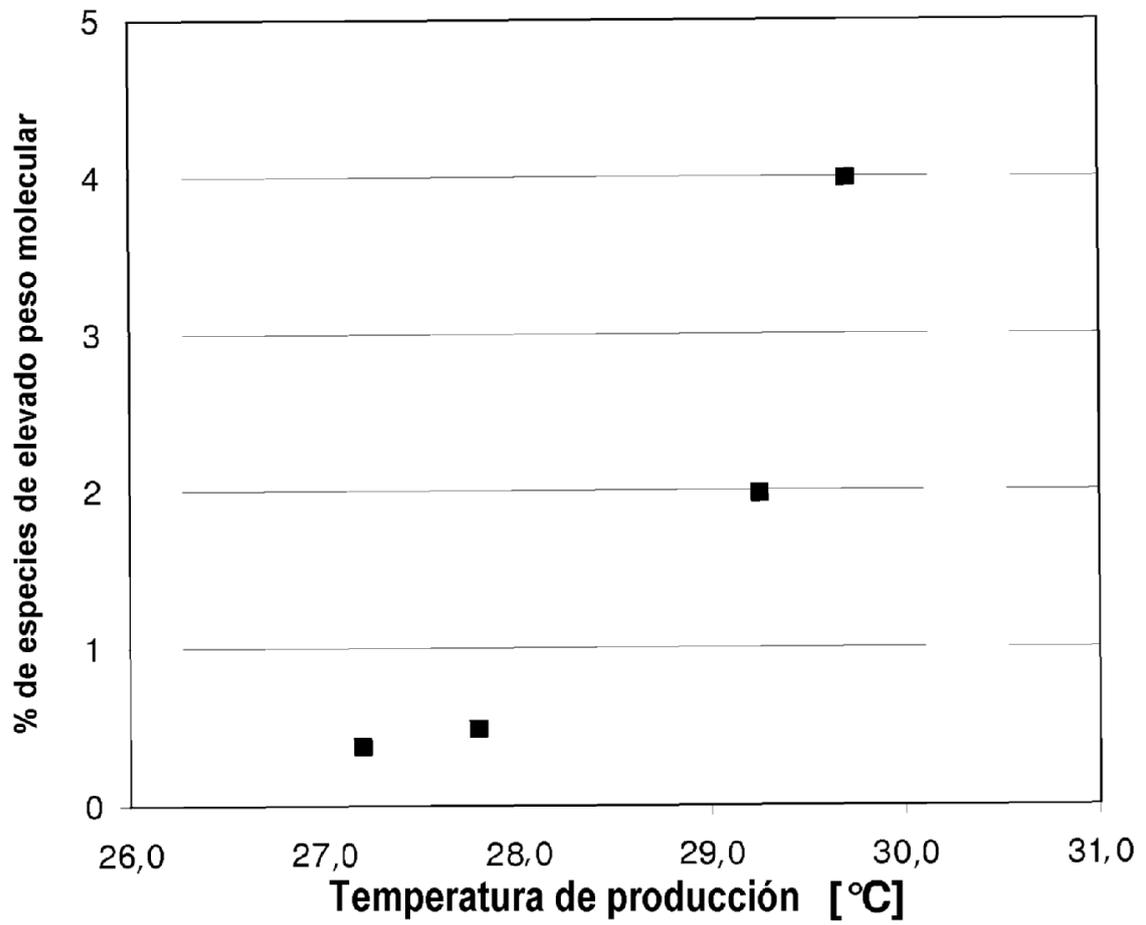


FIG. 5B



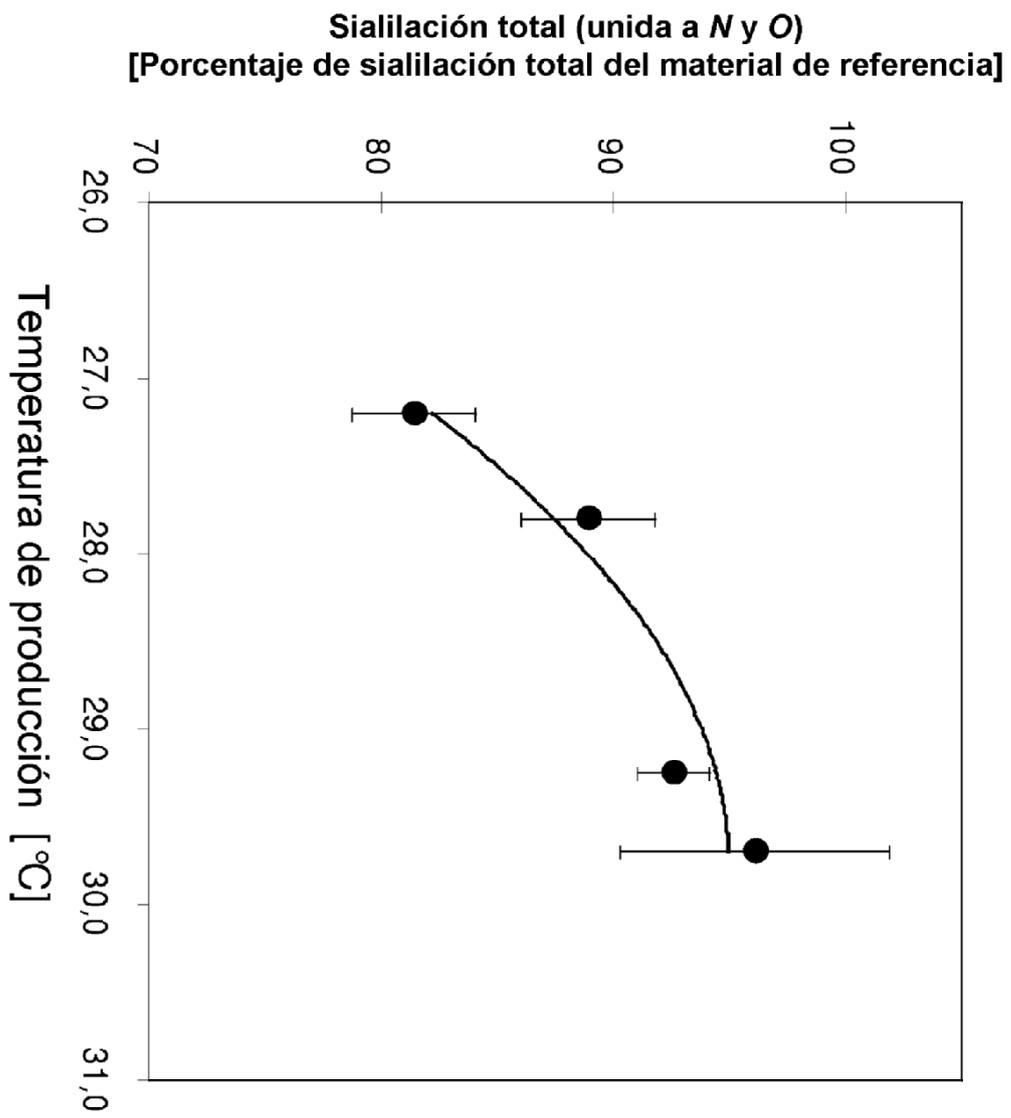


FIG. 6A

FIG. 6B

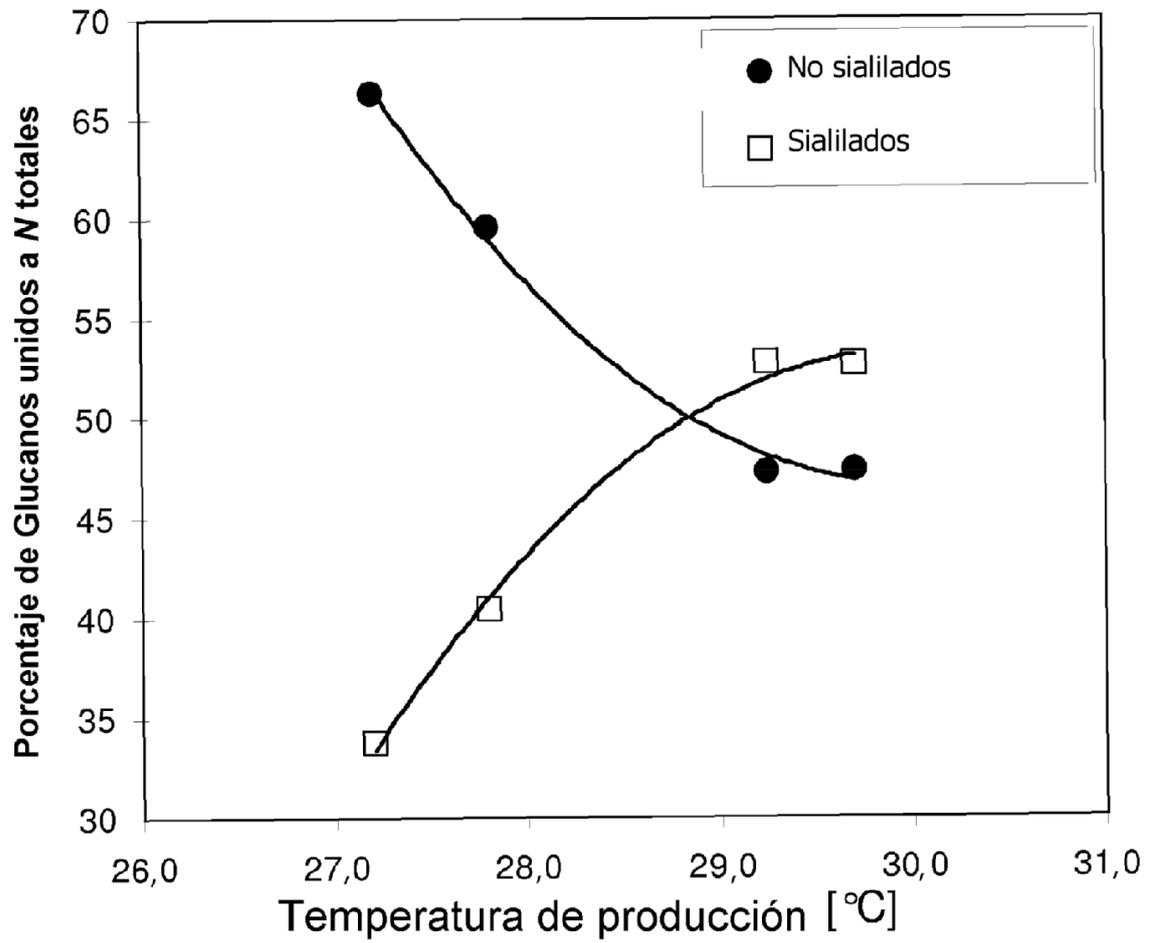


FIG. 7

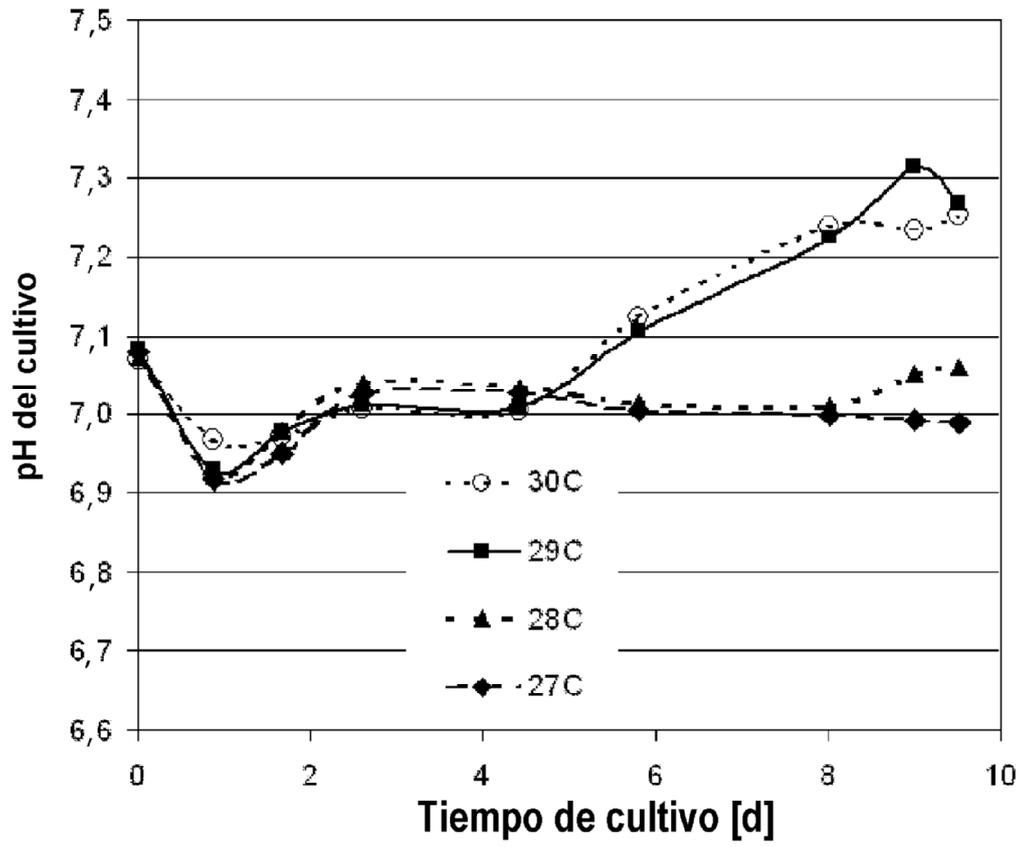


FIG. 8A

