

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 596**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/IB2014/059756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14141151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14715423 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2971036**

54 Título: **Uso de compuestos intermedios de ácido tricarboxílico (ATC) para controlar la generación de amoníaco en cultivo celular**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361787105 P**

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

**26.04.2018**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY  
(NO. 2) LIMITED (100.0%)  
980 Great West Road  
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**LARA-VELASCO, OSCAR y  
WAEHNER, CHRISTINA MICHELE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 665 596 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 compuestos intermedios de ácido tricarbóxico (ATC) para controlar la generación de amoníaco en cultivo celular

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de medios y procedimientos de cultivo celular para cultivar células de mamífero diseñadas para expresar proteínas terapéuticas.

### Antecedentes de la invención

- 10 El ciclo del ácido tricarbóxico (ATC) se considera que es la trayectoria esencial para generar energía para las células. Esta trayectoria es la ruta final común para obtener energía a partir de moléculas de combustible. Azúcares, aminoácidos y ácidos grasos se oxidan para obtener energía a partir de un ATP.

Al mismo tiempo, El ATC suministra a las células los elementos esenciales para producir otras moléculas en la célula. Los compuestos intermedios para los ácidos grasos, aminoácidos, purinas, pirimidinas entre otros pueden extraerse de varios puntos del ciclo de ATC durante el crecimiento y división celular y durante la síntesis de proteínas.

- 15 En casos en los que no hay suficientes compuestos intermedios para recargar el ciclo de ATC, las células pueden usar aminoácidos para recargar esos compuestos intermedios. La conversión de esos aminoácidos en compuestos intermedios requiere la deamidación como primera etapa, con los iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) siendo los subproductos de la conversión de aminoácidos en compuestos intermedios de ATC. Dependiendo de la demanda de compuestos intermedios por las células, los iones de amonio pueden acumularse en el medio de cultivo y causar efectos perjudiciales. Esos iones de amonio pueden afectar los patrones de glicosilación de los anticuerpos, la productividad celular y el crecimiento celular cuando se encuentran en concentraciones inhibitorias.

- 20 Para evitar niveles perjudiciales de concentraciones de iones de amonio, en la actualidad, el medio de cultivo celular acuoso con niveles inhibitorios de amoníaco simplemente se descarta y se reemplaza con medio nuevo. Esto resulta ineficiente ya que requiere equipo adicional para la esterilización y almacenamiento de medio nuevo así como el reemplazo consiguiente de suero costoso en el medio nuevo. Por lo tanto, lo que se necesita es un procedimiento para retirar amoníaco e iones de amonio de cultivos de células de mamífero que prescinda del medio de reemplazo y que pueda utilizarse con la amplia variedad conocida de líneas celulares existentes.

### Sumario de la invención

- 30 En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de reducción de la concentración de iones de amonio en un cultivo de células de mamífero, que comprende las etapas de:

- 35 cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición de compuesto intermedio de ácido tricarbóxico ("ATC") al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de mantenimiento o aumento de la productividad celular de células diseñadas para expresar proteínas terapéuticas en un cultivo de células de mamífero, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:

- 40 cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición al medio celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

- 45 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de mantenimiento o aumento del cultivo celular en un cultivo de células de mamífero, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:

- cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

- 50 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de reducción de la influencia de la concentración de iones de amonio en patrones de glicosilación de los anticuerpos en un cultivo celular, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:

cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

- 5 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un medio de cultivo celular que comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

