

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 117**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2011 PCT/EP2011/056507**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11134919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2011 E 11715933 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2563906**

54 Título: **Proceso de cultivo celular de CHO**

30 Prioridad:

26.04.2010 US 327846 P

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

13.03.2018

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**JOOSTEN, CHRISTOPH E.;
LEIST, CHRISTIAN y
SCHMIDT, JÖRG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 659 117 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

Proceso de cultivo celular de CHO

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se relaciona con el campo general de la biotecnología, particularmente el cultivo de células y su uso para la producción de polipéptidos a escala industrial.

10 La presente invención proporciona procesos de cultivo celular caracterizados por al menos un cambio de temperatura y al menos un cambio de pH. Estos procesos son adecuados para el cultivo de células con una alta viabilidad celular, de preferencia células de mamífero similares a células CHO. Los procesos de cultivo celular de acuerdo con la presente invención además permiten obtener altas productividades de polipéptidos cuando se utilizan para la producción de un polipéptido, en particular mediante la expresión recombinante de polipéptidos en sistemas de cultivo de células de mamífero, en particular a escala industrial.

Antecedentes técnicos de la invención

15 La preparación de polipéptidos utilizando la tecnología recombinante, ha desarrollado un procedimiento normalizado durante los últimos veinte años. El acceso a polipéptidos recombinantes mediante la clonación de genes que codifican para el respectivo polipéptido, seguido por una transformación subsecuente de huéspedes de expresión adecuados con el gen por ser expresado y la producción final y purificación del polipéptido recombinante obtenido, ha proporcionado acceso a toda una nueva clase de agentes terapéuticos biológicamente diseñados y producidos.

20 La industria farmacéutica prepara cada vez más compuestos farmacéuticamente activos utilizando la tecnología de ADN recombinante, seguida por procesos de producción desarrollados en el campo de la bioingeniería.

Tales productos biológicos incluyen anticuerpos monoclonales, que se han desarrollado como opciones importantes de tratamiento en diversos campos médicos, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios, inmunosupresión, oncología o similares.

25 El desarrollo de tales agentes terapéuticos de origen biológico requiere una producción a escala industrial, proporcionando de esta manera acceso a grandes cantidades del polipéptido recombinante. Los sistemas de expresión preferidos son cultivos de células de mamífero, que son superiores a la mayoría de los demás sistemas eucarióticos basados en células de insecto, de levadura o similares, o incluso los tradicionales sistemas de expresión en procariones.

30 Sin embargo, el cultivo de células de mamífero incluye grandes desafíos especialmente a escala industrial. Las instalaciones de producción para los cultivos de células de mamífero requieren una completa optimización de numerosas condiciones del proceso.

35 En particular, los procesos de cultivo celular para la producción de polipéptidos en células de mamífero requieren una optimización continua de las condiciones de cultivo y su adaptación a líneas de células específicas o productos, con el fin de alcanzar un alto rendimiento volumétrico del producto, en combinación con una calidad óptima del producto.

40 Muchos esfuerzos previos se han concentrado en los parámetros básicos de los medios de cultivo celular, incluyendo sus composiciones relacionadas por ejemplo a clases y concentraciones de iones, aminoácidos, vitaminas o elementos traza, o a la osmolaridad del medio. Otros parámetros importantes, que han sido el foco de la investigación, son por ejemplo la composición de alimentación o programas de alimentación para alcanzar el crecimiento celular óptimo.

45 También, la temperatura y pH como parámetros fisiológicos básicos se sabe que tienen influencia significativa en el cultivo de células de mamífero. La temperatura en general, afecta de manera considerable el estado de crecimiento y la viabilidad de las células. Además de esto, sin embargo, también puede tener influencia más específica en el producto polipeptídico y sus características, alterando por ejemplo la glucosilación (US 2003/0190710 A1; EP 1 373 547 A1; US 2004/0214289 A1).

50 El pH en el cual el medio de crecimiento y las células se mantienen también puede influenciar y alterar el crecimiento celular y la producción polipeptídica de una manera específica, que dependa de la línea de células y el producto particulares (Sauer *et al.* Biotechnology and Bioengineering 2000, Vol. 67, pág. 586-597; Yoon *et al.*, Biotechnology and Bioengineering 2004, Vol. 89, pág. 346-356; Kuwae *et al.*, Journal of Bioscience and Bioengineering 2005, Vol. 100, pág. 502-510).

55 En el transcurso del cultivo, los requerimientos de las células pueden cambiar. Mientras que al inicio es ventajoso optimizar las condiciones hacia un crecimiento celular mejorado, en las últimas etapas se vuelve importante el mejoramiento de supervivencia celular y el mantenimiento de la densidad de células viables en relación con la obtención de altos títulos del producto. A este respecto, se ha sugerido la introducción de uno

o más cambios de temperatura durante el cultivo celular (Chen *et al.*, J Biosci Bioeng. 2004; 97 (4):239-43). Para esto, las células de mamífero se cultivan al menos a dos diferentes temperaturas, en donde la primera temperatura más elevada es optimizada para el crecimiento, en tanto que la segunda o tercer temperaturas más bajas son seleccionadas para mejorar la productividad de las células (por ejemplo Weidemann *et al.*, Cytotechnology. 1994; 15(1-3): 111-6; WO 00/36092; EP 0 764 719 A2, US 2005/019859, EP 1 575 998, US 2008/081356). Otros documentos describen el uso de los cambios de temperatura en combinación con características de medios específicos adicionales. El documento EP 1 757 700 A2, por ejemplo, divulga un cambio de temperatura en combinación con la presencia de sales butirato como un componente de los medios, en tanto que la EP 1 789 571 A1, describe un cambio de temperatura combinado con un contenido de aminoácido definido.

También, se han cambiado otras condiciones del cultivo celular. El documento US 5 856 179 ha presentado un método para producir polipéptidos en un cultivo celular por lotes con alimentación, en donde durante el cultivo, la osmolaridad del medio se ve considerablemente alterada en aproximadamente de 280 a 330 mOSm en la fase principal del crecimiento, a aproximadamente 400-600 mOSm durante la fase de producción.

El documento WO 02/101019 ha tomado en cuenta a muchos componentes específicos de los medios tales como la glutamina y concentraciones de glucosa, incluyendo cambios en la temperatura y el pH. Sin embargo, se encontró que un cambio en el pH en los medios con glucosa elevada tiene un impacto negativo sobre el cultivo, y que no se recomienda reducir el pH durante el crecimiento o la fase de producción.

El documento 2006/026445 divulga un método para la producción de polipéptidos, en donde las condiciones del cultivo celular son cambiadas de un conjunto de condiciones de cultivo a un segundo conjunto, y en donde este cambio se combina con características específicas de los medios relacionadas con el contenido de aminoácidos específicos. El cambio en las condiciones específicamente se refiere a cambios en la temperatura. Otros cambios en las condiciones, tales como el pH o la osmolaridad, generalmente se mencionan como opciones adicionales; sin embargo, no se especifican ajustes en parámetros particulares.

Trummer *et al.*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 94, No. 6 (2006), 1045 - 1052, describen un proceso de cultivo bifásico para células CHO que expresan Epo-Fc, que abarca cambios simultáneos de temperatura y pH, y el uso de un medio que comprende peptona de soja y un bajo contenido de aminoácidos.

Considerando los desafíos anteriores y las desventajas existentes, hay una necesidad continua en el campo de la biotecnología industrial, para mejorar los procesos de cultivo que permitan la producción de polipéptidos recombinantes a una escala industrial con incluso rendimientos mayores; es decir, una productividad específica y general mejorada, y un incremento en la calidad del producto.

Un objetivo técnico específico de los procesos de producción de polipéptidos, es mantener una alta viabilidad celular y maximizar el rendimiento final del polipéptido, optimizando los parámetros de los procesos de cultivo celular generales.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una combinación de cambios en la temperatura y el pH en un proceso para la producción de polipéptidos recombinantes. Adaptadas a las necesidades de células recombinantes, en particular células CHO, combinaciones específicas de estos dos parámetros dan como resultado una mejor productividad de las células, así como una mejor calidad del producto de los polipéptidos producidos de manera recombinante. En particular, la presente invención ha encontrado efectos positivos basándose en el tiempo y programa particulares, de los cambios en la temperatura y pH, en términos absolutos y relativos, referentes a la magnitud particular de los cambios.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se describe un proceso para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende el cultivo de células CHO en un medio, y la expresión del polipéptido recombinante, en donde la temperatura y el pH son cambiados durante el proceso.

En particular, el proceso de acuerdo con la presente invención involucra al menos un cambio de temperatura y al menos un cambio de pH. En una realización de la presente invención, un cambio a partir de una primera temperatura más alta a una segunda temperatura más baja, se lleva a cabo después de que las células primero se hacen crecer y son mantenidas durante al menos 3 días, alternativamente al menos 4 días, o al menos 5 días a una primera temperatura. La segunda temperatura más baja es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8°C menor que la primera temperatura. En una realización alternativa de la presente invención, el cambio de temperatura está por ejemplo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5°C, en particular entre aproximadamente 4°C o aproximadamente 3.5°C. La segunda temperatura, entonces, es mantenida durante al menos dos días. La segunda temperatura puede ser mantenida hasta la cosecha.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la primera temperatura de preferencia se encuentra en el rango de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 38°C, y la segunda temperatura de preferencia se encuentra en el rango de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C.

Además del cambio en la temperatura, también se cambia el pH de un primero a un segundo pH. Por lo tanto,

el proceso de acuerdo con la presente invención comprende al menos un cambio de pH. En particular, las células se hacen crecer a un primer valor de pH durante al menos 2 días, y el pH posteriormente es cambiado a un segundo valor de pH, el cual está entre aproximadamente 0.05 y aproximadamente 1 unidades de pH más bajo que el primer pH, y las células se hacen crecer a el segundo pH durante al menos 1 día, alternativamente durante al menos 2 días. En algunas realizaciones, el segundo pH se mantendrá hasta la cosecha.