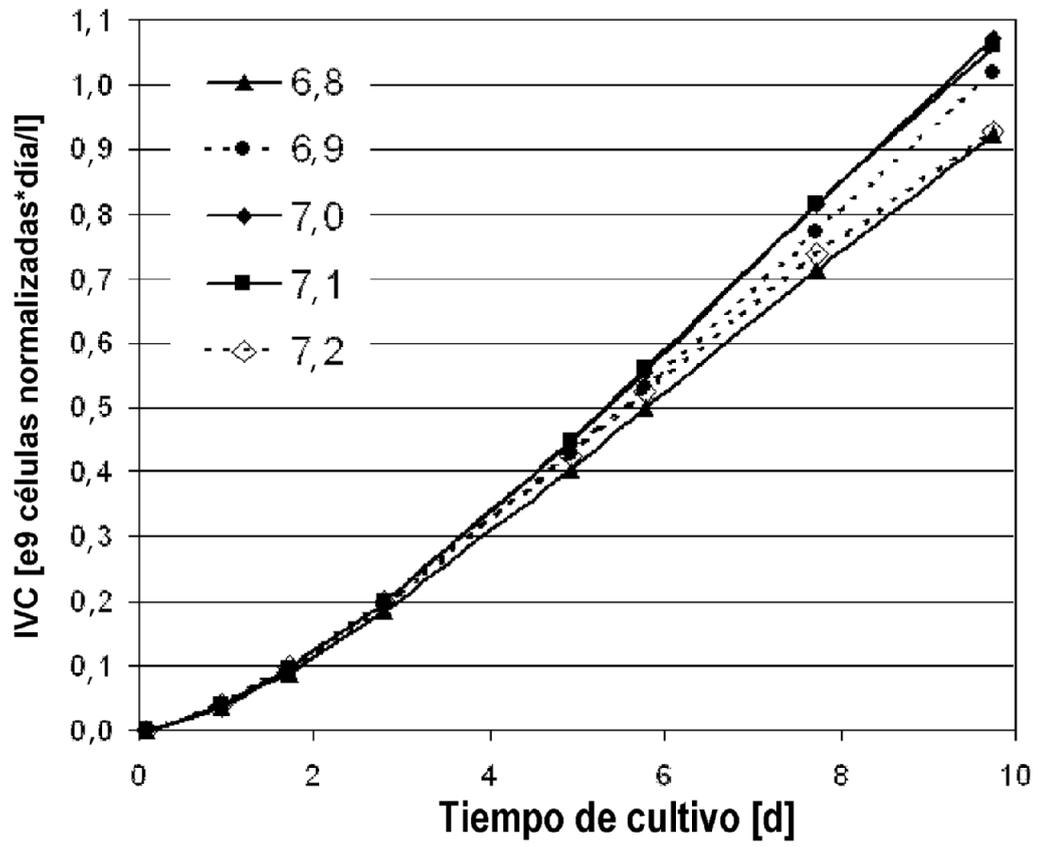


FIG. 8B

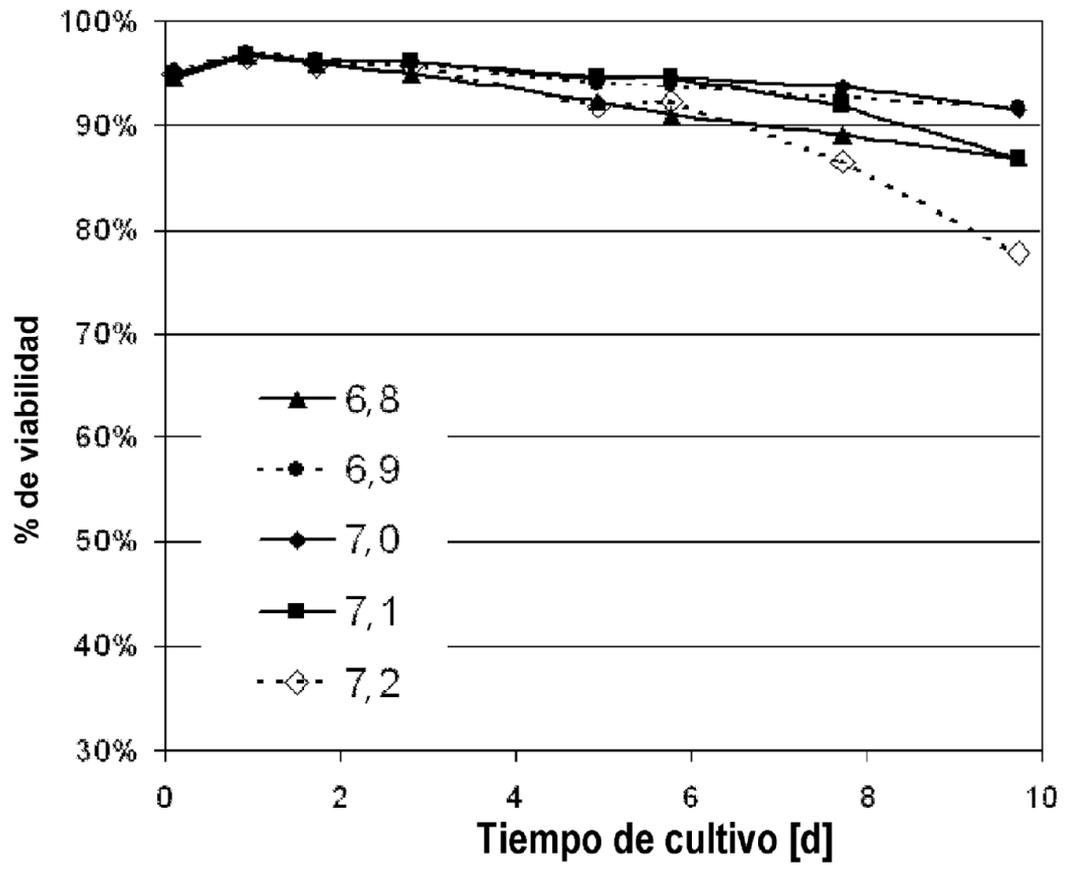


FIG. 9A

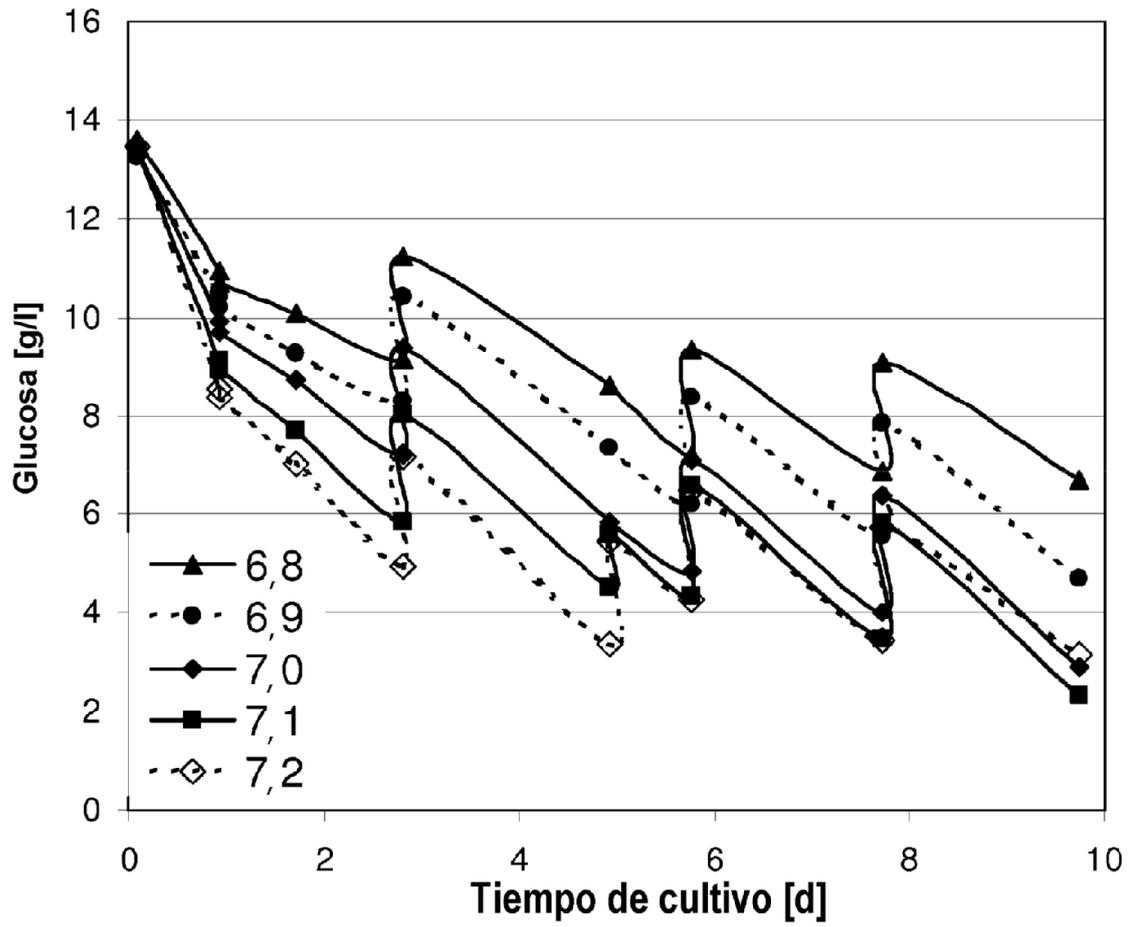


FIG. 9B

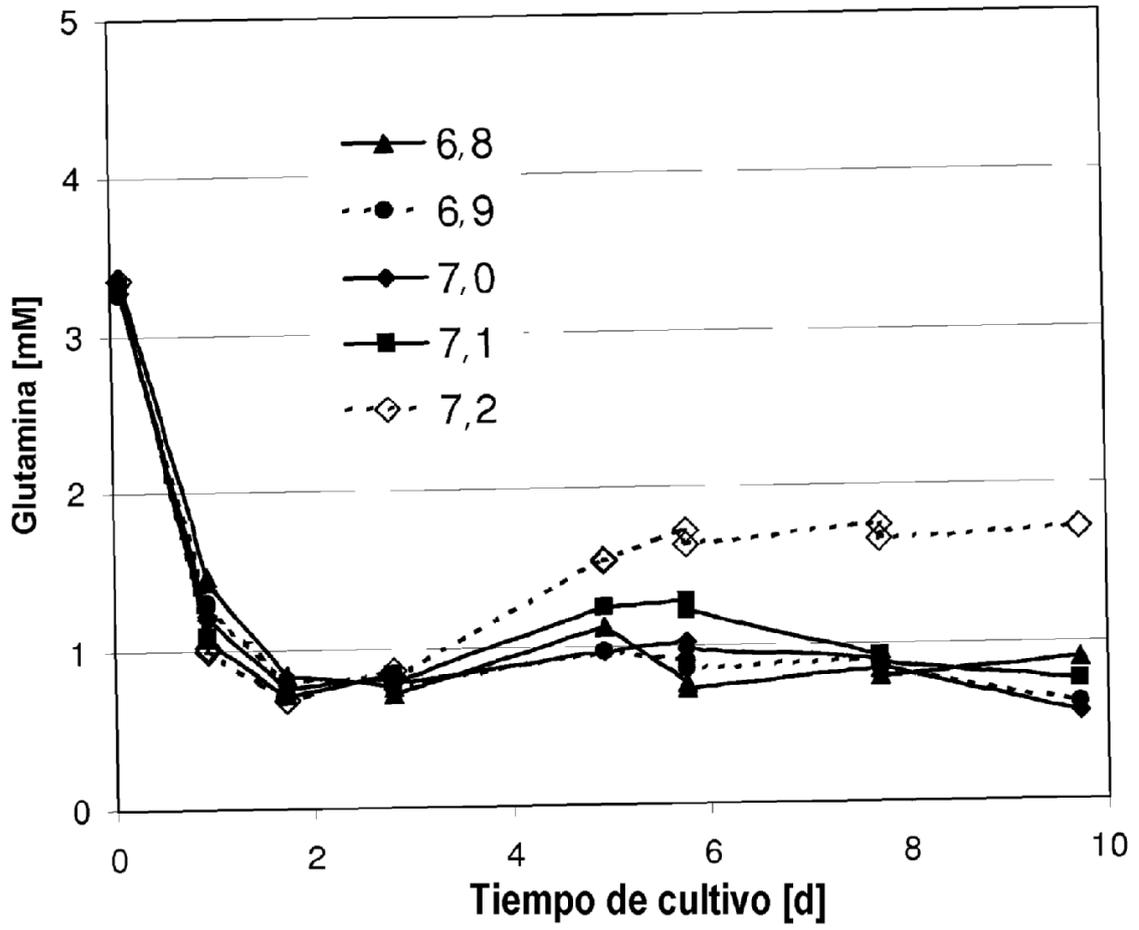


FIG. 10A

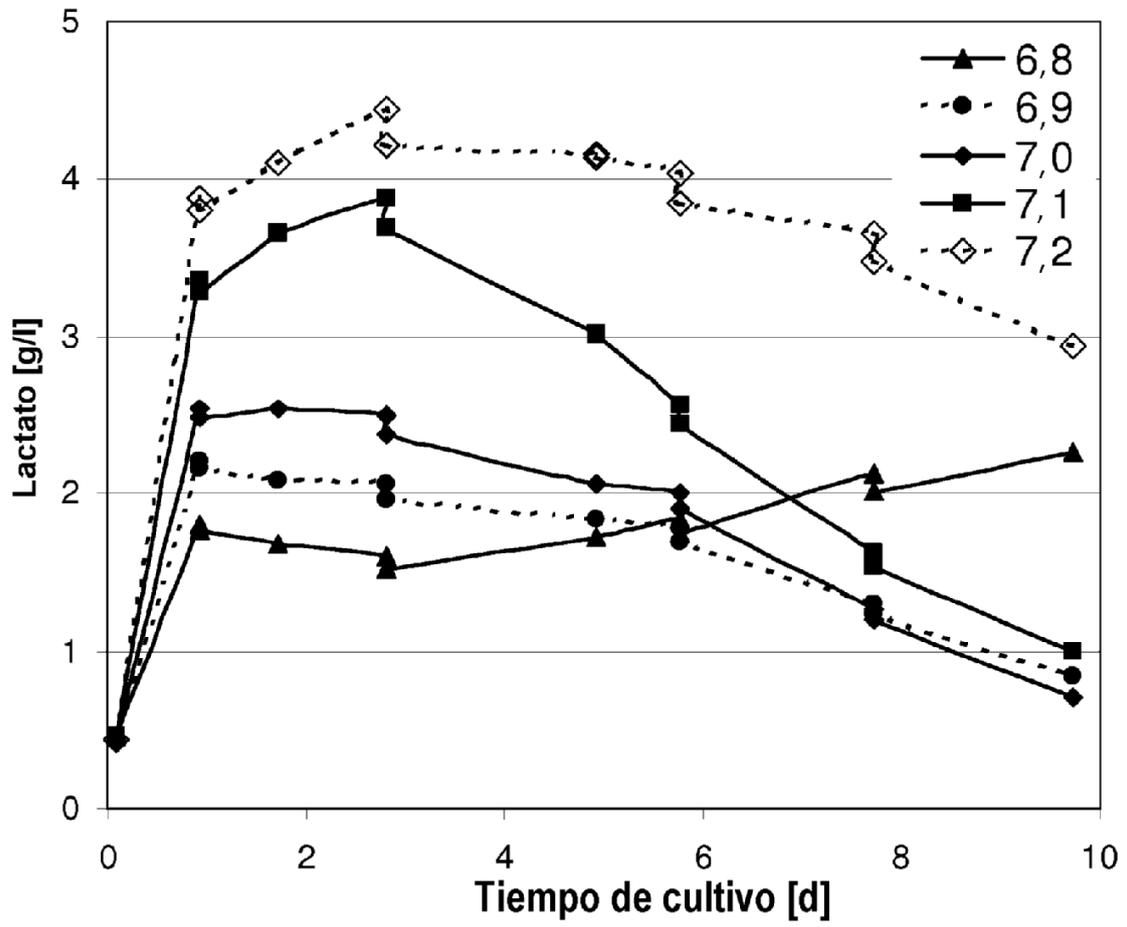