### **Breve descripción de los dibujos**

- 10 La Figura 1 muestra el diseño experimentos para el estudio de respuesta a la dosis de los compuestos intermedios del ciclo de ATC.  
 La Figura 2 muestra el diseño experimento para el bloque n.º 1 del estudio de interacción de compuestos intermedios del ciclo de ATC.  
 La Figura 3 muestra el diseño experimental para el bloque n.º 2 del estudio de interacción de compuestos intermedios del ciclo de ATC  
 15 La Figura 4 muestra la concentración viable celular para condiciones, las líneas muestran el promedio de matraces de agitación de duplicados  
 La Figura 5 muestra la acumulación de lactato en estudios de matraz de agitación. Las líneas muestran el promedio de condiciones de duplicados  
 La Figura 6 muestra la acumulación de amonio para todas las condiciones sometidas a ensayo. Las líneas muestran el promedio de matraces de agitación de duplicados para cada condición sometida a ensayo  
 20 La Figura 7 muestra la acumulación de amonio para la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato y ácido oxaloacético a cultivo. Las líneas muestran el promedio de matraces de agitación de duplicados para cada condición sometida a ensayo  
 La Figura 8 muestra la productividad específica de las células de cultivos tratados con distintos niveles de compuestos intermedios de ATC. Las barras de error muestran los intervalos de valor  
 25 La Figura 9 muestra la concentración viable celular para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y en el Bloque 2 del DDE  
 La Figura 10 muestra los perfiles de acumulación de amoniaco para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y en el Bloque 2 del DDE.  
 La Figura 11 muestra la acumulación máxima de amoniaco para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y en el Bloque 2 del DDE  
 30 La Figura 12 muestra la productividad específica para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y el Bloque 2 del DDE  
 Las Figuras 13a, 13b y 13c muestran la respuesta a la dosis de piruvato en comparación con el cultivo de control. La concentración de  $\text{NH}_4^+$  depende de la dosis, pero el efecto dura solo unos pocos días. La producción de  $\text{NH}_4^+$  se reanuda una vez se ha consumido el piruvato (Figura 12b). El orden de las figuras muestra (a) la concentración viable celular, (b) acumulación de  $\text{NH}_4^+$  como una función del tiempo de cultivo y (c) producción de  $\text{NH}_4^+$  específico celular. En la figura (c) la pendiente de la curva indica la producción específica celular o tasas de consumo.  
 35 Las Figuras 14a, 14b y 14c muestran la respuesta a la dosis de malato en comparación con el cultivo de control.  
 Las Figuras 15 muestran la respuesta a la dosis de citrato en comparación con el cultivo de control.  
 Las Figuras 16a, 16b y 16c muestran las respuestas a la dosis de malato, piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, fumarato y oxaloacetato en comparación con el cultivo de control.  
 Las Figuras 17a, 17b y 17c muestran el efecto de la adición de dos compuestos intermedios de ATC al cultivo.  
 Las Figuras 18a, 18b y 18c muestran el efecto de la adición de tres compuestos intermedios de ATC al cultivo.  
 45 Las Figuras 19 a 22 muestran el promedio de productividad específica de las células para la adición de un compuesto intermedio de ATC (Figuras 19 y 20), combinaciones de dos compuestos intermedios de ATC (Figura 21) y tres compuestos intermedios de ATC (Figura 22).

### **Descripción detallada de la invención**

- 50 A menos que defina lo contrario, Todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la invención. Cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica para el ensayo de la presente invención. En una realización de la presente invención, se usará la siguiente terminología.

- 55 Debe entenderse que la presente invención no se limita a los procedimientos concretos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene como objeto describir solamente realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la", incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un azúcar" incluye la combinación de dos o más azúcares y similares.
- 60

"Aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , incluyendo  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$  y  $\pm 0,1\%$  a partir del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos desvelados.

5 En un aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de reducción de la concentración de iones de amonio en un cultivo de células de mamífero, que comprende las etapas de:

10 cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición de compuesto intermedio de ácido tricarbóxico ("ATC") al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de mantenimiento o aumento de la productividad celular de células diseñadas para expresar proteínas terapéuticas en un cultivo de células de mamífero, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:

15 cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición al medio celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

20 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de mantenimiento o aumento del cultivo celular en un cultivo de células de mamífero, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:

25 cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un procedimiento de reducción de la influencia de la concentración de iones de amonio en patrones de glicosilación de los anticuerpos en un cultivo celular, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:

30 cultivar las células en un medio de cultivo celular y poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuesto intermedio de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

35 En otro aspecto, la presente invención se dirige a un medio de cultivo celular que comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.