5 El primer valor de pH de preferencia se encuentra en el rango de entre aproximadamente pH 6.8 y aproximadamente pH 7.5. El segundo valor de pH de preferencia se encuentra en el rango de entre aproximadamente pH 6.0 y aproximadamente pH 7.1.

10 De esta manera, una realización de la presente invención es un proceso para la producción de un polipéptido recombinante, que comprende el cultivo de células CHO en un medio, bajo condiciones que comprenden a menos un cambio en la temperatura y al menos un cambio del pH, y la expresión del polipéptido recombinante,

en donde

15 – las células se hacen crecer a una primera temperatura durante al menos 3 días, y la temperatura posteriormente se cambia a una segunda temperatura, la cual es entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8°C más baja que la primera temperatura, y las células son mantenidas en dicha segunda temperatura durante un periodo de al menos otros 2 días;

20 – las células se hacen crecer a un primer valor de pH durante al menos 2 días, y el pH posteriormente es cambiado a un segundo valor de pH, el cual se encuentra entre aproximadamente 0.05 y aproximadamente 1 unidades de pH más bajo que el primer pH, y las células se hacen crecer a el segundo pH durante al menos 1 día.

25 El proceso de acuerdo con la presente invención opcionalmente puede comprender un segundo cambio de pH, el cual sigue al primer cambio de pH después de al menos 1 día. Si el primer cambio de pH es seguido por un segundo cambio de pH después de al menos 1 día, entonces el tercer valor de pH es de aproximadamente 0.05 unidades de pH a aproximadamente 1 unidad de pH mayor que el segundo valor de pH. El tercer valor de pH puede ser mantenido hasta la cosecha.

30 El proceso de cultivo celular de la presente invención incluye cambios de pH activos y/o pasivos; es decir, el pH es alterado "activamente" mediante un cambio en el punto de ajuste del pH, a un valor nuevo, y/o alterado "pasivamente" permitiendo un cambio del pH del medio mediante la acumulación de productos metabólicos, siguiendo así un perfil de pH metabólico específico del cultivo celular dentro de un rango de pH predefinido. En una realización preferida de la invención, el cambio activo es inducido haciendo el cambio de pH respectivo y agregando agentes reguladores conocidos por los técnicos en la materia, tales como ácidos, por ejemplo HCl; o bases, por ejemplo NaOH. En una realización adicional preferida del proceso, esto se logra definiendo un punto de ajuste del pH y una banda inactiva, en donde se permita cambiar el pH. En contraste al cambio activo, el cambio pasivo o modificación de pH no es inducido agregando los respectivos agentes modificadores de pH.

40 El proceso de acuerdo con la invención se lleva a cabo utilizando un medio que está libre de proteína y libre de suero y se caracteriza por un contenido de aminoácidos totales de entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, alternativamente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mM.

45 Un proceso preferido como el definido anteriormente se lleva a cabo en una realización de lotes con alimentación, que comprende alimentar al menos dos soluciones nutrientes que son agregadas al cultivo. En tal proceso, por ejemplo, una de las soluciones de alimentación agregada al medio de cultivo, es un alimento que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina. Además, se prefiere que el alimento comprenda el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina a concentraciones respectivas en el rango de aproximadamente 6.5 g/L y aproximadamente 8.0 g/L, y en el rango de aproximadamente 9 g/L y aproximadamente 11 g/L en una solución acuosa a un pH básico por arriba de 10. En particular, las concentraciones pueden ser de aproximadamente 7.25 g/L para cistina, y de aproximadamente 10.06 g/L para tirosina. En una realización preferida, la solución de alimentación que comprende cistina y tirosina es agregada al medio de cultivo en el

50 rango de aproximadamente 0.2 y aproximadamente 0.8% en peso con respecto al peso del medio de cultivo inicial por día, o alternativamente a aproximadamente 0.4% en peso con respecto al peso del medio de cultivo celular inicial por día.

55 El proceso de acuerdo con la invención de preferencia se utiliza para la producción de un polipéptido recombinante que es glucosilado. De acuerdo con realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras. Los Ejemplos, sin embargo, no pretenden limitar los alcances de la invención.

La Fig. 1 es una ilustración de la implementación del cambio en un paso de un cambio activo en el pH con un cambio del pH de 7.00 a 6.80.

5 La Fig. 2A muestra un perfil de pH obtenido mediante una implementación de cambio pasivo de pH. El cambio de pH de 7.00 a 6.80 en el biorreactor de producción se logró ajustando el punto de ajuste a 6.90, y definiendo una banda inactiva de 0.10. Después de un primer cambio de pH a 6.80, el pH es mantenido activamente a 6.80 hasta el final del cultivo.

La Fig. 2B muestra un perfil de pH con un segundo cambio de pH. En este ejemplo, el límite superior de pH (previo) no se alcanzó.

10 La Fig. 2C muestra un perfil de pH con un segundo cambio de pH, pero aquí el pH alcanza de nuevo el límite más alto de pH y se mantiene ahí.

La Fig. 3 muestra el efecto de una temperatura constante versus un cambio de temperatura en la densidad de células viables de un clon de células CHO como función del tiempo de cultivo en cultivos en matraces en agitación (véase el Ejemplo 1).

15 La Fig. 4 muestra el efecto de una temperatura constante versus un cambio de temperatura en la viabilidad de un clon de células CHO productora de mAb1 (véase el Ejemplo 1).

La Fig. 5 muestra el título de producto como función del tiempo de cultivo para cultivos en matraces en agitación de un clon de células CHO productora de mAb1, con y sin un cambio de temperatura (véase el Ejemplo 1).

20 La Fig. 6 muestra la concentración de lactato a lo largo del tiempo de cultivo en un clon productor de mAb2 (véase el Ejemplo 2).

La Fig. 7 muestra la densidad de células viables como función del tiempo de cultivo en un biorreactor de 300 L con un clon de células CHO. Las condiciones del cultivo incluyeron un cambio de temperatura (día 5) y dos cambios de pH, debido a la regulación de pH con un punto de ajuste y una banda inactiva (véase también el Ejemplo 2).

25 La Fig. 8 muestra el título de producto como función del tiempo de cultivo en un biorreactor de 300 L, con un clon de células CHO. El proceso combinó una temperatura con cambios de pH (véase también la Fig. 7 y el Ejemplo 2).

30 La Fig. 9 muestra para tres experimentos independientes, la concentración de mAb3 obtenida por un proceso de lotes con alimentación con cultivos de células CHO cultivadas en un biorreactor de vidrio como una función de la integral de células viables. Las condiciones del cultivo incluyeron un cambio de temperatura idéntico para los tres experimentos, y un cambio de pH adicional sólo en un experimento.

Descripción detallada de la invención

35 De acuerdo con la presente invención, un proceso para la preparación de un polipéptido recombinante comprende el cultivo de células CHO y la expresión del polipéptido recombinante, en donde la temperatura y el pH son cambiados durante el proceso. La presente invención busca mejorar el proceso de la producción a gran escala de polipéptidos en el cultivo de células CHO, mediante la adaptación dinámica de las condiciones del cultivo celular durante el transcurso del cultivo, incluyendo cambios en la temperatura y el pH.

40 El término "producción a gran escala" de polipéptidos, se refiere a las cantidades típicamente requeridas para la producción industrial de polipéptidos recombinantes utilizados para la preparación de productos biofarmacéuticos terapéuticamente activos. Los cultivos celulares con volúmenes de medios de cultivo celular de al menos 500 L, o al menos 1,000 L, o alternativamente al menos 5,000 L, o incluso volúmenes mayores, típicamente representan aplicaciones de producción a gran escala.

45 El término "medio de cultivo celular" tal como se utiliza en la presente, se refiere a una solución acuosa de nutrientes que pueda ser utilizada para hacer crecer células durante un periodo prolongado de tiempo. Típicamente, los medios de cultivo celular incluyen los siguientes componentes: una fuente de energía, la cual generalmente será un compuesto carbohidrato, de preferencia glucosa, aminoácidos, de preferencia el conjunto básico de aminoácidos, incluyendo todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y/u otros compuestos orgánicos que son requeridos a concentraciones bajas, ácidos grasos libres, y compuestos inorgánicos, incluyendo elementos traza, sales inorgánicas, compuestos amortiguadores y nucleósidos y bases.

50 El uso de los medios de cultivo celular en el campo de la industria farmacéutica, por ejemplo para la producción de polipéptidos recombinantes terapéuticamente activos, generalmente no permite el uso de ningún material de origen biológico, debido a aspectos de seguridad y contaminación. Por lo tanto, el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención, de preferencia es un medio libre de suero y/o libre de proteínas. El término "libre de suero y/o libre de proteínas" representa un medio químicamente definido en su