FIG. 10B

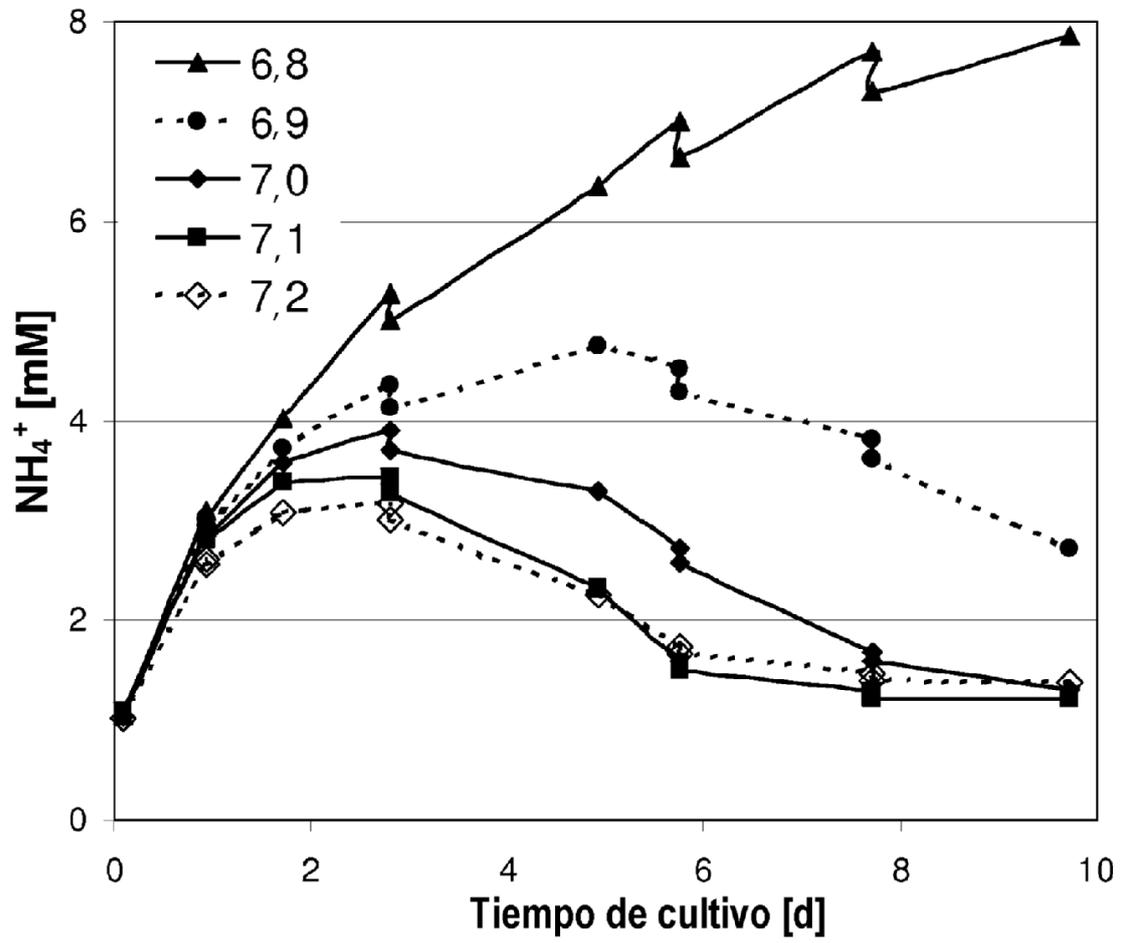


FIG. 11A

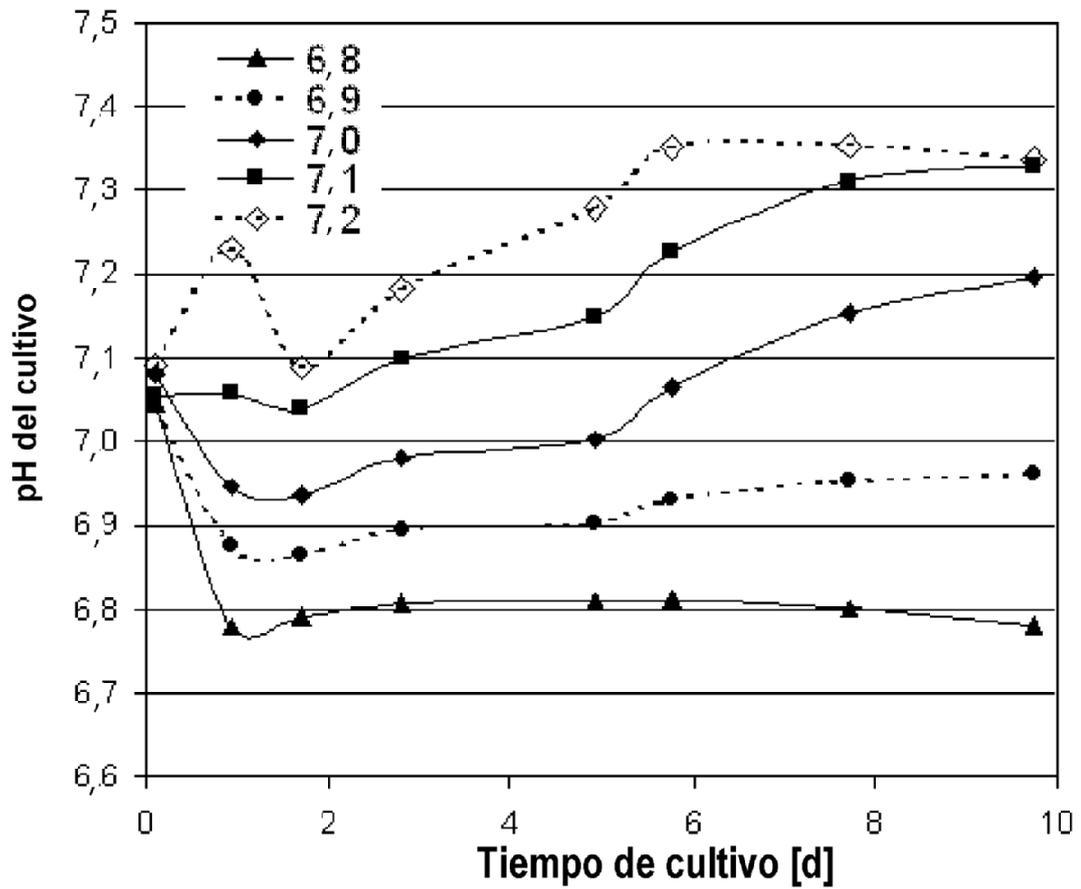


FIG. 11B

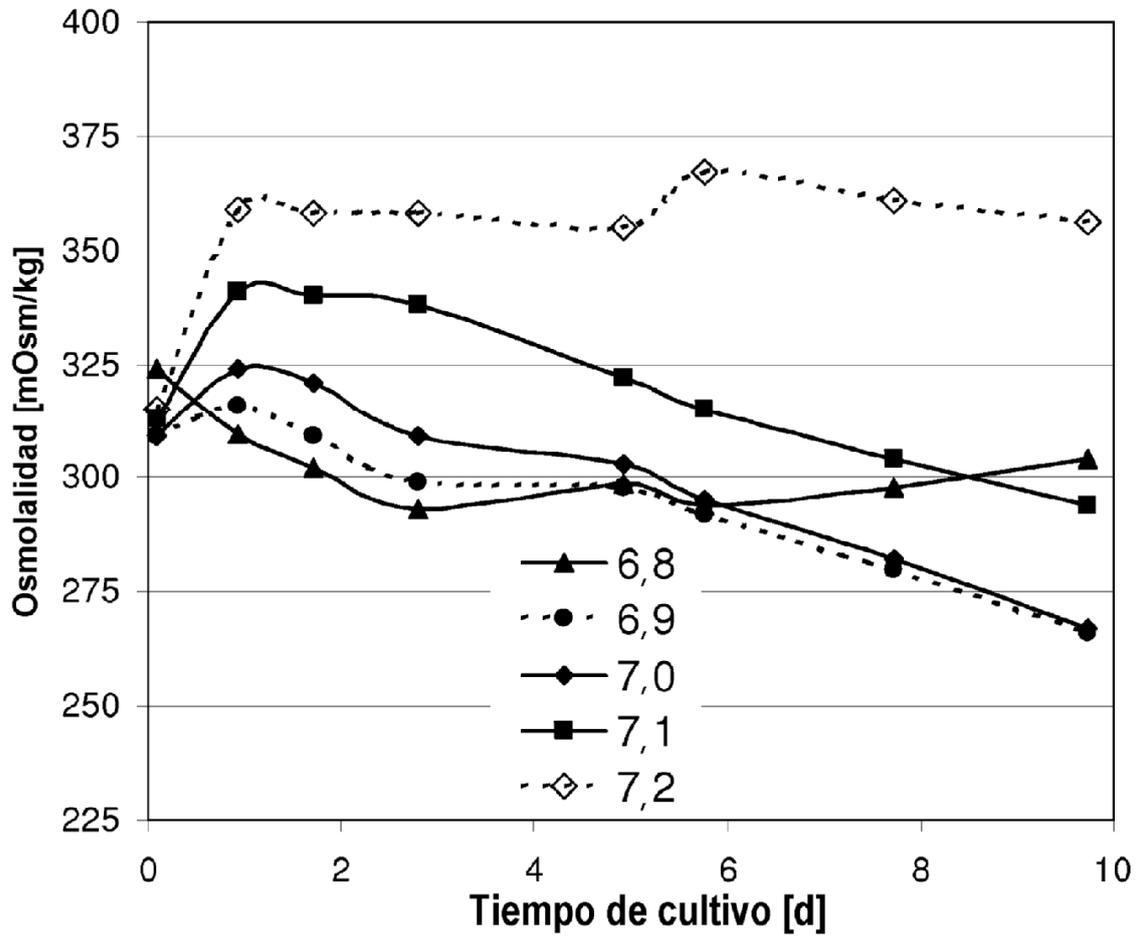


FIG. 12A

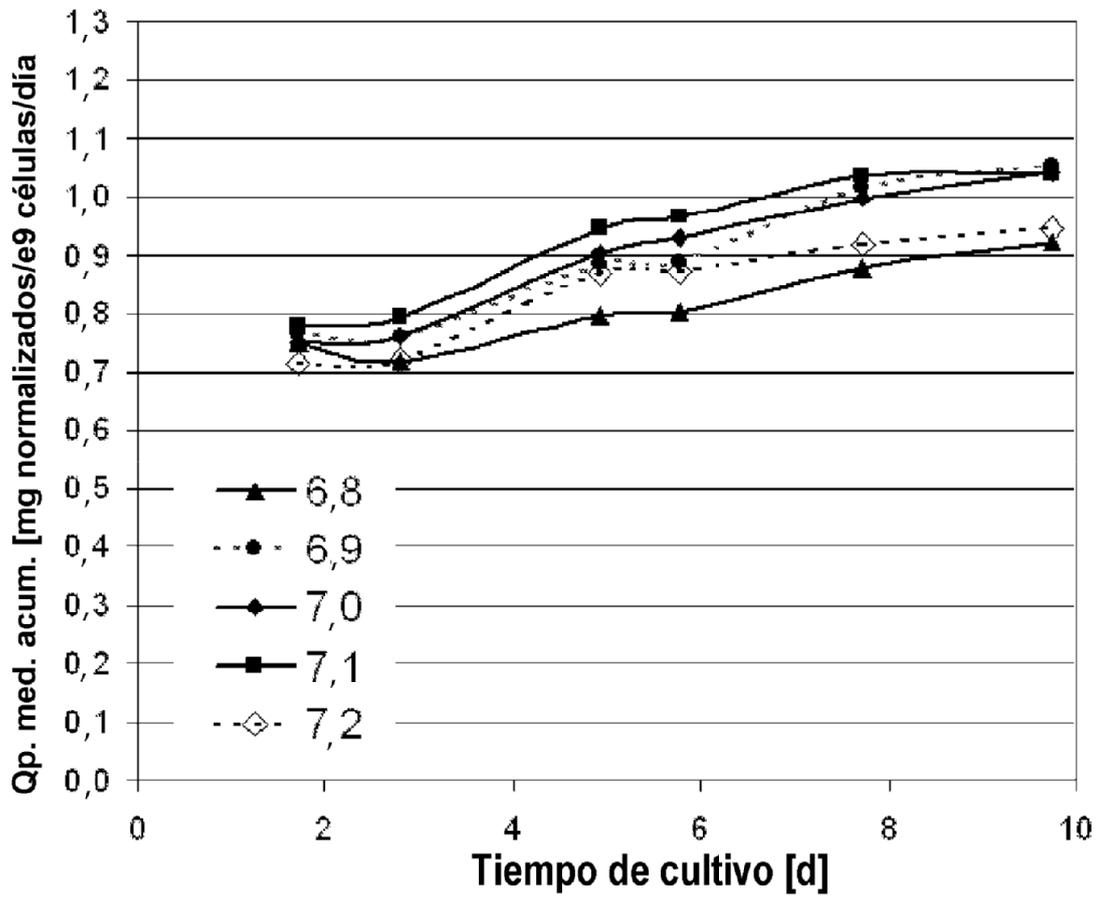


FIG. 12B