En determinadas realizaciones los compuestos intermedios de ATC son sales de potasio o sodio de ácido pirúvico y ácido málico.

En una realización, el ácido málico (o sal del mismo) se añadió al cultivo a una concentración final de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM o aproximadamente 15 mM.

40 En determinadas realizaciones, el ácido pirúvico (o una sal del mismo) se añadió al cultivo a una concentración final de aproximadamente 15 mM, aproximadamente 30 mM o aproximadamente 45 mM.

La composición de compuesto intermedio de ATC comprende de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico (o una sal del mismo) y de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico (o una sal del mismo).

45 Los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" y "medio de fermentación" se refieren a una solución de nutrientes que se usa para cultivar células de mamífero que proporcionan típicamente al menos un componente a partir de una o más de las siguientes categorías:

- 50
- 1) una fuente de energía, normalmente en la forma de carbohidrato tal como glucosa;
  - 2) todos los aminoácidos esenciales y normalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína;
  - 3) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos que se requieren a bajas concentraciones;
  - 4) ácidos grasos libres; y
  - 5) oligoelementos, en los que los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos o elementos que aparecen de forma natural que se requieren típicamente a concentraciones muy bajas, normalmente en el intervalo micromolar.

La solución de nutrientes puede suplementarse opcionalmente con uno o más componente a partir de cualquiera de las siguientes categorías:

- 1) hormonas y otros factores de crecimiento como, por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico;
- 2) sales y tampones como, por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato;
- 3) nucleósidos y bases tales como, por ejemplo, adenosina, timidina e hipoxantina; y
- 4) hidrolisatos de proteínas y tejidos.

El medio de cultivo celular es generalmente "libre de suero", cuando el medio está esencialmente libre de suero de cualquier fuente de mamífero (por ejemplo, suero fetal bovino [SFB]). Por "esencialmente libre" se refiere a que el medio de cultivo celular comprende entre aproximadamente el 0-5 % de suero, preferentemente entre aproximadamente el 0-1 % de suero y lo más preferentemente entre aproximadamente el 0-0,1% de suero.

El término "células huésped de mamífero", "célula huésped", "célula de mamífero" y similares, se refiere a líneas celulares de mamíferos que son capaces de crecer y sobrevivir cuando se colocan en bien un cultivo monocapa o bien un cultivo en suspensión en un medio que contiene los nutrientes y factores de crecimiento apropiados. Los factores de crecimiento necesarios para una línea celular en particular se determinan fácilmente de forma empírica sin experimentación indebida, tal como se describe, por ejemplo, en *Mammalian Cell Culture*, Mather, J. P. ed., Plenum Press, N.Y. (1984), y Barnes y Sato, (1980) *Cell*, 22:649. Normalmente, las células son capaces de expresar y secretar grandes cantidades de una glicoproteína en particular de interés dentro del medio de cultivo. Ejemplos de células huésped de mamífero adecuadas dentro del contacto de la presente invención pueden incluir células de ovarios de hámster chino, CHO-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); dp12.CHO cells (documento EP 307.247 publicado el 15 de marzo de 1989); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células (HELA, ATCC CCL 2) de carcinoma cervical humano; células (W138, ATCC CCL 75) de pulmón humano; células (Hep G2, HB 8065) de hígado humano; tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4.

En determinadas realizaciones, la productividad específica de las células de la célula también se mantiene. En determinadas realizaciones la célula se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células K562, células BHK, células PER.C6 y células HEK. En determinadas realizaciones la célula es una célula CHO o un subclon de células CHO que incluye, aunque sin estar limitado a, células CHO K1, CHO pro3 -, CHO DUXB11 y CHO DG44.