55

- totalidad, que no contiene aditivos de ninguna fuente animal, tales como hidrolizados de tejidos, por ejemplo suero fetal bovino o similares. Además, de preferencia no se agregan proteínas, especialmente factores de crecimiento tales como la insulina, transferrina o similares, al cultivo celular, de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el medio de cultivo celular de acuerdo con la presente invención, tampoco es suplementado con una fuente de proteína hidrolizada tal como peptona de soya, trigo o arroz, o hidrolizado de levadura o similares.
- El término "cambio de temperatura" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un cambio en la temperatura del cultivo en un biorreactor/recipiente de cultivo, alterando activamente el punto de ajuste de la temperatura a un valor más bajo. La temperatura primero es controlada y estabilizada a una temperatura definida durante un periodo de tiempo, y después el cambio en el punto de ajuste entonces es estabilizado a otra temperatura definida durante un periodo de tiempo. El cambio de temperatura no se refiere a pequeñas fluctuaciones espontáneas de temperatura en el cultivo.
- El término "cambio del pH" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un cambio en el pH del cultivo en un biorreactor/recipiente de cultivo, alterando activamente el punto de ajuste del pH a un valor más bajo o más alto, o permitiendo que ocurra un cambio del pH entre el límite de pH más alto y más bajo.
- Dependiendo del tamaño del recipiente/biorreactor de cultivo y el volumen del cultivo, el cambio en el parámetro respectivo tal como se mide en el medio, puede tomar de unos minutos hasta varias horas.
- El pH puede ser cambiado de dos diferentes formas, mediante un enfoque activo y/o pasivo, como se describe con más detalle en lo sucesivo.
- El término "cambio activo" en el pH, se define por un cambio en el punto de ajuste del pH a un nuevo valor. En una realización preferida de la invención, el cambio activo es inducido aplicando cambio de pH respectivo y agregando el o los agentes reguladores conocidos por un técnico en la materia.
- El término "cambio pasivo", indica que durante un cambio pasivo en el pH, a las células por sí mismas se les permite cambiar el pH del medio, mediante la acumulación de productos metabólicos, siguiendo así un perfil de pH metabólico específico del cultivo celular dentro de un rango de pH predefinido. En una realización del proceso, esto se logra definiendo un punto de ajuste de pH y una banda inactiva, en donde se permite que cambie el pH. En contraste con el cambio activo, el cambio pasivo o modificación del pH no es inducido agregando los respectivos agentes de cambio de pH.
- Se agregan agentes reguladores de pH a los cultivos, con el fin de mantener el pH a un punto de ajuste específico, o para cambiar el pH durante una modificación de pH. Los agentes reguladores de pH típicos utilizados para los propósitos del cultivo celular incluyen bases líquidas o soluciones ácidas tales como NaOH o HCl. Estos agentes reguladores de pH se agregan a los medios en el recipiente/biorreactor de cultivo. Alternativamente, el medio de cultivo celular puede ser gasificado con CO₂, para ajustar el pH.
- De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se divulga un proceso para la preparación de un polipéptido recombinante que comprende el cultivo de células CHO, y la expresión del polipéptido recombinante, en donde la temperatura y el pH se cambian durante el proceso. Más particularmente, un cambio de una primera temperatura más elevada a una segunda temperatura más baja ocurre después de que las células se hacen crecer primero y son mantenidas durante al menos tres días, alternativamente al menos 4 días, o al menos 5 días a una primera temperatura. Esta segunda temperatura más baja es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8°C meno que la primera temperatura. En otra realización de la invención, el cambio de temperatura puede ser entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5°C, en algunas aplicaciones es de aproximadamente 4°C o aproximadamente 3.5°C. Esta segunda temperatura entonces es mantenida durante al menos dos días. Además del cambio en la temperatura, también se cambia el pH de un primer a un segundo pH.
- Los parámetros exactos con relación al cambio en la temperatura y el pH se determinan de antemano y se adaptan basándose en las necesidades de la línea celular que ha sido transfectada con una o más construcciones génicas particulares, que codifican el polipéptido respectivo que es producido. Alternativamente, las necesidades se pueden satisfacer dependiendo de los parámetros metabólicos que son determinados durante el cultivo para la producción a gran escala en un biorreactor.
- Un cambio de temperatura de una temperatura más elevada a una temperatura más baja, es útil debido a que la primera temperatura es óptima para el crecimiento celular, en tanto que la temperatura más baja reduce el índice de muerte celular. Una reducción de temperatura, por lo tanto, permitirá un mantenimiento más prolongado de una alta densidad de células viables. La productividad específica de células del polipéptido de interés con respecto a esta reducción de temperatura, generalmente no se reduce drásticamente con respecto a la temperatura inicial, algunas veces la productividad específica de células, puede ser la misma o algunas veces incluso superior. Un mantenimiento más prolongado de la alta densidad de células viables puede además proporcionar la ventaja de minimizar la formación de un producto con calidad inadecuada. La combinación de estos factores permite una alta productividad volumétrica y el logro de títulos altos del producto de interés de calidad adecuada al momento de la cosecha. En una realización, la primera

temperatura se encuentra en el rango de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 38°C. En otro ejemplo, la primera temperatura se encuentra entre aproximadamente 36°C a aproximadamente 38°C. La segunda temperatura alcanzada después del cambio de temperatura, puede estar en el rango de entre aproximadamente 30 a aproximadamente 37°C, o entre aproximadamente 32 a aproximadamente 34°C, o alternativamente entre aproximadamente 30 a aproximadamente 32°C.

El tiempo del cambio de temperatura es importante para maximizar la productividad. Si el cambio de temperatura se lleva a cabo demasiado temprano, no se alcanzará una alta densidad de células, o tomará más tiempo en alcanzarse. Si el cambio de temperatura se realiza demasiado tarde, no se podrá prevenir de manera efectiva una declinación en la densidad de células viables. De preferencia, el tiempo del cambio de temperatura se define en días después de la inoculación del biorreactor utilizado para la producción a gran escala de los polipéptidos recombinantes. En otra realización de la invención, el tiempo puede definirse por la densidad celular, la cual es alcanzada en el biorreactor de producción a gran escala. Por ejemplo, el cambio de temperatura se inicia durante la fase de crecimiento lineal o logarítmica de las células, o cuando se alcanza del 40 al 90% de la densidad celular máxima. Una densidad celular dependiente del punto de ajuste, se puede expresar en términos relativos (% de densidad celular máxima que puede ser alcanzada) o en términos absolutos (células viables/mL). En un ejemplo específico, la densidad celular se selecciona para que sea de entre 60 a 90%.

El tiempo entre la inoculación del biorreactor/recipiente de crecimiento y el cambio de temperatura puede estar en el rango de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 14 días, dependiendo del biorreactor/recipiente de crecimiento específico y la línea celular utilizada. Alternativamente, el cambio se presenta entre los días 3 a 8. Como alternativa a un criterio único como se señaló anteriormente, también se puede ajustar un criterio dual, combinando dos de las variables antes mencionadas, de tal forma que las condiciones seleccionadas concernientes al tiempo y/o densidad celular deban cumplirse.

Si es necesario para el crecimiento y producción óptimos, también se puede utilizar más de una modificación de temperatura, por ejemplo al menos 2 modificaciones, cada uno consistiendo de un cambio de temperatura de al menos aproximadamente 1°C, alternativamente al menos aproximadamente 2°C, en donde cada temperatura es mantenida durante al menos un día. Así, las temperaturas pueden incluso ser reducidas adicionalmente y se puede seguir un perfil de temperatura más complejo.

De acuerdo con la invención, las células se hacen crecer a un primer valor de pH, antes del cambio de pH durante al menos 2 días, alternativamente durante al menos 3 días, por ejemplo durante al menos 4 días o incluso durante al menos 5 días. El pH para los primeros días después de iniciar el cultivo, se selecciona para que sea favorable para la expansión rápida de la densidad celular en el biorreactor. Durante este tiempo, el pH del biorreactor es controlado a un cierto punto de ajuste que sea óptimo para el crecimiento celular. Una vez que se ha alcanzado cierta densidad celular, es ventajoso modificar el pH del cultivo. El pH es cambiado después de este primer periodo de tiempo a un segundo valor de pH, el cual se es entre aproximadamente 0.05-1 unidades de pH más bajo que el primer pH. Las células se hacen crecer a dicho segundo pH durante al menos 2 días. En algunas realizaciones de la presente invención, el segundo valor de pH puede ser de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 1 unidad de pH más bajo que el primer pH. Este cambio en el pH generalmente se logra cambiando el punto de ajuste del pH del biorreactor/recipiente de cultivo. Se selecciona el segundo valor de pH para reducir la muerte celular (apoptosis) y permitir mantener índices de producción celular altamente específicos de polipéptidos con una calidad adecuada. Como consecuencia, en una primera realización, el tiempo del cambio del pH se define en días después de la inoculación del biorreactor que se utiliza para la producción a gran escala del polipéptido recombinante. En una segunda realización, el tiempo se puede definir mediante la densidad celular que se alcanza en el biorreactor a gran escala. De acuerdo con una alternativa adicional, el tiempo también puede depender de los parámetros metabólicos específicos que son medidos durante el cultivo en el medio de cultivo celular. En un ejemplo no limitante, el tiempo puede depender de la concentración de lactato. También, se pueden utilizar parámetros no directos que reflejen el estado metabólico del cultivo, tal como por ejemplo la dosificación de CO₂ requerida o el control de ácido por tiempo, para mantener el pH al punto de ajuste del pH más elevado, o la dosificación requerida de NaOH, o controlando el agente cáustico para mantener el pH a un punto de ajuste de pH más bajo. En vez de utilizar sólo un criterio para el cambio de pH, alternativamente, se puede establecer un criterio combinado, al combinar parámetros tales como por ejemplo días después de la inoculación y la densidad celular.

Los beneficios de la estrategia del cambio de pH también involucran el hecho de que las concentraciones de bióxido de carbono disuelto y la adición de una base, se puede reducir durante el transcurso del cultivo, lo cual, por consiguiente, evita sus efectos negativos. Al inicio del cultivo, es ventajoso tener un valor de pH más elevado (por ejemplo de 7.0) en el recipiente o biorreactor de cultivo, ya que un valor de pH más bajo (por ejemplo de 6.8), requeriría de concentraciones más elevadas de bióxido de carbono, con el fin de mantener el pH. Estas altas concentraciones de bióxido de carbono, sin embargo, pueden causar efectos negativos sobre las células, y reducir la tasa de crecimiento. En contraste, en las últimas etapas del cultivo, mantener un pH elevado (por ejemplo de 7.0), requiere más adición de base, que mantener un pH bajo (por ejemplo de 6.8). Esto se debe a que se forma ácido láctico y la acidez resultante debe ser compensada mediante la adición de una base. Mientras más alto el punto de ajuste del pH, mayor será la cantidad de base requerida. La adición de una base incrementa la osmolaridad del cultivo, lo cual puede ser desfavorable para el crecimiento y mantenimiento de una alta densidad de células viables.

Los beneficios potenciales de la estrategia del cambio de pH, también pueden ser descritos a partir de la perspectiva de minimizar la formación de ácido láctico. Las células CHO generalmente producen menos ácido láctico a valores de pH más bajos (por ejemplo de 6.8) que a valores más elevados (por ejemplo de 7.0). Menos producción de ácido láctico da como resultado el agregar menos base, lo cual es benéfico tal como se describió anteriormente.