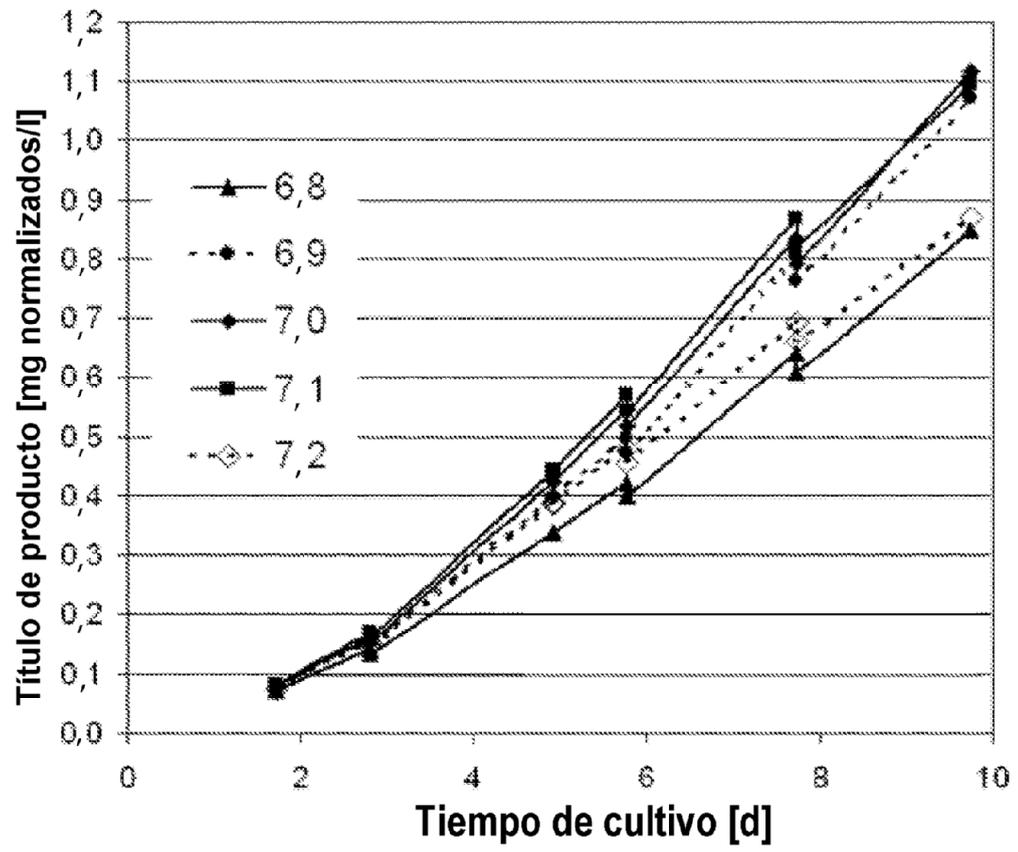


FIG 13A

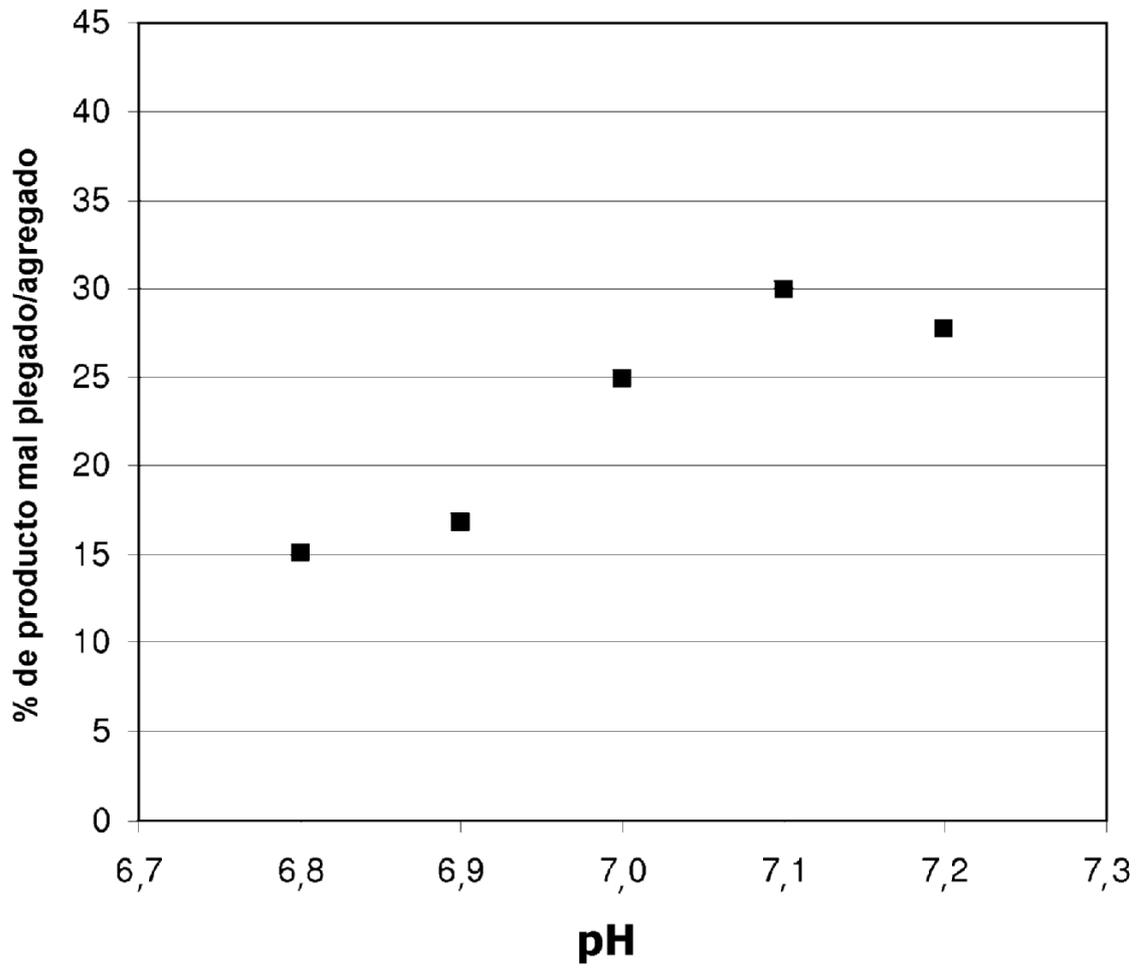


FIG. 13B

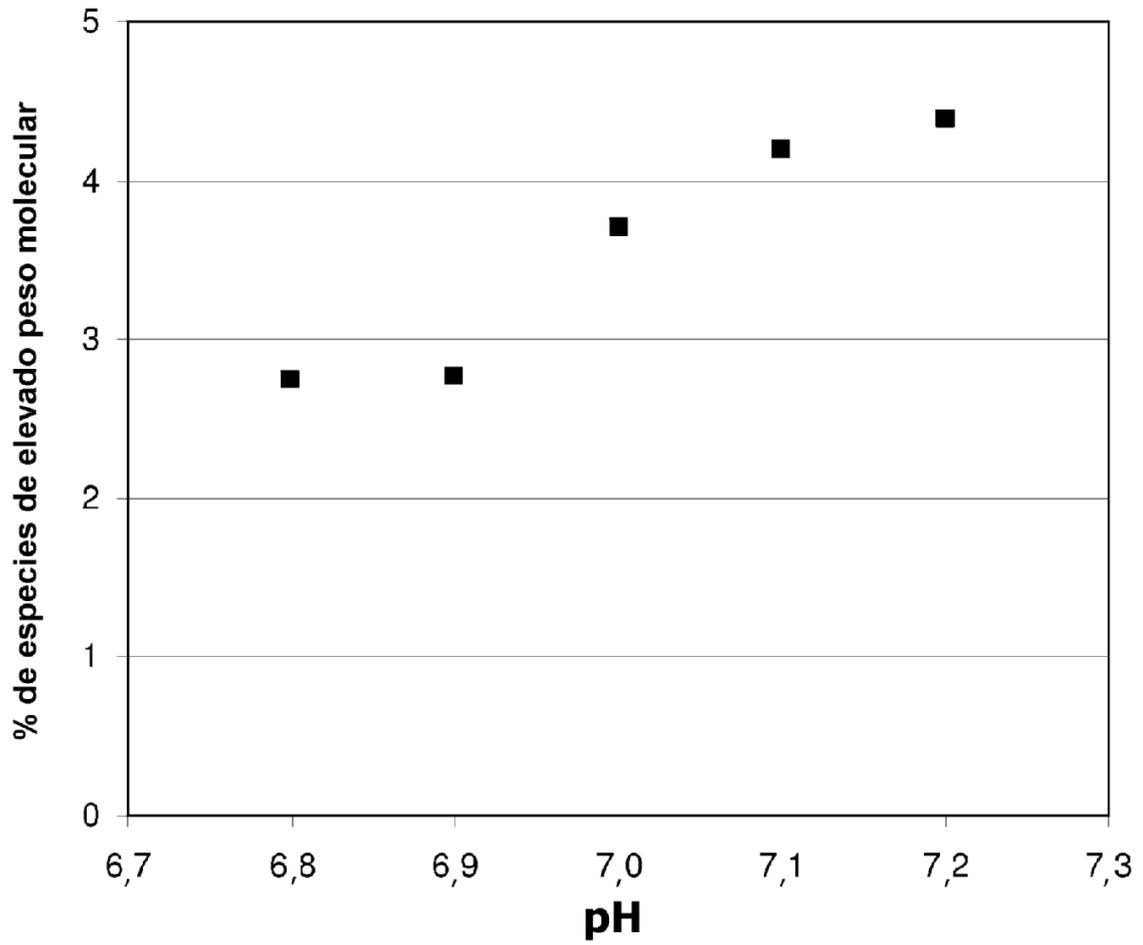


FIG. 14A

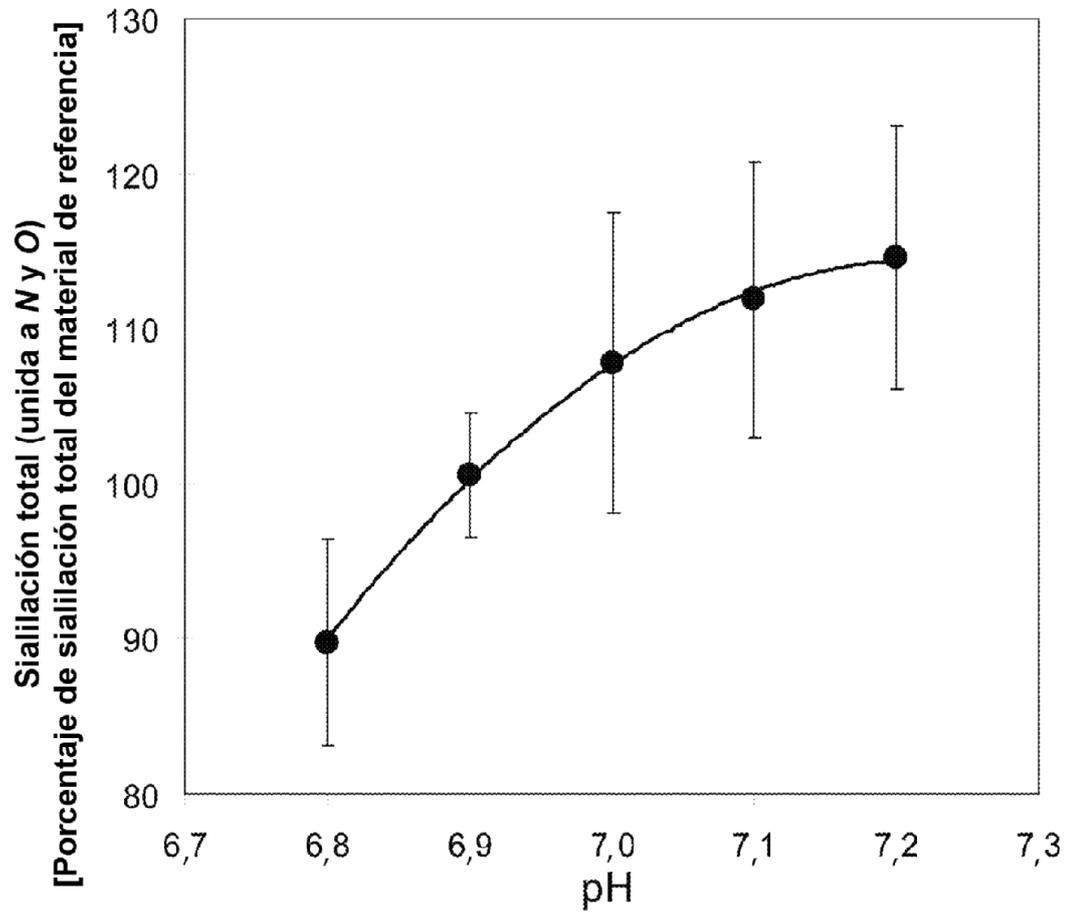


FIG. 14B

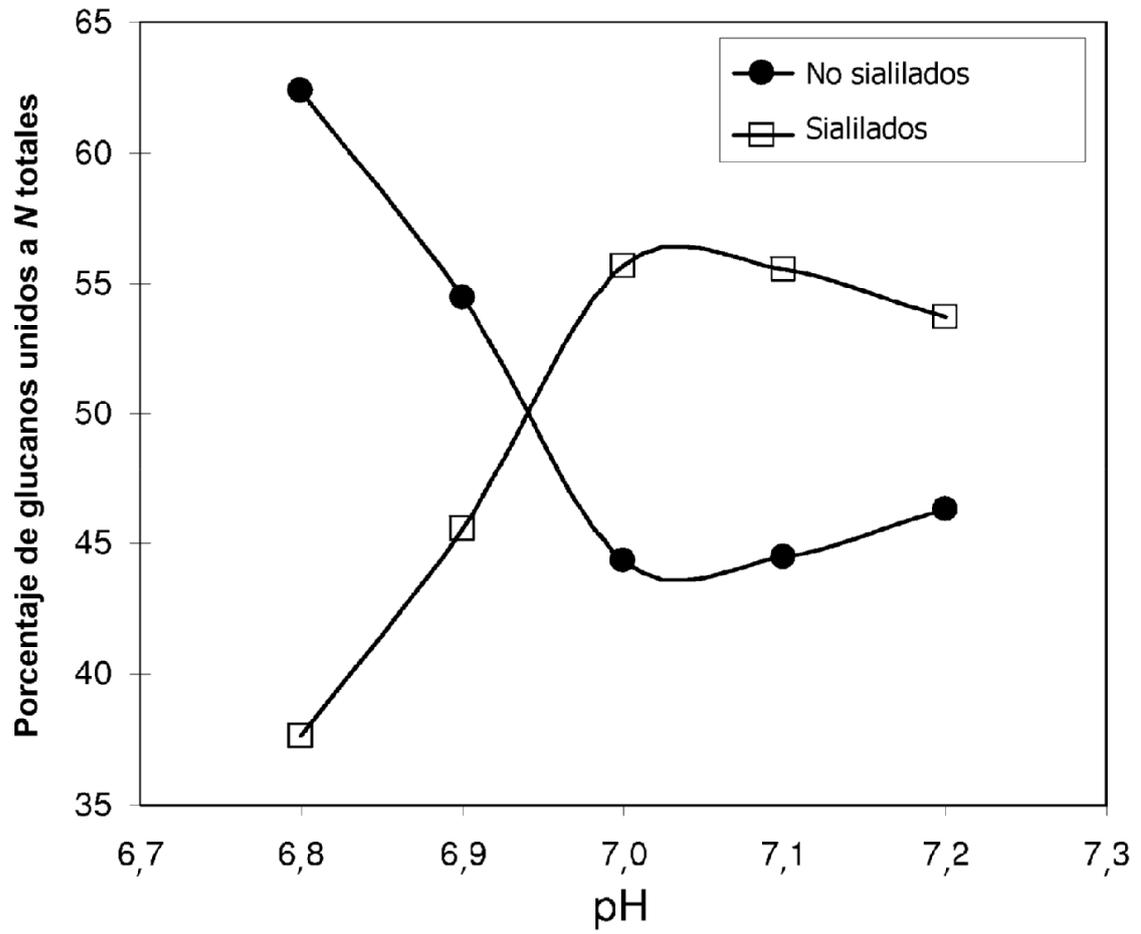