"Fase de crecimiento" del cultivo celular se refiere al período de crecimiento celular exponencial (la fase logarítmica) en la que las células se dividen rápidamente. Durante esta fase, las células se cultivan durante un período de tiempo, normalmente entre 1-5 días y en condiciones tales que el crecimiento celular se maximiza. La determinación del ciclo de crecimiento para la célula huésped puede determinarse para la célula huésped particular prevista sin experimentación indebida. "Período de tiempo y en condiciones tales que el crecimiento celular se maximiza" y similares, se refiere a aquellas condiciones de cultivo que, para una línea celular en particular, se determinan que son óptimas para el crecimiento celular y divisiones. Durante la fase de crecimiento, las células se cultivan en un medio de nutrientes que contiene los aditivos necesarios generalmente a aproximadamente 30°-40 °C., preferentemente a aproximadamente 37 °C., en una atmósfera humidificada y controlada, de tal modo que se logra un crecimiento celular óptimo para una línea celular en particular. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un período de aproximadamente entre uno y cinco días, normalmente entre dos a tres días.

"Fase de transición" del cultivo celular se refiere al período de tiempo durante el cual se cumplen las condiciones de cultivo para la fase de producción. Durante la fase de transición, factores medioambientales tales como la concentración de iones de cobre y la temperatura se cambian de condiciones de crecimiento a condiciones de producción.

"Fase de producción" del cultivo celular se refiere al período de tiempo durante el cual el cultivo celular se estabiliza o mantiene a un nivel casi constante. Durante la fase de producción, el crecimiento celular logarítmico ha finalizado y la producción de proteínas es principal. Durante este período de tiempo el medio se suplementa generalmente para soportar la producción de proteínas continuada y para conseguir el producto de glicoproteínas deseado.

El término "expresión" o "que expresa" se usan en el presente documento para referirse a la transcripción y translación dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de un gen de producto en una célula huésped puede determinarse sobre la base de o bien la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula o bien la cantidad de proteína codificada por el gen de producto que es producido por la célula. Por ejemplo, ARNm transcrito a partir de un gen de producto se cuantifica de forma deseable mediante hibridación Northern. Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, págs. 7,3 -7,57. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La proteína codificada por un gen de producto puede cuantificarse o bien mediante análisis de la actividad biológica de la proteína o empleando ensayos que sean independiente de tal actividad, tal como transferencia de Western o radioinmunoensayo usando anticuerpos que son capaces de reaccionar con la proteína. Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, págs. 18,1 -18,88. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

El cultivo de células de mamíferos de la presente invención se prepara en un medio adecuado para la célula particular; que se está cultivando. Medios disponibles en el mercado tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son soluciones de nutrientes de ejemplo. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, (1979) Meth. Enz., 58:44; Barnes y Sato, (1980) Anal. Biochem., 102:255; las patentes de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 5.122.469 o 4.560.655; Publicaciones internacionales WO 90/03430; y WO 87/00195, puede usarse como medio de cultivo. Cualquiera de estos medios puede suplementarse como necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco de Gentamicina™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) lípidos (tales como ácido linoleico u otros ácidos grasos) y sus transportadores adecuados, y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización particular, la célula huésped de mamífero es una célula CHO, preferentemente una CHO DUX (DHFR-) o subclon de la misma tal como célula CHO K1, CHO pro3 -, CHO DG44, CHO DP12 y un medio adecuado contiene un componente de medio basal tal como una formulación basada en DMEM/HAM F-12 (para la composición de medio de DMEM y HAM F12 y especialmente medio libre de suero, véase formulaciones de medio de cultivo en American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, sexta edición, 1988, páginas 346-349) (las formulaciones de medio tal como se describen en el documento de patente de los EE.UU. n.º 5.122.469 son particularmente apropiadas) con concentraciones modificadas de algunos componentes tales como aminoácidos, sales, azúcar y vitaminas y que contiene opcionalmente glicina, hipoxantina y timidina; insulina humana recombinante, peptona hidrolizada, tal como Peptona Proteasa 2 y 3, Primatona HS o Primatona RL (Difco, EE.UU.; Sheffield, England), o el equivalente; un agente protector celular, tal como Pluronic G68 o el polirol de Pluronic equivalente; Gentamicina; y oligoelementos. Preferentemente el medio de cultivo celular está libre de suero.