En una realización, el primer pH se selecciona para que se encuentre en el rango de entre pH 6.8 y 7.5. En otra realización, el primer pH se selecciona para que se encuentre en el rango de entre pH 6.8 y 7.2. En una realización adicional, se selecciona el primer pH para que sea como máximo pH 7, o alternativamente por debajo de pH 7. El segundo valor de pH que se alcanza después del cambio de pH, se encuentra en el rango de entre pH 6.0 y pH 7.5, o entre pH 6.5 y 6.8.

El tiempo relativo de temperatura y cambio de pH se selecciona con el fin de alcanzar el resultado más óptimo. El tiempo óptimo de la temperatura y el cambio de pH se seleccionan sobre una base específica del proceso y puede depender del estado de crecimiento o estado metabólico del cultivo. El cambio de temperatura en principio puede ser implementado en un momento del cultivo, independiente del momento de cambiar el pH. En una realización de la invención, el cambio de temperatura puede ocurrir antes o al mismo tiempo que el cambio de pH. En una realización de la invención, el cambio de temperatura ocurre antes del cambio de pH. Por ejemplo, el cambio de temperatura se puede iniciar entre 1 a 5 días antes que ocurra el cambio en el pH. En otra segunda realización de la invención, el cambio de temperatura se inicia al mismo tiempo que el cambio de pH. El término "al mismo tiempo", en la presente se refiere a un cambio simultáneo de ambos parámetros respectivos de un primer valor a un segundo valor. Tales cambios simultáneos pueden presentarse cuando el punto de ajuste de la temperatura y el punto de ajuste del pH han sido cambiados, y ambos parámetros no hayan alcanzado aún su segundo valor estable. Alternativamente, tal escenario puede ocurrir cuando el punto de ajuste en la temperatura se cambia durante la fase de un cambio de pH pasivo. Esto ocurre en el caso de una regulación del pH mediante un punto de ajuste y una banda inactiva que definan un límite de pH más elevado y más bajo (también véase más adelante). En una realización adicional de la presente invención, el cambio de temperatura puede ocurrir después del cambio de pH. Por ejemplo, el cambio de temperatura se puede iniciar entre 1 a 5 días después del cambio de pH.

En un aspecto adicional de la presente invención, el pH es cambiado activa o pasivamente entre dicho primer a dicho segundo valor de pH. Existe un número de posibles formas para controlar el pH de los cultivos y para implementar un cambio de pH. En un aspecto de la invención, el pH se modifica activamente de un primer a un segundo valor de pH, cambiando el punto de ajuste del pH (sin una banda inactiva) del controlador de pH a un nuevo valor.

Como resultado, el cambio del primer valor de pH al segundo valor de pH es casi inmediato (cambio en un paso) en el cultivo. La Fig. 1 ilustra tal implementación de modificación en un paso del cambio de pH, con un cambio de pH de 7.00 a 6.80, en este ejemplo particular. En esta implementación de la invención, el pH es mantenido primero a un valor de pH más elevado, dosificando agentes reguladores del pH de acuerdo con ello (por ejemplo CO₂ o NaOH), y posteriormente se cambia a un valor más bajo, cambiando activamente el punto de ajuste (sin una banda inactiva). El pH del punto de ajuste más bajo se puede alcanzar ya sea dosificando/añadiendo activamente un agente acidificante al cultivo, dando como resultado un cambio rápido, u omitiendo un agente que mantenga el pH en el valor del primer pH más básico. Basándose en el tamaño del biorreactor y el método anteriormente mencionado de influenciar el pH, el cambio de pH se puede concluir desde en algunos minutos hasta en 24 horas.

En un aspecto adicional de la invención, el pH se deja modificar pasivamente (variación) de un primer a un segundo valor de pH que corresponde a un límite de pH superior y un límite de pH inferior y así seguir un perfil metabólico específico de cultivo celular. Como resultado, el cambio del primer valor de pH al segundo valor de pH es gradual. Esta forma alternativa de controlar el pH del medio de cultivo celular y la implementación de un cambio de pH, se logra programando el controlador de pH del biorreactor con un punto de ajuste y una banda inactiva. Esto define un rango de pH permisible para el proceso, en donde el controlador de pH no participa. Por ejemplo, un punto de ajuste de pH de 6.90 con una banda inactiva con unidades de pH de 0.10, definirá el pH de 7.00 como el límite de pH más elevado, y el pH de 6.80 como el límite de pH inferior. En un biorreactor de producción de cultivo celular, el pH típicamente estará en el límite alto al inicio del cultivo (primeros días), en donde el controlador previene un aumento del pH que surge de la dosificación de bióxido de carbono al cultivo. Debido a la acumulación progresiva de ácido láctico producido por las células, el pH eventualmente disminuirá continuamente de por ejemplo 7.00 a 6.80, típicamente en unas pocas horas. Una vez que se alcanza el límite de pH inferior de por ejemplo 6.80, el controlador previene la disminución del pH más allá de ese valor, dosificando una solución básica al cultivo. Basándose en el tamaño del biorreactor, la línea de células específica, la densidad celular o las condiciones de los medios, puede ocurrir el cambio gradual del pH en unas pocas horas o llevarse hasta un día.

En un aspecto adicional de la invención, el segundo pH del cultivo es mantenido activamente después del cambio de pH al segundo pH, durante el tiempo de cultivo restante hasta la cosecha. Esto se logra cambiando el punto de ajuste del pH a dicho segundo valor de pH, y dosificando los agentes reguladores de pH de acuerdo con ello.

En un aspecto adicional de la invención, el primer cambio de pH es seguido por un segundo cambio. El segundo cambio de pH ocurre al menos 1 día después de que el primer y tercer valor de pH que se alcanza es al menos 0.05 unidades de pH mayor que el segundo pH.

5 En un aspecto adicional de la invención, el segundo cambio de pH también puede ocurrir de manera activa o pasiva, para alcanzar dicho tercer valor de pH. En la primera realización, esto se puede realizar cambiando de manera activa el punto de ajuste de pH, como ya se señaló para el primer cambio de pH (véase lo anterior). El momento del segundo cambio de pH se puede definir en días después del primer cambio de pH y/o de nuevo hacerlo dependiendo de los parámetros metabólicos, tal como por ejemplo la concentración de lactato. Tal cambio típicamente puede ocurrir entre 1 y 10 días después del primer cambio en el pH. Un cambio activo es iniciado cambiando el punto de ajuste del pH del cultivo. Los agentes reguladores de pH serán dosificados de acuerdo con ello.

15 En la segunda realización, el pH también se puede dejar que cambie de forma pasiva y seguir su perfil de pH metabólico. Esto puede ser implementado, por ejemplo, definiendo un límite de pH inferior y un límite de pH superior, como ya se señaló anteriormente. El límite de pH superior, en este caso, puede corresponder al mismo límite de pH superior definido para el primer cambio de pH, o puede ser alterado a un nuevo valor más bajo o más alto. De preferencia, tal límite de pH más bajo y más alto puede lograrse programando el controlador de pH del biorreactor con un punto de ajuste y una banda inactiva. Tal cambio pasivo en el pH puede ocurrir por remetalización de ácido láctico de manera tardía en el cultivo por las células, lo cual causa que el pH se incremente de nuevo a los valores anteriormente mencionados de dicho límite más bajo del rango de pH. En algunos ejemplos, es posible que el pH alcance de nuevo el límite superior del rango, en otros casos también puede permanecer por debajo de ese límite. La magnitud del segundo cambio de pH puede incluir valores entre 0.05 y 1 unidades de pH. La duración de tal cambio de pH pasivo no se define con exactitud, ya que la tasa de modificación/cambio, depende de la actividad metabólica y la remetalización del ácido láctico por las células. Típicamente, se puede llevar de medio hasta 2 días para alcanzar el límite de pH superior, pero en el caso de un cambio pasivo, el pH también puede permanecer por debajo del umbral superior definido hasta el final del cultivo.

20 La elección de la estrategia a implementar, dependerá de diversos factores, tales como la sensibilidad de las células al CO₂ y el pH óptimo para la formación del producto. Se pueden obtener perfiles de pH diferentes, definiendo dos o más puntos de ajuste específicos durante el transcurso del cultivo, o simplemente definiendo un punto de ajuste y una banda inactiva (lo cual opcionalmente también podría ser cambiado durante el cultivo). Diferentes perfiles de pH que se pueden obtener ajustando un punto de ajuste y una banda inactiva, se ilustran en la Fig. 2, para un punto de ajuste de pH de 6.90 con una banda inactiva de 0.10 como valores de ejemplo.

30 En un aspecto adicional de la invención, la cantidad total del polipéptido producido por un proceso que comprende una temperatura y uno o más cambios de pH, es mayor que sin la combinación de una modificación de temperatura con uno o más cambios de pH. El combinar al menos una modificación de temperatura con al menos una modificación de pH, que se adapten en términos de tiempo y tamaño a las necesidades de la línea de células transfectadas particular, ha dado como resultado un rendimiento mucho mejor del producto.

40 En todavía un aspecto adicional de la invención, un proceso que comprende una temperatura y uno o más cambios de pH, tiene el potencial de dar como resultado un producto de calidad mejorada en comparación con la calidad obtenida, sin combinar el cambio de temperatura con una o más modificaciones en el pH. Una posible razón para el efecto benéfico de una modificación de pH a valores de pH más bajos en el cultivo durante la fase de producción puede ser la siguiente: que el amoníaco típicamente se acumule en el medio de cultivo celular en el transcurso del tiempo de cultivo y se sepa que potencialmente afecta la glucosilación del producto, con el posible resultado de una disminución en la calidad del producto. Se supone que el amoníaco entra a las células en forma de NH₃, en donde éste puede influenciar el pH intracelular capturando iones H₃O⁺. El incremento resultante en el pH intracelular puede afectar la glucosilación. Modificar el pH de un cultivo a un valor más bajo, disminuirá la concentración de NH₃ extracelular a través de un incremento en la protonación de NH₃ a NH₄⁺, al cual las células son impermeables.