FIG. 15

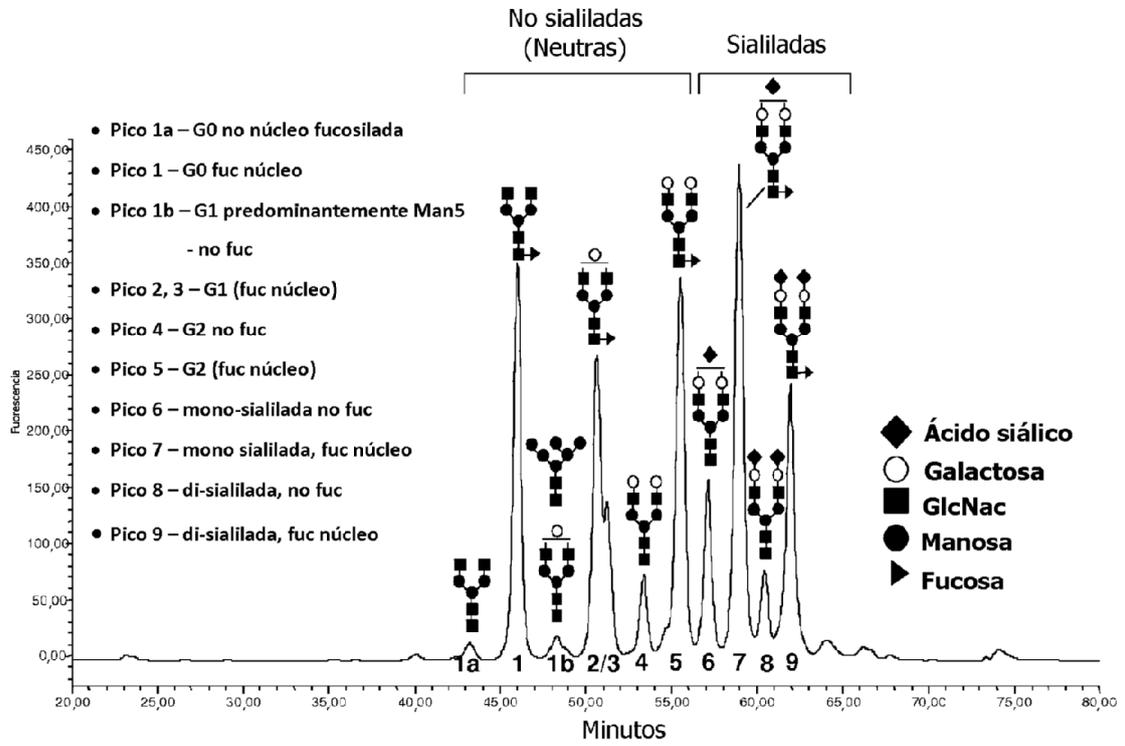


FIG. 16

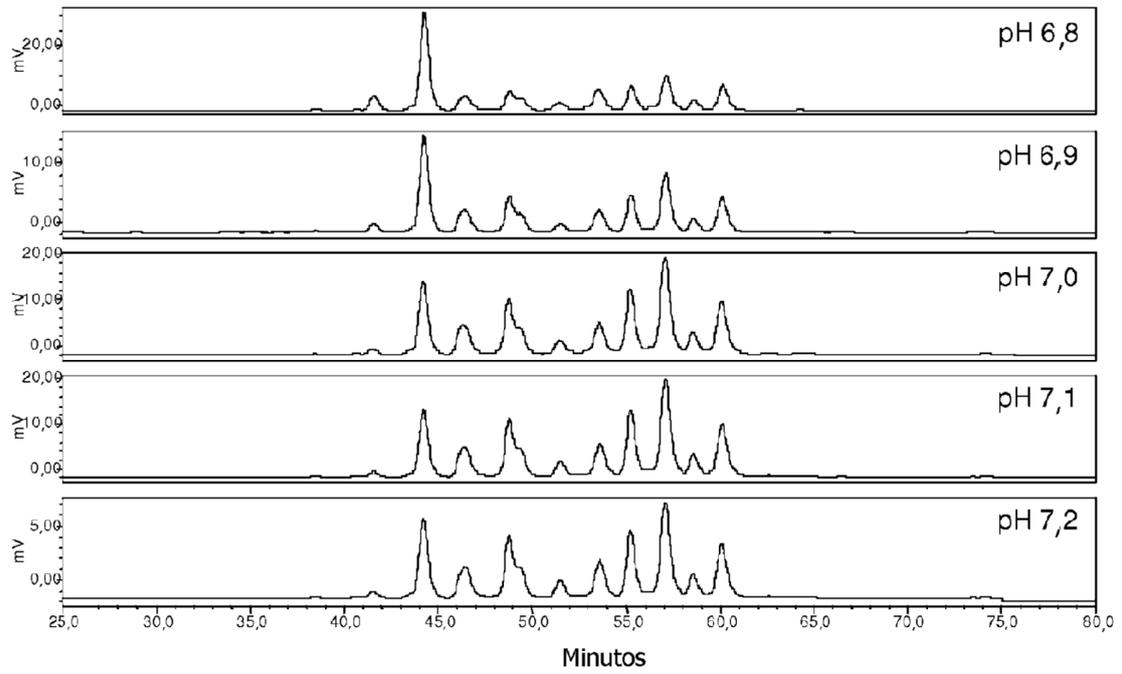


FIG. 17A

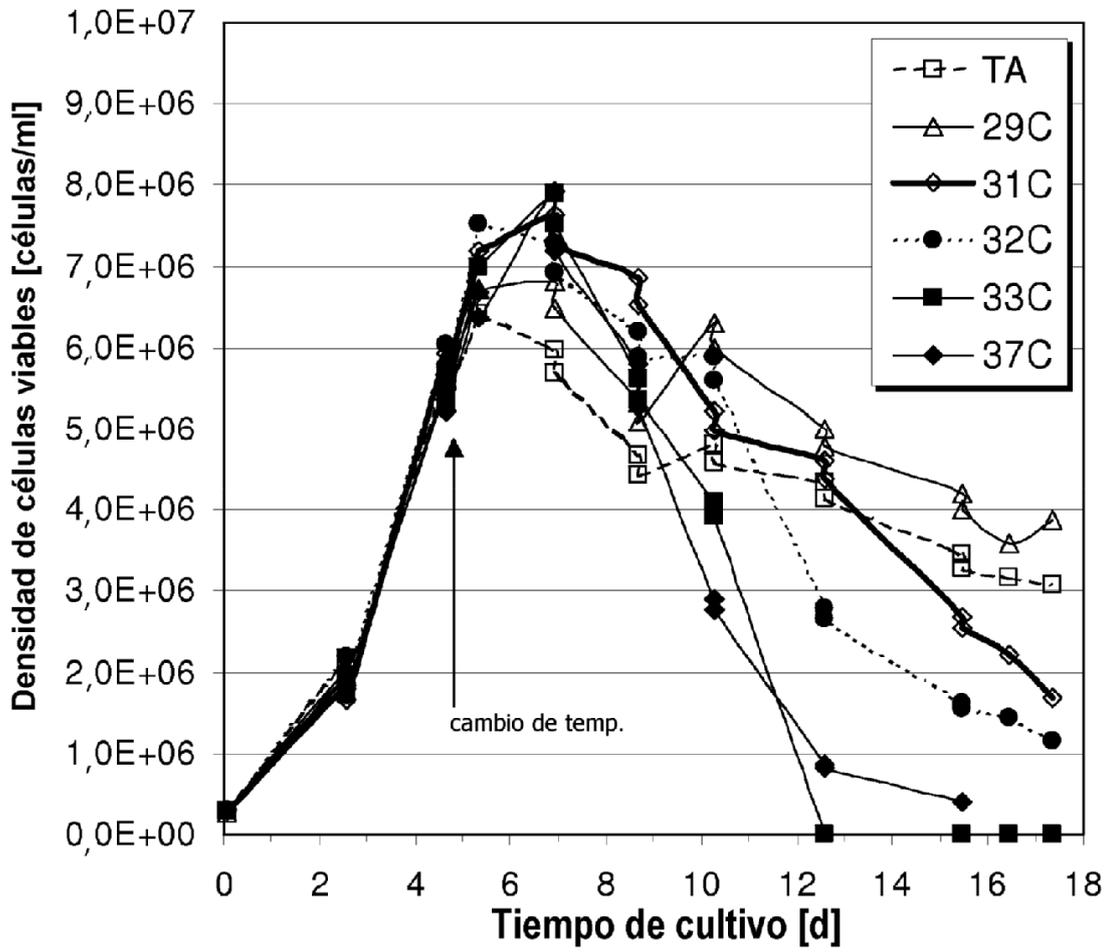


FIG. 17B

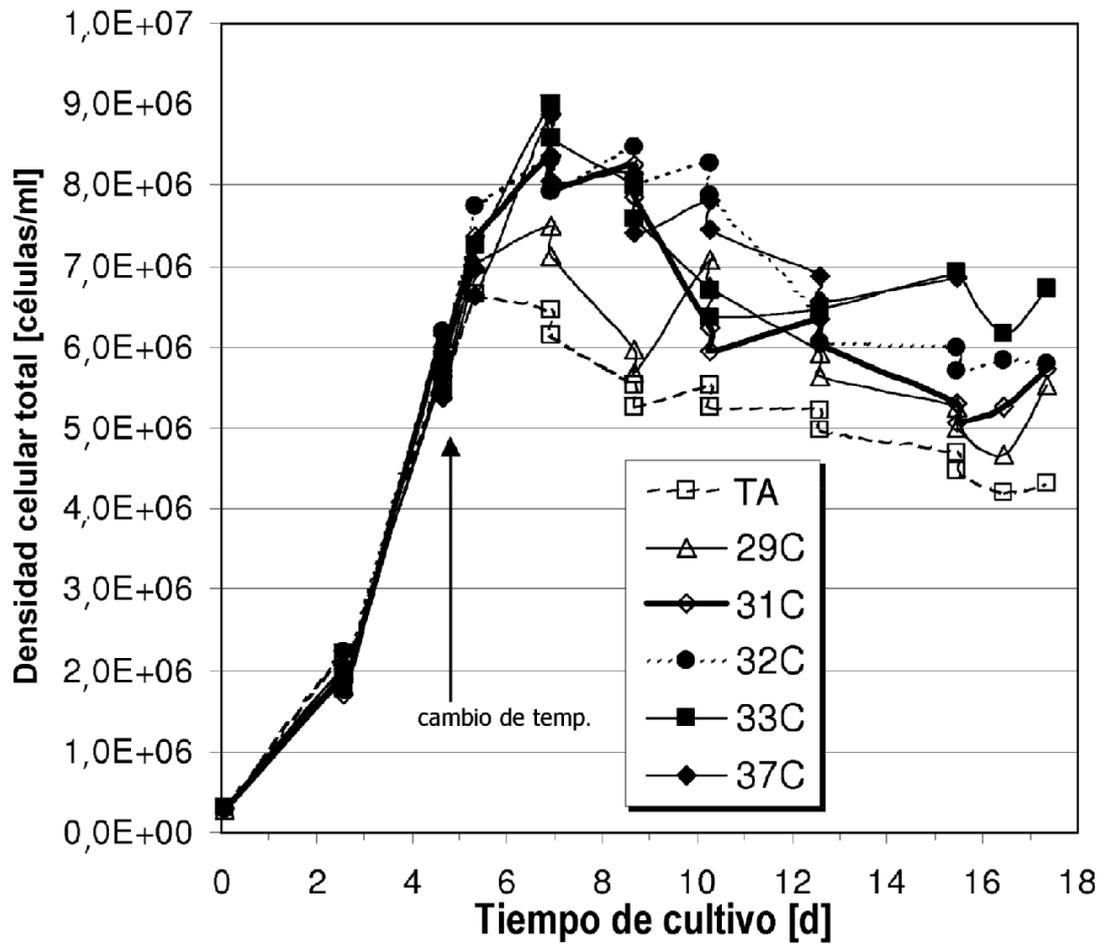


FIG. 17C