Los polipéptidos pueden producirse mediante el cultivo de células que expresan la proteína deseada bajo una variedad de condiciones de cultivo celular. Por ejemplo, los procedimientos de cultivo celular para la producción a gran o pequeña escala de proteínas son potencialmente útiles en el contexto de la presente invención. Entre los procedimientos que se pueden usar se incluye, pero sin limitarse a, un sistema de biorreactor de lecho fluidizado, biorreactor de fibras huecas, cultivo en frascos rotativos o de biorreactor de tanque agitado, en los dos últimos sistemas, con o sin microportadores o haciéndose funcionar de forma alternativa en un lote, de modo de cultivo discontinuo o de modo continuo.

En una realización, el cultivo celular de la presente invención se lleva a cabo en un sistema de biorreactor de tanque agitado y se emplea un procedimiento de cultivo discontinuo alimentado. En una realización, el cultivo discontinuo alimentado de las células huésped de mamífero y medio de cultivo se suministran a un recipiente de cultivo inicialmente y se suministran nutrientes de cultivo adicionales, de modo continuo o en aumentos diferenciados, al cultivo durante el cultivo, con o sin recolección celular y/o de producto periódica antes de la finalización del cultivo. El cultivo discontinuo alimentado puede incluir, por ejemplo, un cultivo semicontinuo alimentado, en el que el cultivo completo (incluyendo células y medio) se retira periódicamente y se reemplaza por medio nuevo. El cultivo discontinuo alimentado se distingue del cultivo discontinuo simple en que todos los componentes para el cultivo celular (incluyendo las células y todos los nutrientes del cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al inicio del procedimiento de cultivo. El cultivo discontinuo alimentado puede distinguirse adicionalmente del cultivo de perfusión en la medida en que el sobrenadante no se retira del recipiente de cultivo durante el procedimiento (en cultivo de perfusión, las células se retienen en el cultivo mediante, por ejemplo, filtración, encapsulación, anclaje a microportadores, sedimentación, etc. y el medio de cultivo se introduce de forma continua o intermitente y se retira del recipiente de cultivo).

Además, las células del cultivo pueden propagarse según cualquier esquema o rutina que pueda ser adecuada para la célula huésped y el plan de producción particular contemplado. Por lo tanto, la presente invención contempla un procedimiento de cultivo de una única etapa o multietapa. En un cultivo de etapa única las células huésped se inoculan en un ambiente de cultivo y los procedimientos de la presente invención se emplean durante una fase de producción única del cultivo celular. Como alternativa, se prevé un cultivo multietapa. En el cultivo multietapa las células pueden cultivarse en una cantidad de etapas o fases. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en un cultivo de primera etapa o de fase de crecimiento en el que las células, posiblemente retiradas del almacenamiento, se inoculan dentro de un medio adecuado para favorecer el crecimiento y la alta viabilidad. Las células pueden mantenerse en la fase de crecimiento durante un período adecuado de tiempo mediante la adición de medio nuevo al cultivo de células huésped.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el cultivo celular discontinuo o continuo está previsto para mejorar el crecimiento de las células de mamífero en la fase de crecimiento del cultivo celular. En la fase de crecimiento las células se cultivan en condiciones y durante un período de tiempo que se maximiza para su crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto (dO<sub>2</sub>) y similares, son las que se usan en el huésped particular y serán evidentes para el experto en la materia. Generalmente, el pH se ajusta a un nivel de entre

aproximadamente 6,5 y 7,5 usando bien un ácido (por ejemplo, CO<sub>2</sub>) o una base (por ejemplo, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o NaOH). Un intervalo de temperatura adecuado para cultivar células de mamífero tales como células CHO es de entre 30 a 38 °C y preferentemente aproximadamente 37 °C y un dO<sub>2</sub> adecuado es entre 5-90 % de saturación de aire.