55 El proceso de cultivo celular que comprende una temperatura y uno o más cambios de pH de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo utilizando varios medios de cultivo celular. Los medios de cultivo celular comúnmente utilizados que se pueden emplear son, por ejemplo, D-MEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco), D-MEM/F-12, Mem α , Medio de Fischer, RPMI 1640BME, BGJb, pero no se limitan a estos ejemplos. Estos medios además pueden ser suplementados con componentes adicionales tales como por ejemplo nutrientes, vitaminas o carbohidratos.

Los medios adecuados que principalmente son optimizados para el crecimiento celular, de preferencia contienen concentraciones iniciales de aminoácidos, de acuerdo con los siguientes rangos.

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	4.0 - 6.0, preferiblemente 4.5 - 5.5
Monohidrato de asparagina	3.0 - 6.0, preferiblemente 4.0 - 5.5
Ácido aspártico	2.5 - 4.0, preferiblemente 3.0 - 3.6
Glicina	0.3 - 0.8, preferiblemente 0.5 - 0.7
Histidina, HCl H ₂ O	0.6 - 1.0, preferiblemente 0.7 - 0.9
Isoleucina	2.0 - 5.0, preferiblemente 3.0 - 4.0
Leucina	3.0 - 7.0, preferiblemente 3.5 - 6.0
HCl de lisina	2.0 - 4.0, preferiblemente 2.5 - 3.5
Metionina	1.0 - 1.5, preferiblemente 1.2 - 1.4
Fenilalanina	1.0 - 2.0, preferiblemente 1.3 - 1.8
Prolina	2.5 - 6.0, preferiblemente 3.0 - 5.5
Serina	3.0 - 8.0, preferiblemente 4.0 - 7.0
Treonina	2.0 - 3.5, preferiblemente 2.5 - 3.1
Triptófano	0.4 - 1.0, preferiblemente 0.5 - 0.8
Valina	2.5 - 5.0, preferiblemente 3.0 - 4.5
Tirosina	1.0 - 2.0, preferiblemente 1.2 - 1.8
Cistina	0.5 - 1.0, preferiblemente 0.6 - 0.8
Glutamina	5.5 - 9.5, preferiblemente 6.2 - 8.2

Los medios que contienen aminoácidos como los definidos en la tabla anterior, pueden utilizarse de manera favorable en los procesos mejorados de cultivo celular, de acuerdo con la presente invención.

- 5 Un aspecto adicional de la invención incluye el uso de medios de producción diseñados para la producción a gran escala de polipéptidos recombinantes. Estos medios de producción opcionalmente pueden contener cantidades incrementadas de componentes, por ejemplo aminoácidos. En una realización preferida de la invención, se utiliza un contenido de aminoácidos inicial en estos medios en un rango de entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 100 mM, alternativamente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mmol/L. En una realización alternativa de la invención, tales medios de producción
- 10 contienen concentraciones iniciales de aminoácidos de acuerdo con los siguientes rangos.

Aminoácidos	Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	4.0 - 6.0, preferiblemente 4.5 - 5.5
Monohidrato de asparagina	9.0 - 11.0, preferiblemente 9.5 - 10.5
Ácido aspártico	2.5 - 4.0, preferiblemente 3.0 - 3.6
Glicina	0.3 - 0.8, preferiblemente 0.5 - 0.7
Histidina, HCl H ₂ O	1.0 - 1.5, preferiblemente 1.1 - 1.3
Isoleucina	5.5 - 7.0, preferiblemente 6.0 - 6.8
Leucina	8.0 - 10.0, preferiblemente 9 - 9.2
HCl de lisina	3.0 - 6.0, preferiblemente 4.0 - 5.0
Metionina	1.5 - 2.5, preferiblemente 1.5 - 2.0

Fenilalanina	2.0 - 3.5, preferiblemente 2.5 - 3.0
Prolina	7.5 - 9.0, preferiblemente 8.0 - 8.5
Serina	10.5 - 13.0, preferiblemente 11.0 - 11.9
Treonina	3.5 - 5.5, preferiblemente 4.0 - 5.0
Triptófano	0.9 - 2.0 preferiblemente 1.0 - 1.4
Valina	5.5 - 7.5, preferiblemente 6.0 - 6.8
Tirosina	1.0 - 3.0, preferiblemente 2.0 - 2.5
Cistina	0.5 - 2.0, preferiblemente 1.0 - 1.3
Glutamina	5.5 - 9.5, preferiblemente 6.2 - 8.2
Ácido glutámico	0.5 - 2.5, preferiblemente 1.0 - 1.2

Los medios de producción que contienen aminoácidos como los definidos en la tabla anterior, se pueden utilizar de manera favorable en los procesos mejorados de cultivo celular, de acuerdo con la presente invención.

- 5 El cultivo de células se puede llevar a cabo en un cultivo adherente, por ejemplo en un cultivo en monocapa o de preferencia en un cultivo en suspensión.

El cultivo de células a gran escala se puede utilizar, por ejemplo, por los diversos procesos de fermentación establecidos en la biotecnología industrial. Se pueden aplicar procesos de cultivo celular continuos y discontinuos, empleando los medios de cultivo celular de acuerdo con la presente invención. Otras tecnologías de reactor conocidas, por ejemplo las tecnologías de perfusión o similares, también se pueden utilizar. Los procesos por lotes son una realización preferida.

- 10

El cultivo celular por lotes incluye el cultivo por lotes con alimentación, o el cultivo por lotes individuales. Cultivo celular por lotes con alimentación se refiere al cultivo celular en el que las células de mamífero y el medio de cultivo celular son suplementados al recipiente de cultivo inicialmente, y se alimentan nutrientes adicionales de manera continua o en incrementos discretos, al medio de cultivo durante el proceso de cultivo, con o sin la cosecha periódica de células y/o producto antes de terminar el cultivo. El término "cultivo por lotes individuales", se refiere a un procedimiento en el cual todos los componentes del cultivo celular, incluyendo las células de mamífero y el medio de cultivo celular, son suministrados al recipiente de cultivo al inicio del proceso de cultivo.

- 15

- 20 En un aspecto adicional de la invención la alimentación de los cultivos se realiza en un proceso por lotes con alimentación, cuya alimentación consiste de dos soluciones de nutrientes que se agregan al cultivo. Ambas soluciones nutrientes son agregadas al recipiente de cultivo ya sea basándose en un programa predeterminado para la línea de células en particular y el producto, o de acuerdo con las necesidades metabólicas que son determinadas midiendo el consumo de por ejemplo glucosa o aminoácidos en el recipiente de cultivo. Ambas soluciones nutrientes se pueden agregar de manera independiente ya sea como una alimentación en bolo o de manera continua. Típicamente las soluciones de alimentación nutrientes comprenden aminoácidos, al menos un carbohidrato como fuente de energía, elementos traza, vitaminas o iones específicos. Es particularmente ventajoso utilizar soluciones de alimentación concentradas, con el fin de evitar un gran incremento en el volumen y la dilución del producto. En algunas realizaciones, también puede ser útil tener al menos dos diferentes soluciones de alimentación. Esto permite la dosificación independiente de dos o más diferentes grupos de nutrientes y componentes para las células, y así obtener un mejor ajuste de las condiciones de alimentación relacionadas con el suministro óptimo de ciertos nutrientes.

- 25

- 30

En otra realización de la presente invención, una de las dos soluciones de alimentación agregadas al medio de cultivo celular, es una alimentación concentrada que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina a concentraciones respectivas en el rango de aproximadamente 6.5 g/L y aproximadamente 8.0 g/L, y en el rango de aproximadamente 9 g/L y aproximadamente 11 g/L, en una solución acuosa a pH alcalino mayor de 10. En una realización particular, la solución de alimentación concentrada comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina, a concentraciones respectivas de 10.06 g/L de L-tirosina y 7.25 g/L de cistina, a un pH mayor de 10.

- 35

- 40 El medio de alimentación que comprende cistina y tirosina como el anteriormente descrito, puede ser agregado ya sea basándose en el consumo medido de los respectivos aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.8% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo, por día, o a aproximadamente 0.4% en peso con respecto al peso inicial del medio

de cultivo celular, por día.

En algunos ejemplos, la otra solución de alimentación contiene todos los demás aminoácidos que también están presentes en el medio básico, excepto tirosina y cistina. En algunos ejemplos, esta solución de alimentación adicional puede consistir de componentes selectos particulares, tales como aminoácidos o carbohidratos. En una realización adicional de la presente invención, este medio de alimentación concentrado de preferencia contiene aminoácidos selectos de acuerdo con los siguientes rangos de concentración.

5

Aminoácidos	Medio de Alimentación Conc. (mmol/L)
Arginina, base libre	12.0 - 17, preferiblemente 13.5 - 16.0
Histidina, HCl H ₂ O	5.5 - 7.5, preferiblemente 5.9 - 7.0
Isoleucina	21 - 28.0, preferiblemente 22.0 - 27
Leucina	32 - 42, preferiblemente 34.5 - 40.0
HCl de lisina	17.0 - 22.0, preferiblemente 17.5 - 21.5
Metionina	5.5 - 8.0, preferiblemente 6.0 - 7.5
Fenilalanina	8.5 - 12.0, preferiblemente 9.0 - 10.5
Prolina	18.0 - 24, preferiblemente 18.5 - 22.0
Serina	39.0 - 49.0, preferiblemente 39.5 - 46.5
Treonina	14.5 - 19.0, preferiblemente 15.0 - 18.5
Triptofano	3.0 - 5.0, preferiblemente 3.5 - 4.9
Valina	23.0 - 29.0, preferiblemente 23.8 - 27.5
Glutamina	175.0 - 220.0, preferiblemente 176.0 - 201

10

Preferiblemente, también se agregan carbohidratos tales como glucosa a este medio de alimentación concentrado, estando las concentraciones preferidas entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 1400 mmol/L, o alternativamente entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 1395 mmol/L.

15

El medio de alimentación tal como se acaba de describir, que preferiblemente incluye un carbohidrato tal como glucosa, se puede agregar ya sea con base en el consumo medido de los respectivos aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 4% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo celular, por día, por ejemplo a aproximadamente 2% en peso con respecto al peso inicial del medio de cultivo celular, por día.