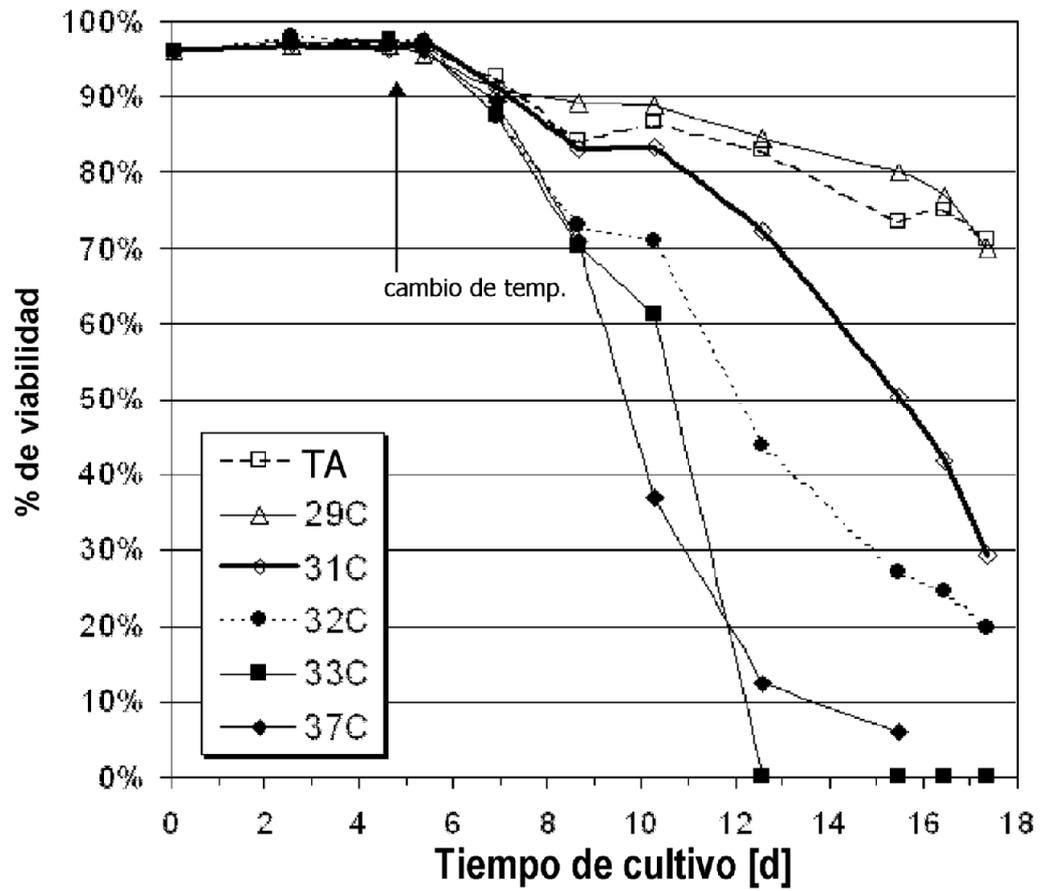


FIG. 17D

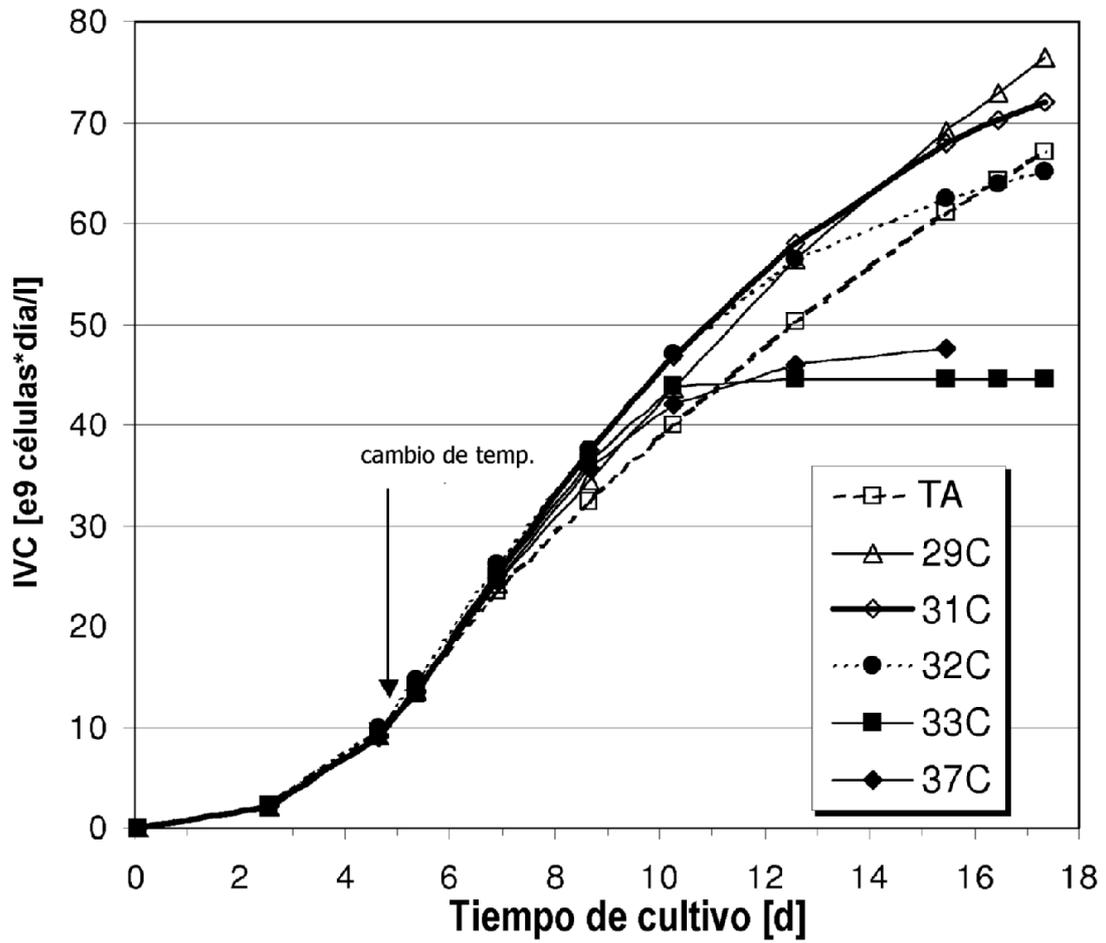
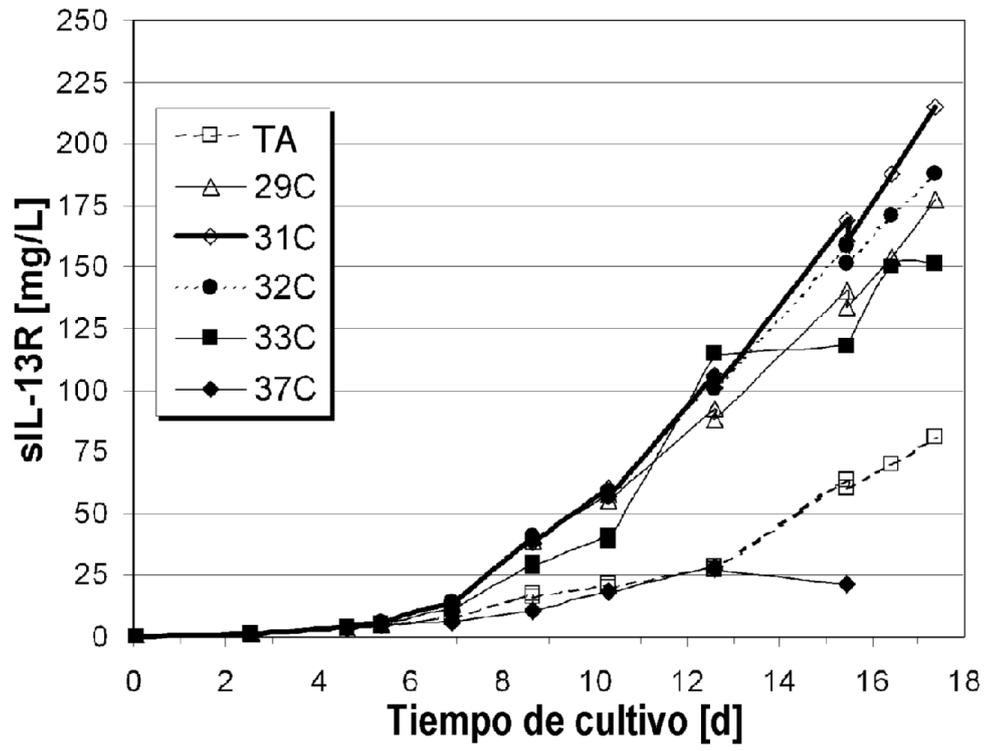


FIG. 18



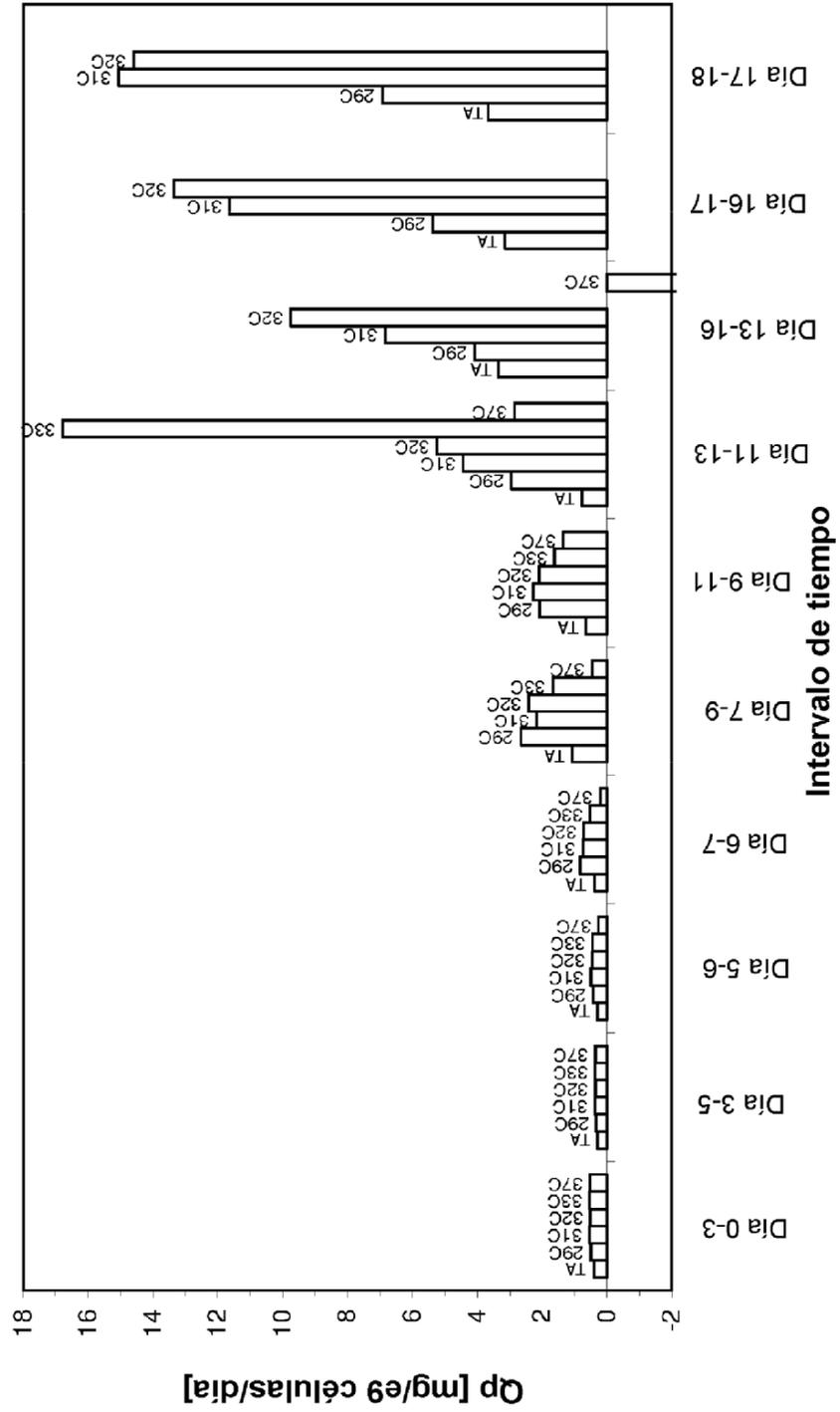
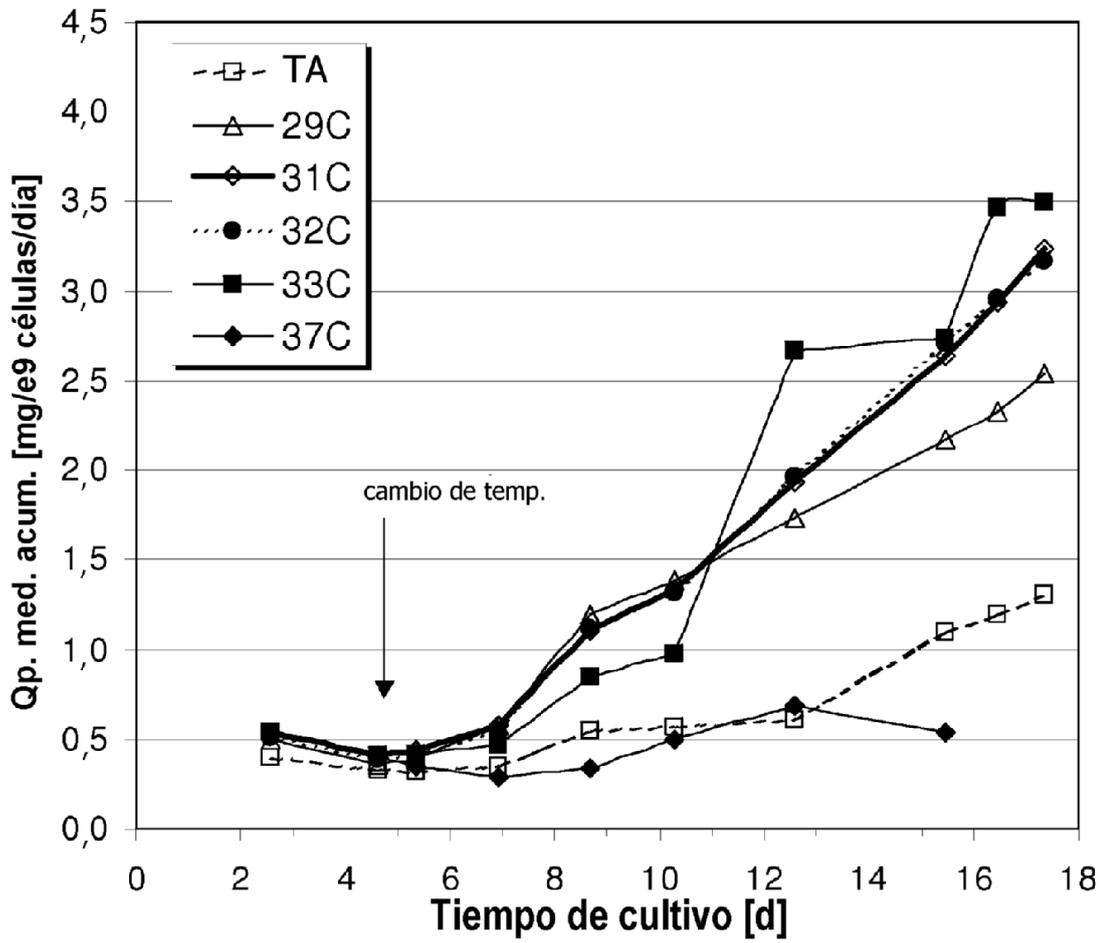