5 En una etapa en particular las células pueden usarse para inocular una fase o etapa de producción del cultivo celular. Como alternativa, tal como se ha descrito anteriormente, la fase o etapa de producción puede ser continua con la fase o etapa de inoculación o crecimiento. En una realización el cultivo celular es un cultivo celular discontinuo alimentado.

10 "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos. Un polipéptido puede ser de origen natural (derivado de tejido), recombinante o de expresión natural a partir de preparaciones celulares procariontas o eucarióticas o producido químicamente mediante procedimientos sintéticos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. "Miméticos de aminoácidos" hace referencia a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de un modo similar a un aminoácido natural. Residuos no naturales se describen bien en las referencias de patente y científicas; unas pocas composiciones no naturales ilustrativas útiles como miméticos de restos de aminoácidos naturales y directrices se describen a continuación. Miméticos de aminoácidos aromáticos pueden generarse mediante el reemplazo por, por ejemplo, D- o L-nafilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tieneilalanina; D- o L-1-, -2,3-, o 4-pireneilalanina; D- o L-3-tieneilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; D- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol (alquil)alaninas; y, D- o L-alquilalaninas, en el que el alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, iso-pentilo o aminoácidos no ácidos sustituido o no sustituido. Anillos aromáticos de aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, benzoimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y piridilo.

15 "Péptido" tal como se usan en el presente documento incluye péptidos en los que son variaciones conservadoras de aquellos péptidos ilustrados específicamente en el presente documento. "Variación conservadora" tal como se usan en el presente documento denota el reemplazo de un resto de aminoácido por otro, residuo biológicamente similar. Ejemplos de variaciones conservadoras incluyen, aunque no de forma limitativa, la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácidos glutámicos o aspárticos o glutamina por asparagina y similares. Aminoácidos hidrófilos neutrales que pueden sustituirse entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. "Variación conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido siempre y cuando los anticuerpos provocados al polipéptido sustituido también inmunoreaccionen con el polipéptido no sustituido. Tales sustituciones conservadoras se encuentran dentro de la definición de las clases de polipéptidos de la invención. "Catiónico" tal como se usan en el presente documento se refiere a cualquier polipéptido que posea una carga positiva neta a un peH de 7,4. La actividad biológica de los péptidos puede determinarse mediante procedimientos estándar conocidos para los expertos en la materia y que se describen en el presente documento.

20 "Recombinante" cuando se usa con referencia a una proteína indica que la proteína ha sido modificada mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo.

25 Tal como se usa en el presente documento "proteína terapéutica" se refiere a cualquier proteína y/o polipéptido que puede administrarse a un mamífero para provocar una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que es buscada, por ejemplo, por un investigador o clínico. Una proteína terapéutica puede provocar más de una respuesta biológica o médica. Además, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa cualquier cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido tal cantidad, resulta en, aunque no se limita a, cicatrizar, prevención o mejoría de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución de la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su ámbito cantidades eficaces para mejorar la función fisiológica normal así como cantidades eficaces para causar una función fisiológica en un paciente que mejore o ayude en el efecto terapéutico de un segundo agente farmacéutico.

30 Todos los restos de "aminoácidos" identificados en el presente documentos se encuentran en la configuración L natural. Para seguir la nomenclatura estándar de polipéptidos, las abreviaturas para los restos de aminoácidos son las siguientes:

1 Letra	3 Letras	Aminoácido
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina

(continuación)		
1 Letra	3 Letras	Aminoácido
M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L- lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	L-ácido glutámico
W	Trp	L-triptofano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	L-ácido aspártico
N	Asn	L-asparagina
C	Cys	L-cisteína

Cabe destacar que todas las secuencias de restos de aminoácidos se representan en el presente documento mediante sus fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha se encuentra en la dirección convencional del amino-terminal a carboxi-terminal.