20

Los polipéptidos que se pueden producir a partir de los cultivos celulares y medios de cultivo celular de acuerdo con la presente invención no están limitados. Los polipéptidos pueden ser recombinantes o no recombinantes. El polipéptido puede ser homólogo a la célula huésped, o preferiblemente, puede ser de origen exógeno. El término "polipéptido" tal como se utiliza en la presente, abarca moléculas comprendidas de una cadena de más de dos aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos; moléculas que contienen dos o más de tales cadenas; moléculas que comprenden una o más de tales cadenas, siendo adicionalmente modificadas, por ejemplo, por glucosilación. El término polipéptido se pretende que abarque proteínas. Los

polipéptidos de interés pueden ser de cualquier origen. Los polipéptidos preferidos de interés son de origen humano, y más preferiblemente, las proteínas de interés son proteínas terapéuticas.

La clase preferida de polipéptidos producidos por los cultivos celulares y los medios de cultivo celular de acuerdo con la presente invención, son anticuerpos recombinantes.

- 5 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), nanocuerpos, anticuerpos modificados, subunidades de anticuerpos, derivados de anticuerpos, anticuerpos artificiales, combinaciones de anticuerpos con proteínas y fragmentos de anticuerpo suficientemente grandes como para desplegar la actividad biológica deseada. Los anticuerpos monoclonales tal como se utilizan en la presente, pueden ser anticuerpos humanos.

- 10 Sin embargo, también se pueden producir polipéptidos diferentes de anticuerpos, utilizando los cultivos celulares y medios de cultivo celular de acuerdo con la presente invención; por ejemplo, polipéptidos tales como proteínas transmembranales, receptores, hormonas, factores de crecimiento, proteasas, proteínas de coagulación y anticoagulantes, proteínas inhibidoras, interleucinas, factores de transporte, proteínas de fusión y similares.

- 15 Los productos obtenidos a partir de tales procesos de cultivo celular, se pueden emplear para la preparación de preparaciones farmacéuticas. Además, la o las proteínas de acuerdo con la presente invención, se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensoactivos, receptores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 Ejemplos

En los Ejemplos que se describen a continuación, se utilizan los medios de cultivo celular químicamente definidos 1 y 2, que tienen la composición como se detalla en la siguiente Tabla 1. Los componentes individuales de estos medios de cultivo celular están disponibles en fuentes comerciales normales.

Tabla 1

Componentes	Medio 1 Con. final (mg/L)	Medio 2 Con. final (mg/L)
CaCl ₂ , anhidro	131	133.2
KCl, anhidro	800	800
MgCl ₂ , anhidro	155	250.4
NaCl	850.6	500
Fosfato ácido disódico, anhidro	710	1065
Carbonato ácido de sodio anhidro	2500	2000
L-arginina, base libre	871	871
L-asparagina • H ₂ O	616	1501
Ácido L-aspártico	461	461
L-cistina	200.1	304.5
Sal Na de ácido L-glutámico, hidratada	-	182
Ácido L-glutámico	-	-
L-histidina, HCl•H ₂ O	168	268
L-isoleucina	394	894
L-leucina	499	1199
L-lisina, HCl	621	821
L-metionina	179	279
L-fenilalanina	264	464
L-prolina	368	968
L-serina	432	1232
L-treonina	333	533

ES 2 659 117 T3

L-triptofano	102	252
L-valina	375	775
L-tirosina	277.7	422.5
Glicina	38	38
L-glutamina	1169.2	1169.2
Biotina	0.4	0.4
D-pantotenato de Ca	4	4
Ácido fólico	5	5
Mio-inositol	40	140
Nicotinamida	4	4
Piridoxina•HCl	2	2
Riboflavina	0.4	0.4
Vitamina B12	2	2
Tiamina•HCl	4	4
Putrescina, 2HCl	10	110
Cloruro de colina	40	240
Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₃)	0.03	0.03
Cloruro de manganeso tetrahidratado	0.3	0.3
Molibdato de amonio tetrahidratado	0.3	0.3
Cloruro de zinc anhidro	3	3
Cloruro cúprico dihidratado	0.3	0.3
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.3	0.3
Etanolamina	10	100
Monotioglicerol	2	-
HEPES, forma ácida	17870	4766
Citrato trisódico dihidratado	911.7	1235.2
FeCl ₃ •6H ₂ O	54.1	54.1
Pluronic F68	1000	1000
D-glucosa anhidra	10000	10000
HCl	-	327.6
NaOH	799.2	339.9

La Tabla 2 que se presenta a continuación, muestra la composición de un medio de alimentación concentrado, que contiene L-tirosina y cistina. El medio de alimentación se puede agregar ya sea basándose en el consumo medido de los respectivos aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo a razón de 0.4% en peso, por día.

Tabla 2

Componentes	Medio de alimentación (g/L)
NaOH 32%	18.7 mL
L-tirosina	10.06
Cistina	7.25

La Tabla 3 que se presenta a continuación, muestra la composición de un medio de alimentación concentrado de ejemplo. El medio de alimentación puede ser agregado ya sea basándose en el consumo medido de aminoácidos, o de acuerdo con un programa fijo, por ejemplo a razón de 2% en peso por día.

5

Tabla 3

Componentes	Medio de alimentación (g/L)
L-arginina, base libre	2.72
L-histidina, HCl-H ₂ O	1.44
L-isoleucina	3.44
L-leucina	5.20
L-lisina, HCl	3.72
L-metionina	1.08
L-fenilalanina	1.72
L-prolina	2.44
L-serina	4.76
L-treonina	2.08
L-triptofano	0.88
L-valina	3.16
L-glutamina	29.23
D-glucosa monohidratada	275.00
HCl al 25%	8.25 mL
NaOH al 32%	5.6 mL

10 Para los experimentos de los ejemplos, se utilizó una línea de células CHO progenitora derivada de la línea celular dhfr (+) CHO-K1, ATCC CCL-61 (Kao *et al.*, Genetics, 1967, 55, 513-524; Kao *et al.*, PNAS, 1968, 60, 1275-1281; Puck *et al.*, J. Exp. Med., 1958, 108, 945-959), mediante la adaptación a las condiciones de medio de cultivo libre de suero, libre de proteína. Tres alícuotas de esta línea celular progenitora fueron transfectadas para expresar tres diferentes anticuerpos monoclonales, el mAb1, mAb2 y mAb3 respectivamente.

Ejemplo 1

15 En el Ejemplo 1, dos cultivos en matraces en agitación que contenían el medio 1 fueron inoculados en paralelo con un clon de células CHO productora de mAb1. Los cultivos en matraces en agitación se incubaron en una incubadora de bióxido de carbono a 37°C. En el día 3, un matraz en agitación fue transferido a una incubadora de bióxido de carbono puesta a 33°C. Ambos matraces en agitación fueron alimentados de manera similar con dos soluciones de alimentación. La alimentación fue suplementada de acuerdo con un programa fijo, agregando 0.4% de la primera solución de alimentación (Tabla 2) y 2% de la segunda solución

de alimentación (Tabla 3) al día, iniciando en el día 5 y terminando hasta el final del cultivo.

5 El cambio de temperatura a 33°C, hace posible un mantenimiento más prolongado de la densidad de células viables y de la viabilidad del cultivo con el tiempo (Figs. 3 y 4), y también alcanzar un título de producto más alto (Fig. 5), en comparación con el cultivo que se mantuvo a 37°C durante todo el transcurso del experimento. Este ejemplo ilustra el beneficio de implementar un cambio de temperatura a 33°C durante un proceso de producción de cultivo celular, basándose en una línea celular CHO.

Ejemplo 2

10 En este ejemplo, un biorreactor de 300 L que contenía el medio 2, fue inoculado con un clon de células CHO productora de mAb2. En el día 5, la temperatura del biorreactor fue cambiada de 36.5°C a 33°C. El punto de pH establecido es 6.90 y la banda inactiva es 0.10. Como resultado, el cultivo inicia a pH 7.00, el pH disminuye a 6.80 entre el día 2 y el día 4, y después progresivamente regresa a 7.00, debido al consumo de ácido láctico por las células (Fig. 6). La modificación a pH 6.80 hace posible reducir la adición de una base, en comparación con un caso en el que se mantuviera un pH constante de 7.00. El regreso a pH 7.00 hace posible reducir la concentración de CO₂ en el medio, en comparación con un caso en el que el pH se dejara a 6.80 después de la primera modificación. En este proceso que combina modificaciones de temperatura y pH, se alcanza una alta densidad de células viables y se minimiza la disminución de la densidad de células viables con respecto al tiempo (Fig. 7), lo cual permite alcanzar en el día 14 un alto título (Fig. 8) del producto con una calidad adecuada. La alimentación se aplicó de manera similar que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