FIG. 19A

FIG. 19B



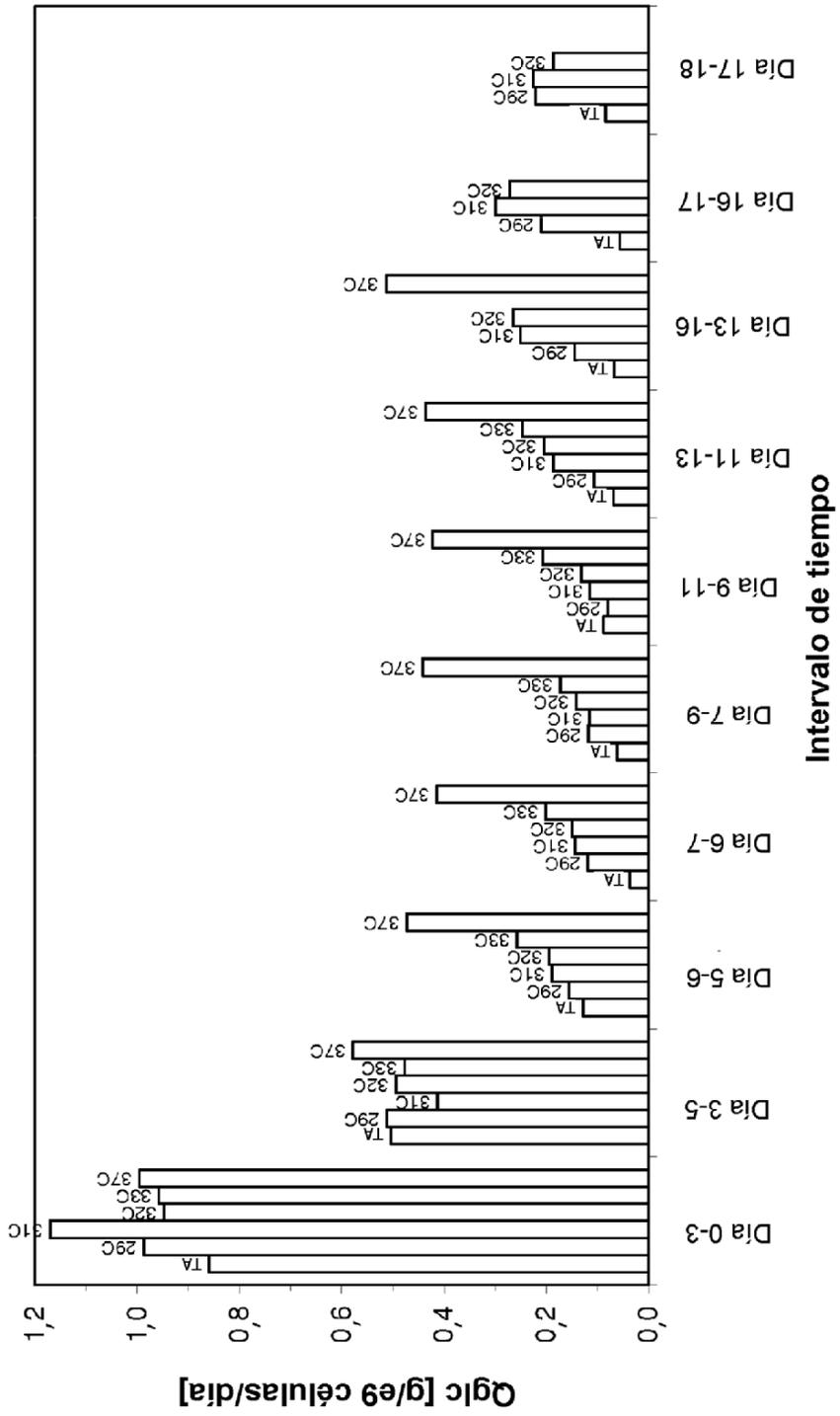


FIG. 20

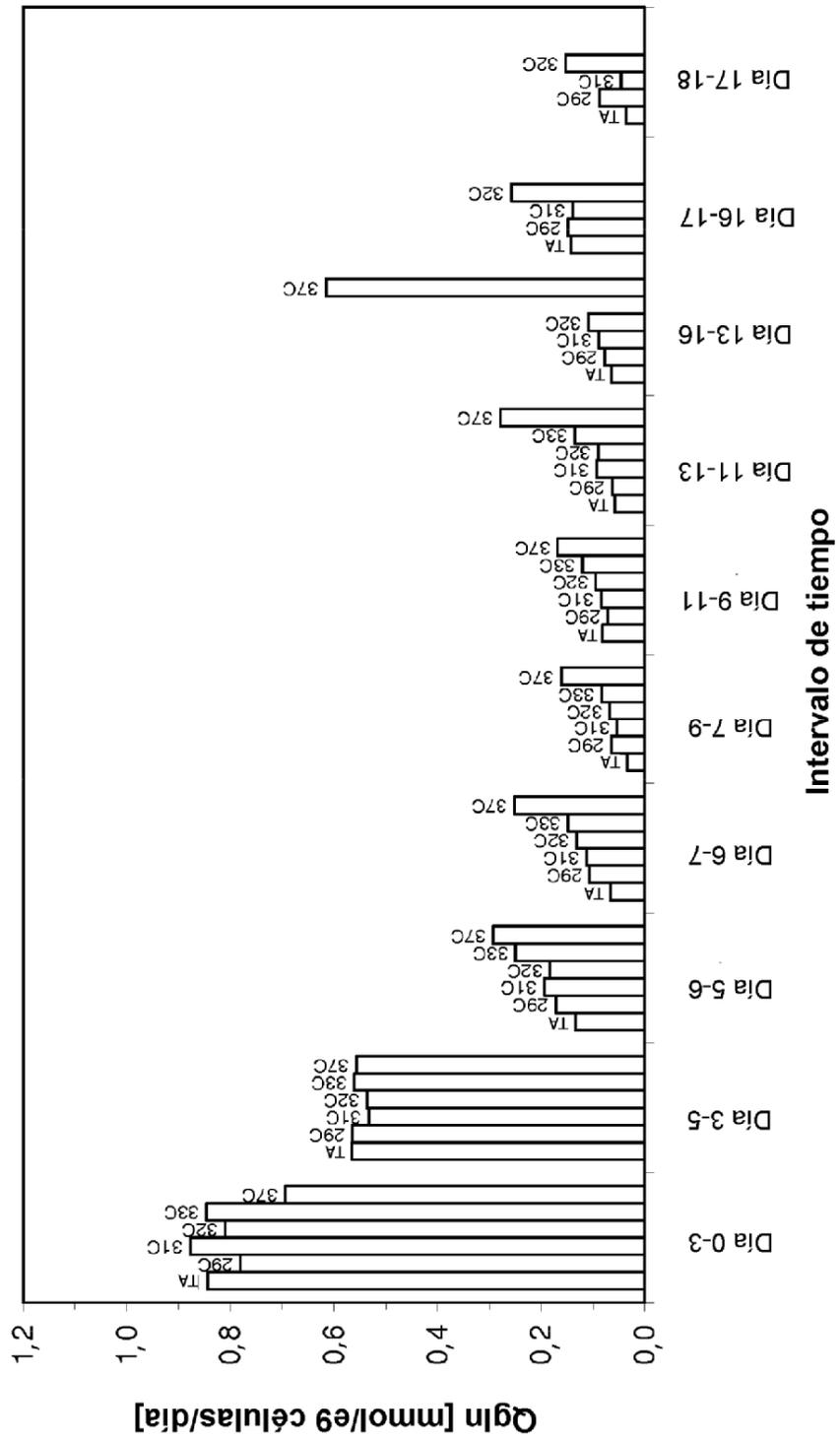


FIG. 21

FIG. 22

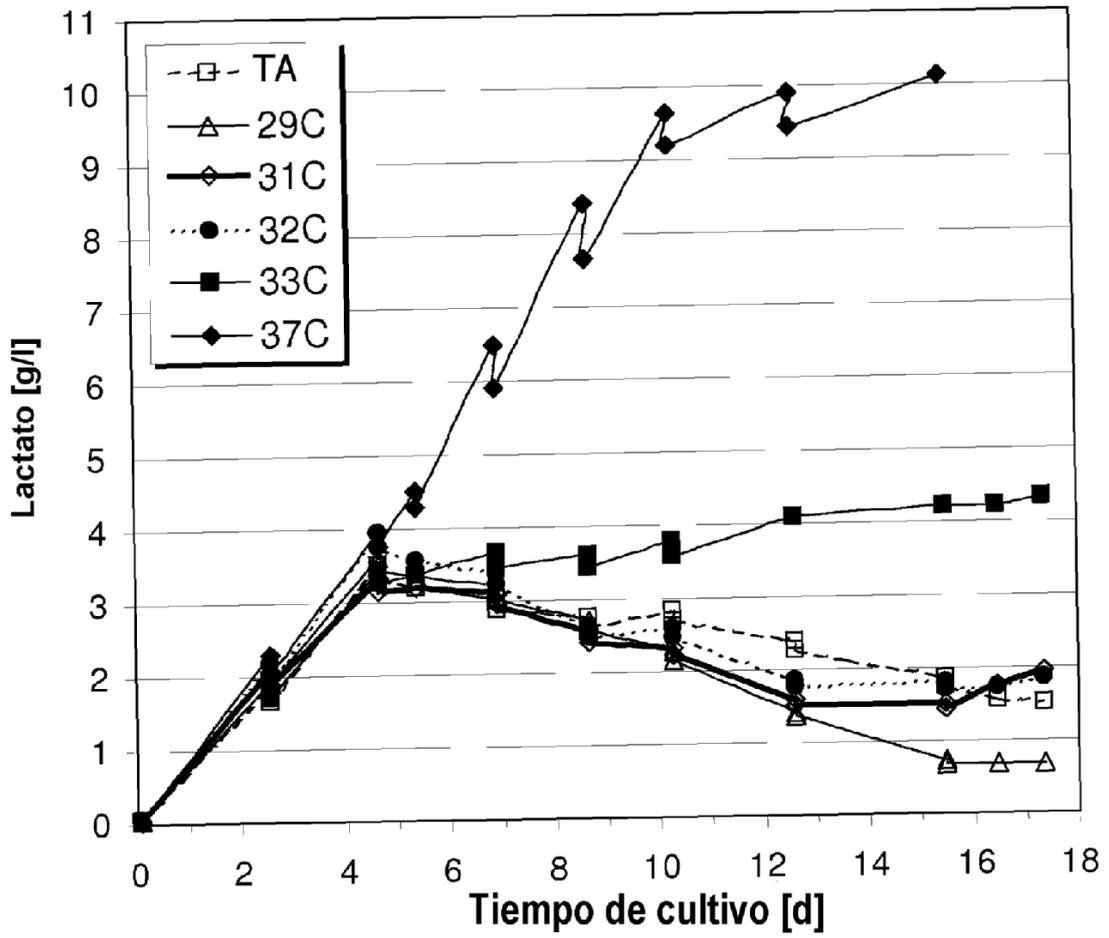


FIG. 23

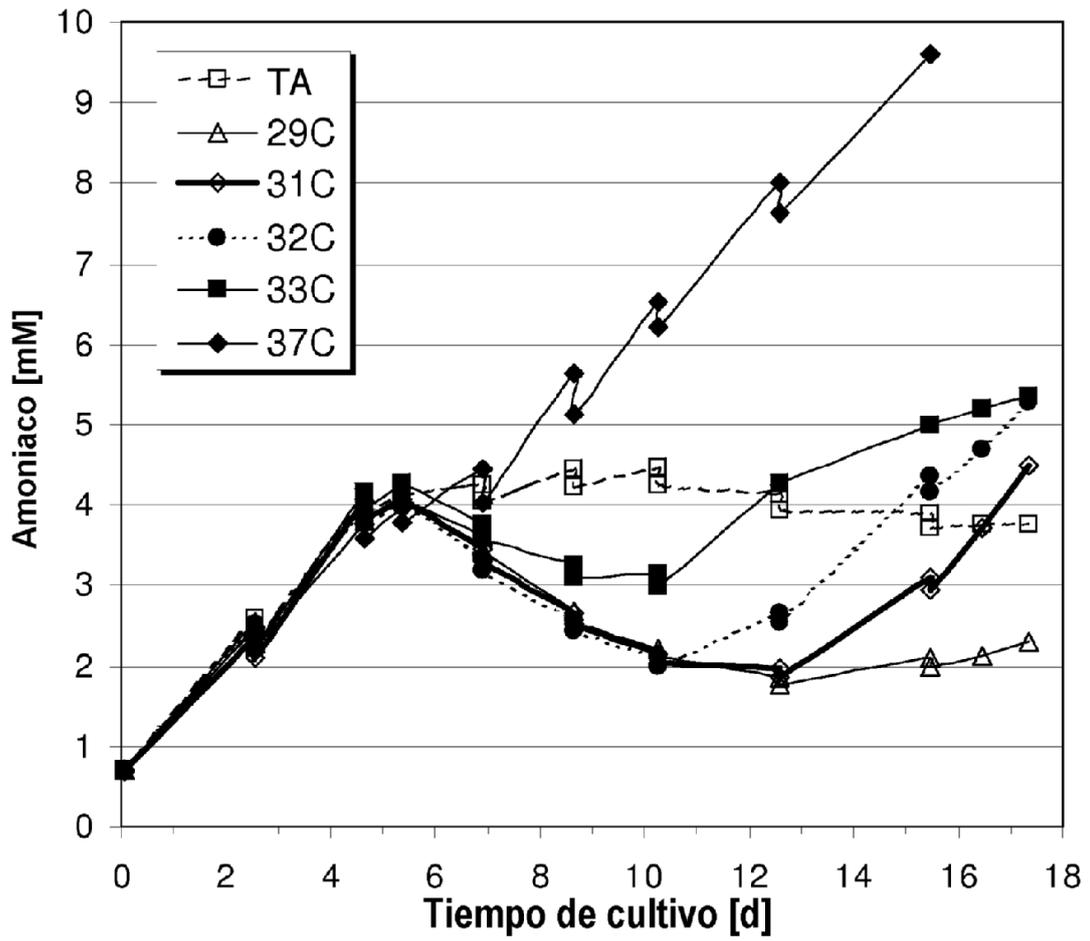