20 En este ejemplo, se llevaron a cabo tres procesos de cultivo de lotes con alimentación independientes en un biorreactor de vidrio, utilizando un clon de células CHO productora de mAb3 y el medio 2 (véase la Tabla 1). El programa de alimentación del Ejemplo 1 se aplicó de nuevo. Dos cultivos independientes incluyen una modificación de temperatura sin un cambio de pH adicional; es decir, el pH en ambos cultivos celulares es mantenido a un valor de pH de 7.0 durante todo el tiempo del cultivo. El tercer cultivo experimental difiere de los primeros dos experimentos por un cambio de pH adicional de pH 7.0 a pH 6.8, aplicado en el día 3 del cultivo. El cambio de temperatura llevado a cabo en los tres experimentos ocurrió a una densidad celular de 4-6 x 10⁶ células viables/mL, respectivamente. En la Fig. 9, la concentración de mAb3 obtenida como el producto de expresión de la clona de células CHO correspondiente, se ilustra como función de la integral de células viables (ICV), la cual es una integral de todas las células vivas calculada a partir de la concentración de células/mL de la DCV en un mililitro de cultivo celular. La inclinación y/x es la productividad específica de las células qp [pg/CV/h], que indica la cantidad de producto de mAB3 recombinante que una célula viva por sí sola puede producir en una hora. En consecuencia, la Fig. 9 ilustra un incremento de la productividad específica de células en un cultivo celular cuando se somete a un cambio adicional de pH. Debido al cambio adicional de pH, las células crecen más lentamente, pero muestran un incremento en la productividad.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la producción de un polipéptido recombinante que comprende el cultivo de células CHO en un medio que es libre de proteínas y de suero y caracterizado por un contenido total de aminoácidos de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 100 mM bajo condiciones que comprenden al menos un cambio de temperatura y al menos un cambio de pH y que expresa el polipéptido recombinante, en donde
 - las células se hacen crecer a una primera temperatura durante al menos 3 días, y la temperatura posteriormente se cambia a una segunda temperatura, la cual es entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8°C más baja que la primera temperatura, y las células son mantenidas en dicha segunda temperatura durante un periodo de al menos otros 2 días;
- 10 - las células se hacen crecer a un primer valor de pH durante al menos 2 días, y el pH posteriormente es cambiado a un segundo valor de pH, el cual es entre aproximadamente 0.05 y aproximadamente 1 unidades de pH más bajo que el primer pH, y las células se hacen crecer a dicho segundo pH durante al menos 1 día.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pH es cambiado de manera activa entre dicho primer y dicho segundo valor de pH.
- 15 3. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el pH es cambiado de manera pasiva entre dicho primer y dicho segundo valores de pH.
4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la primera temperatura se encuentra en el rango de entre aproximadamente 33°C y aproximadamente 38°C.
- 20 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la segunda temperatura se encuentra en el rango de entre aproximadamente 30°C y aproximadamente 37°C.
6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el primer valor de pH se encuentra en el rango de entre aproximadamente pH 6.8 y aproximadamente pH 7.5.
7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el segundo valor de pH se encuentra en el rango de entre aproximadamente pH 6.0 y aproximadamente pH 7.1.
- 25 8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicho segundo pH es mantenido de manera activa hasta el término del cultivo.
9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el primer cambio de pH es seguido por un segundo cambio de pH después de al menos 1 día siendo el tercer valor de pH de aproximadamente 0.05 unidades de pH a aproximadamente 1 unidad de pH más alto que el segundo valor de pH.
- 30 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el pH se cambia de manera activa desde dicho segundo a dicho tercer valor de pH.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el pH se cambia de manera pasiva desde dicho segundo a dicho tercer valor de pH.
- 35 12. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el cultivo se realiza en modo de lote alimentado que comprende la alimentación de al menos dos soluciones nutritivas que se añaden al cultivo.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12 en donde una de las soluciones de alimentación agregada al medio de cultivo es una alimentación que comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina.
- 40 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la alimentación comprende el dipéptido cistina y el aminoácido tirosina, a concentraciones respectivas en el rango de aproximadamente 6.5 g/L y aproximadamente 8.0 g/L, y en el rango de aproximadamente 9 g/L y aproximadamente 11 g/L, en una solución acuosa a un pH básico por arriba de 10.
- 45 15. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14 en donde la cantidad de la solución de alimentación que comprende cistina y tirosina, se agrega al medio de cultivo en el rango de aproximadamente 0.2 y aproximadamente 0.8% en peso del peso del medio de cultivo inicial por día.
16. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el polipéptido producido es glucosilado.
- 50 17. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Fig. 1

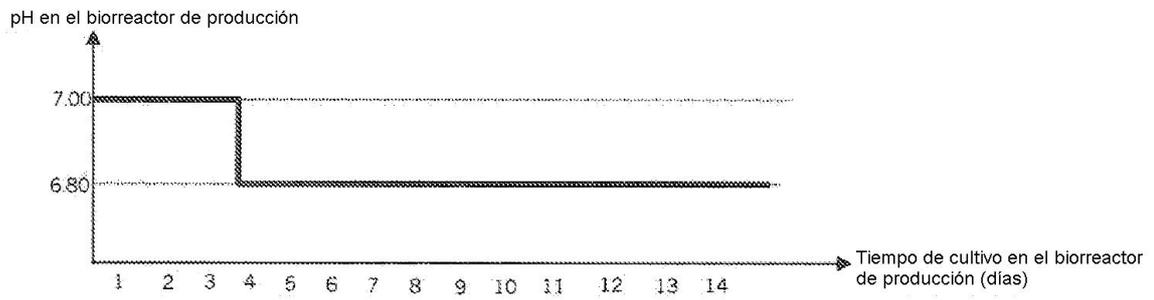


Fig. 2A

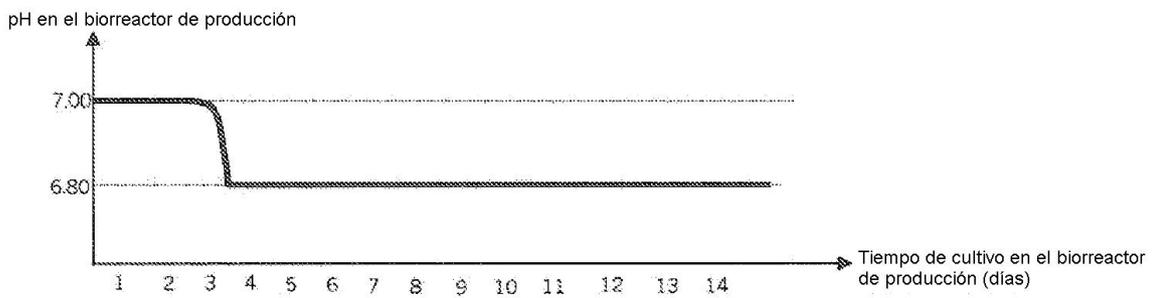


Fig. 2B

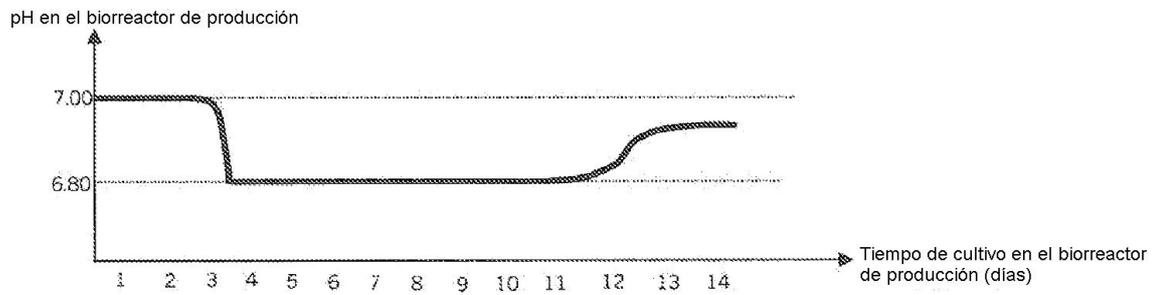


Fig. 2C

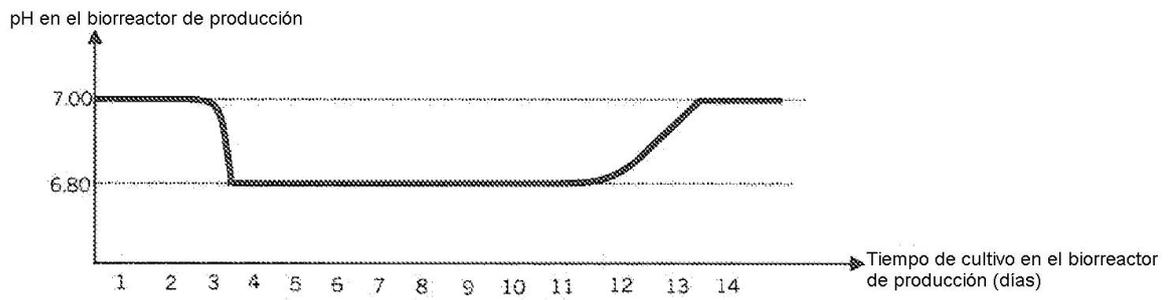


Fig. 3

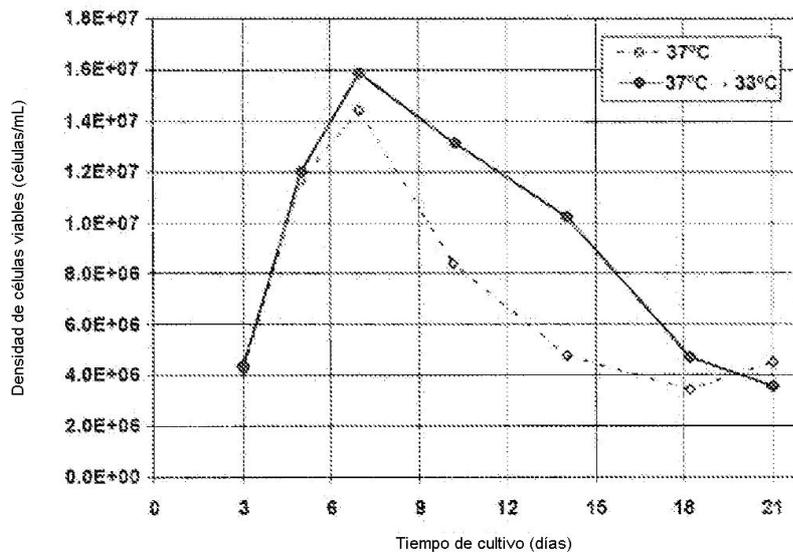


Fig. 4

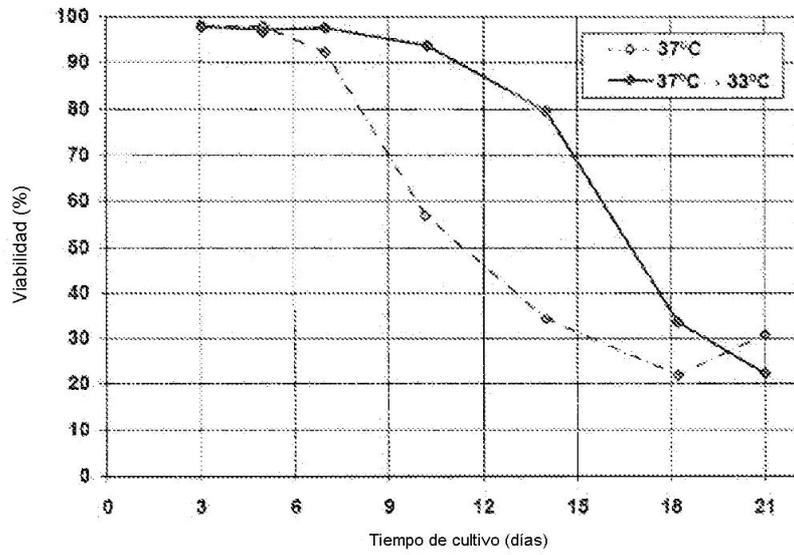


Fig. 5

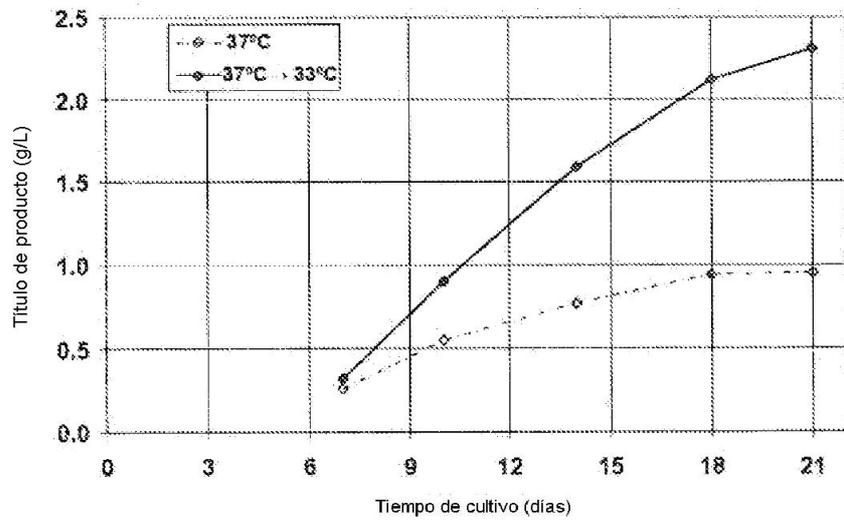


Fig. 6

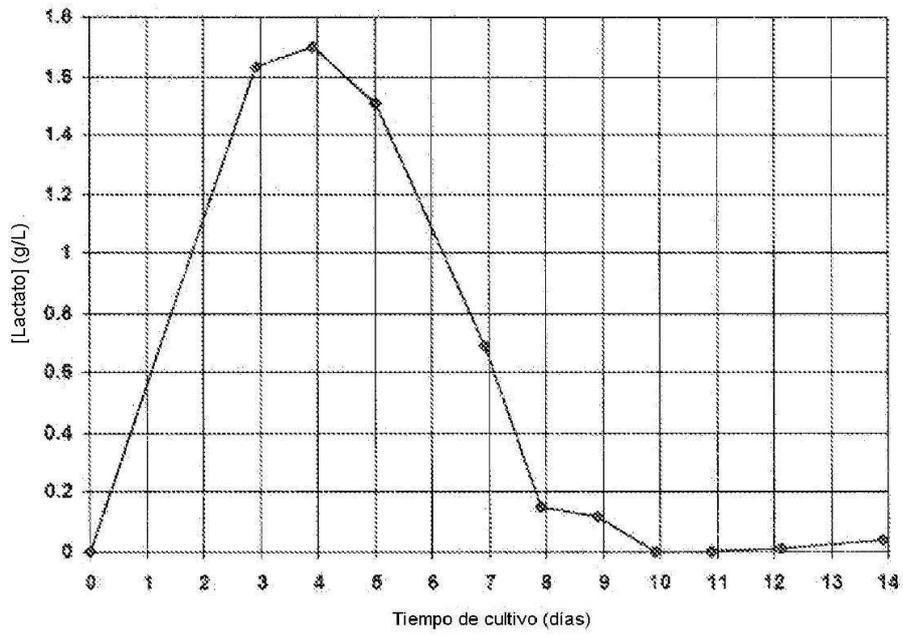


Fig. 7

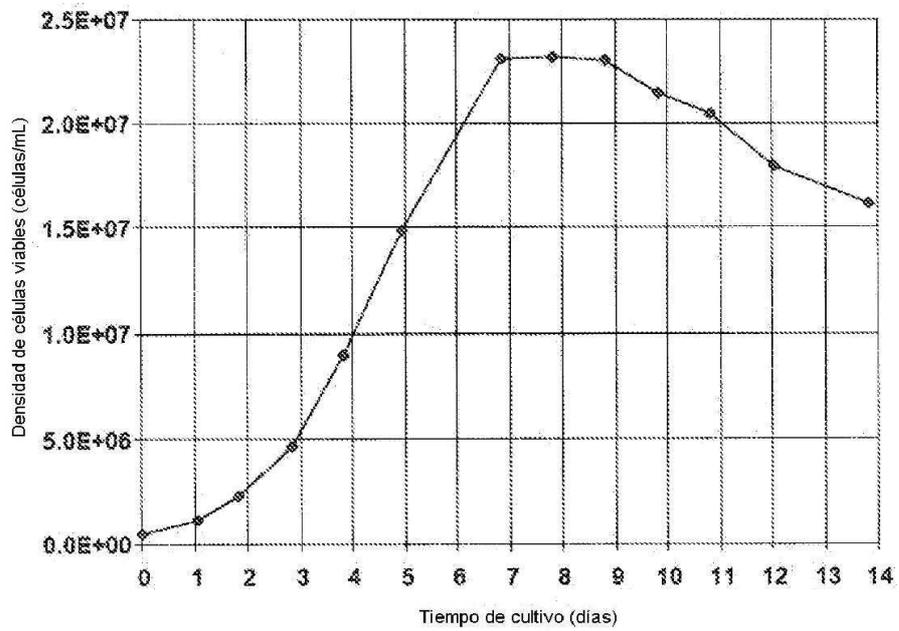


Fig. 8

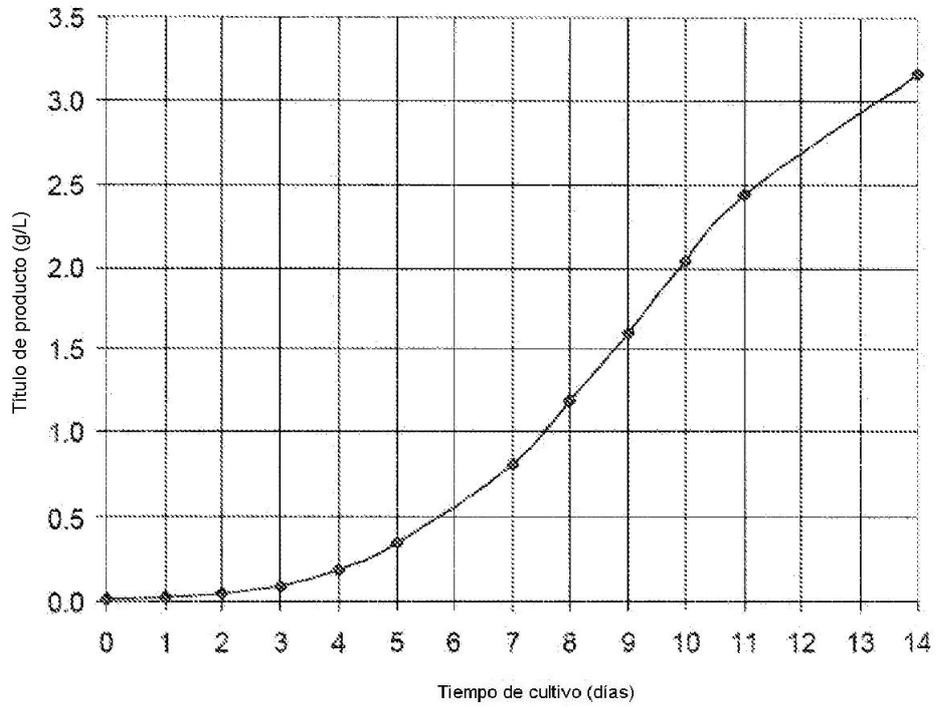
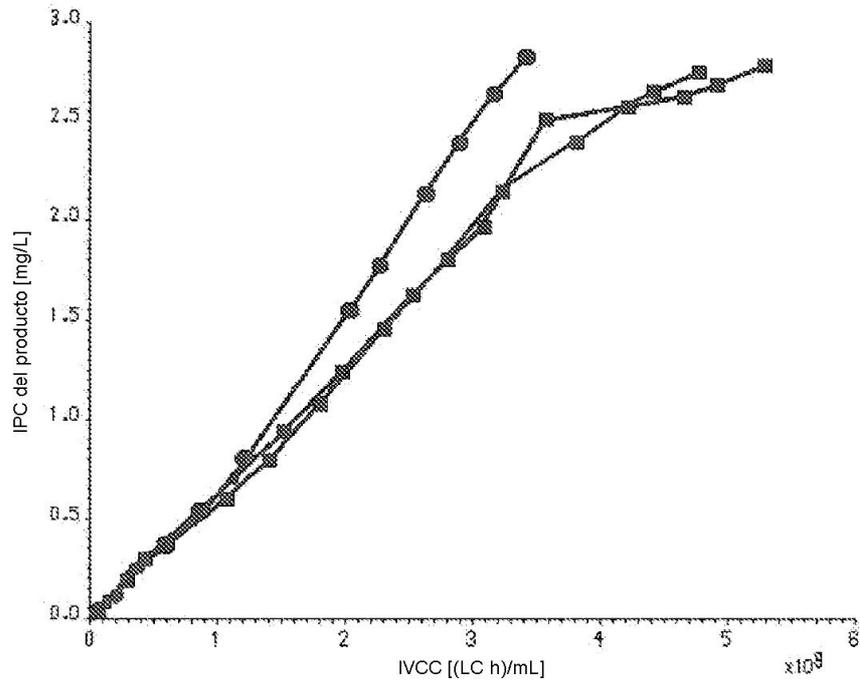


Fig. 9



- Experimento 1 (con cambio de pH)
- Experimento 2 (sin cambio de pH)
- Experimento 3 (sin cambio de pH)