FIG. 24

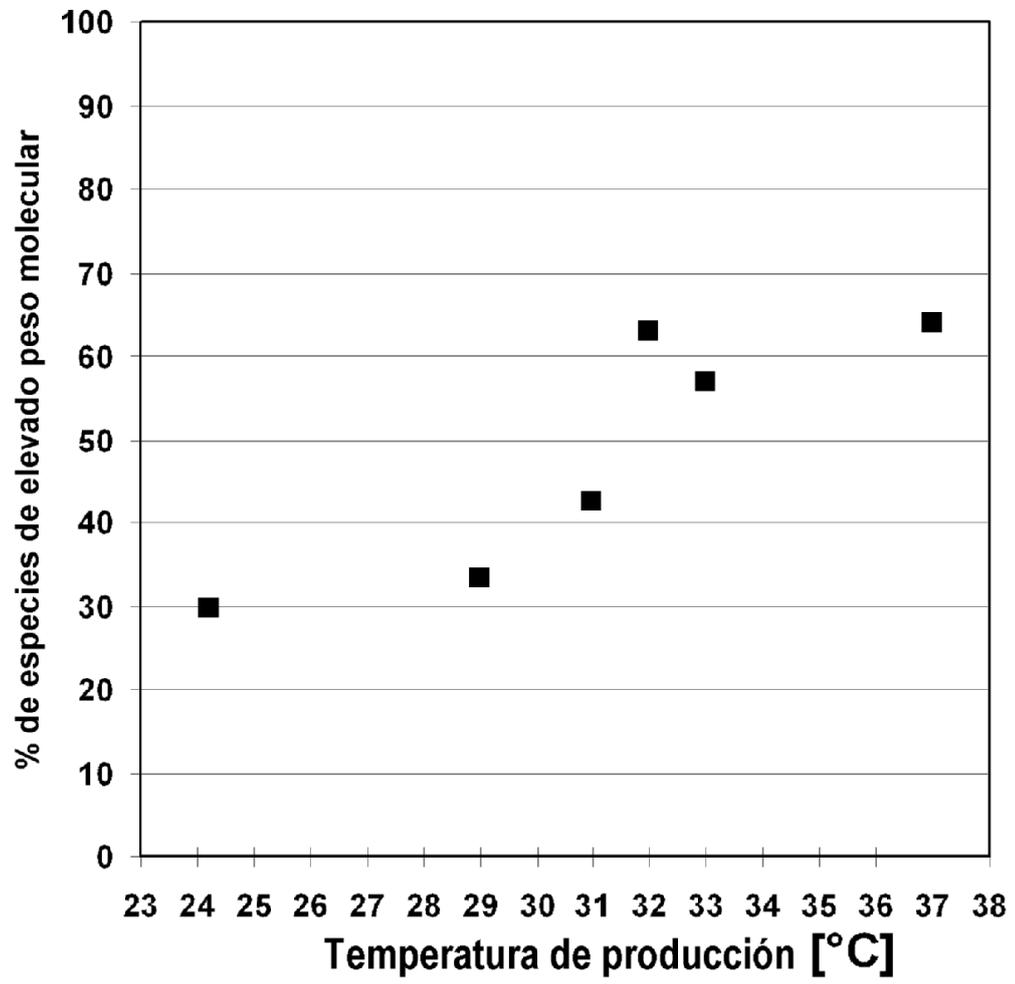


FIG. 25

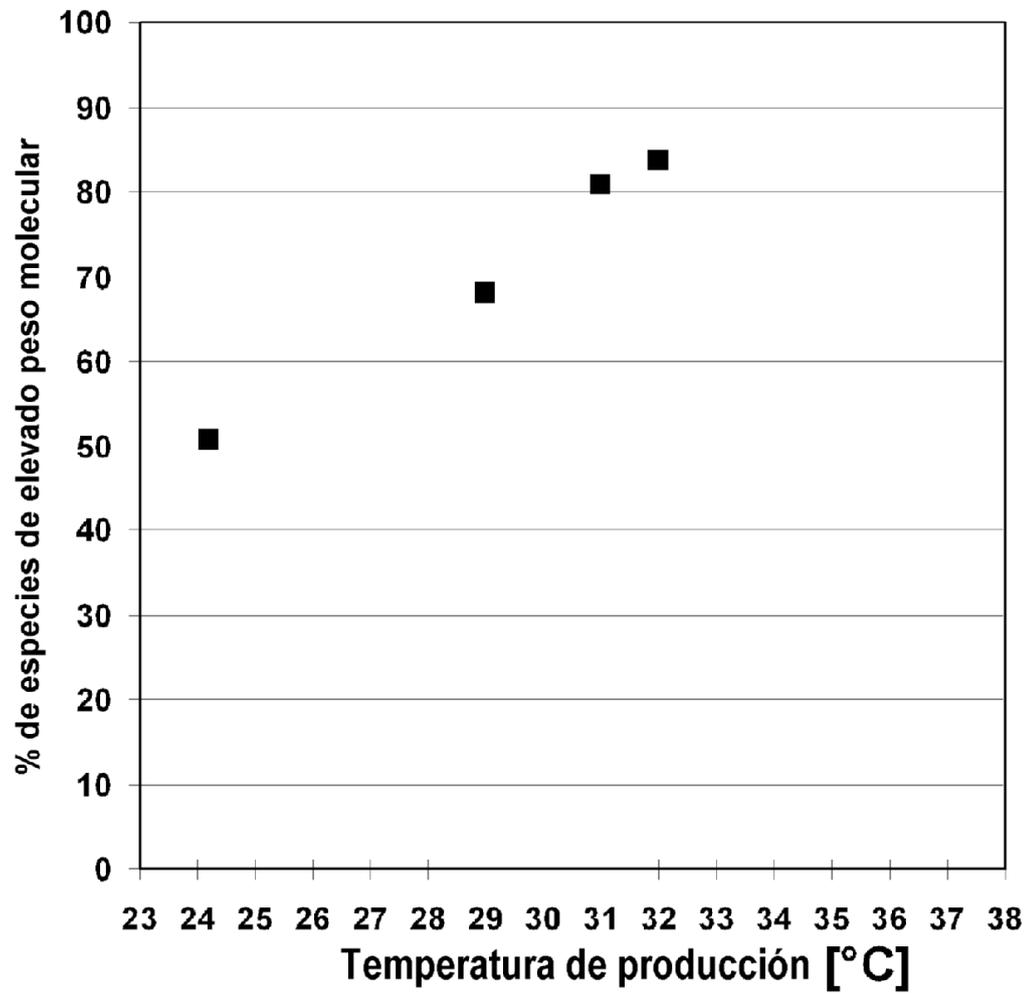


Figura 26A

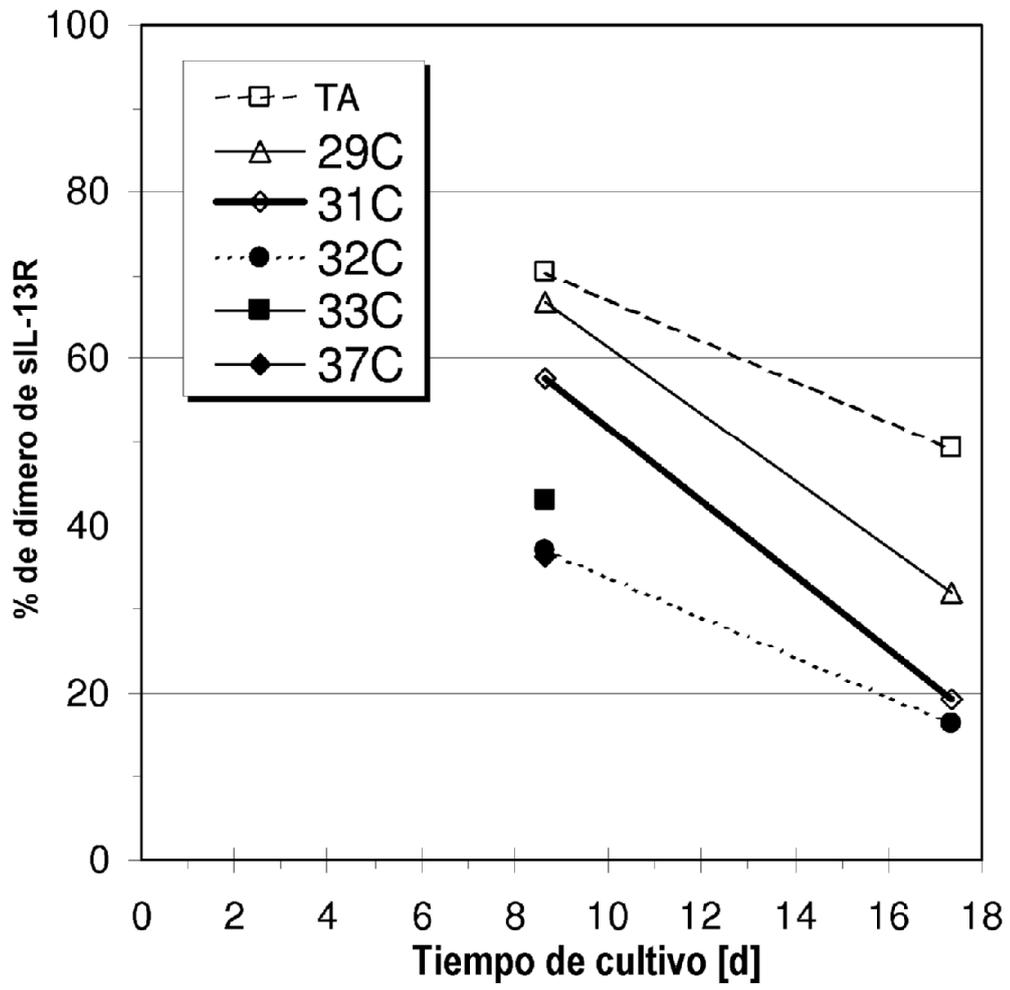


FIG. 26B

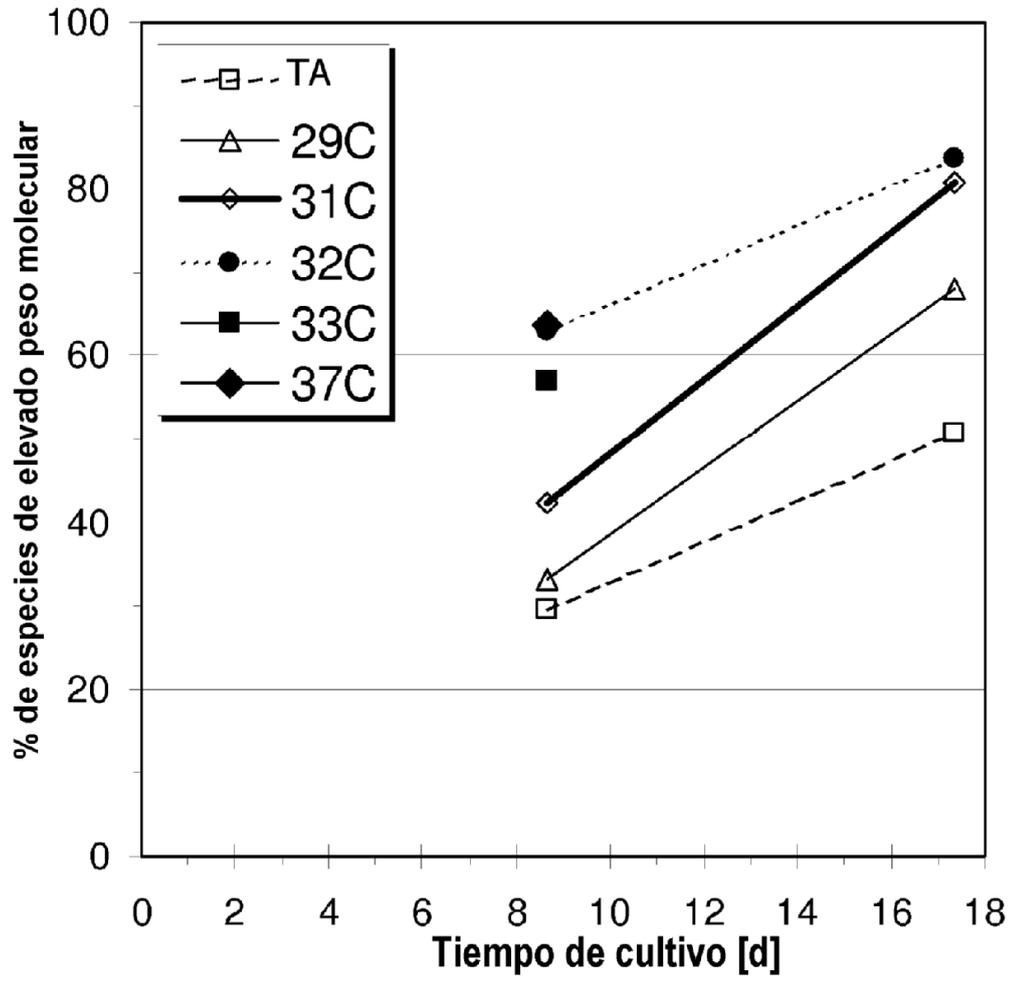


FIG. 27