5 En otra realización el polipéptido es un antígeno que se une a polipéptido. En una realización el antígeno que se une a polipéptido se selecciona a partir del grupo que consiste en un receptor soluble, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fv unida por disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv unido por disulfuro o diacuerpo.

10 El término "antígeno que se une a polipéptido", como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otras construcciones de proteína que son capaces de unirse a un antígeno.

Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, o F(ab)<sub>2</sub> se usan con sus significados estándar (véase, por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

15 Un "anticuerpos quimérico" se refiere a un tipo de anticuerpo diseñado por ingeniería que contiene una región variable que se produce de forma natural (cadena ligera y cadenas pesadas) derivadas a partir de un anticuerpo donante en asociación con regiones constantes de cadena ligera y pesada derivadas a partir de un anticuerpo aceptador.

20 Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo diseñado por ingeniería que tiene sus RDC derivadas a partir de una inmunoglobulina de donante no humano, las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula derivándose de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s). Además, los restos del soporte marco pueden alterarse para conservar la afinidad de unión (véase, por ejemplo, Queen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson y col., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)). Un anticuerpo aceptador humano adecuado puede ser uno seleccionado a partir de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT.RTM, la base de datos Los Alamos y la base de datos Swiss Protein, mediante homología a las secuencias de nucleótido y aminoácidos del anticuerpo donador. Un anticuerpo humano caracterizado mediante una homología a las regiones marco del anticuerpo donador (sobre una base de aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región marco variable de cadena pesada para la inserción de las RDC del donante. Un anticuerpo aceptador adecuado capaz de donar regiones marco variables o constantes de cadena

ligera puede seleccionarse de un modo similar. Cabe destacar que las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo aceptador no son necesarias que se originan a partir del mismo anticuerpo aceptador. La técnica anterior describe varios modos de producir tales anticuerpos humanizados -- véase por ejemplo el documento EP-A-0239400 y el documento EP-A-054951.

- 5 El término "anticuerpo donador" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que contribuye que las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, RDC u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos a una primera pareja de inmunoglobulina, para proporcionar la región de codificación de inmunoglobulina alterada y anticuerpo alterado expresado resultante con el especificidad antigénica y actividad neutralizante característica del anticuerpo donador.
- 10 El término "anticuerpo aceptado" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo al anticuerpo donador, que contribuye todo (o cualquier porción, en algunas realizaciones todas) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones marco de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera a la primera pareja de inmunoglobulina. En determinadas realizaciones un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptador.
- 15 "RDC" se definen como las secuencias de aminoácidos de región determinante de la complementariedad de un anticuerpo que son las regiones hipervariables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>a</sup> Ed., US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Existen tres RDC (o regiones de RDC) de cadena pesada y tres de cadena ligera en la parte variable de una inmunoglobulina. Por tanto, las "RDC" tal como se usan en el presente documento se refieren todas las tres RDC de cadena pesada o a todas las tres RDC de cadena ligera (o todas ambas de las RDC de cadena pesa y ligera, si es el caso). La estructura y el plegamiento de proteínas del anticuerpo puede significar que otros restos se consideran parte de la región de unión del antígeno y deberá entenderse así por un experto en la materia. Véase por ejemplo Chothia y col., (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions; Nature 342, pág. 877-883.
- 20 Tal como se usan en el presente documento el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son los responsables de propiedades funcionales separadas de proteínas y en muchos casos pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin la pérdida de la función del resto y/o del dominio. Un "dominio variable único de anticuerpo" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completo y dominios de variable modificados, por ejemplo, en el cual uno o más bucles se han reemplazado por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpos o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones N- o C-terminal, así como fragmentos plegados de dominios variables que retienen al menos la actividad de unión y especificidad del dominio de longitud completa.
- 25 La frase "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio de variable de anticuerpo  $V_H$ ,  $V_{HH}$ ,  $V_L$  que se une de forma específica a un antígeno o epítipo independientemente de una región V o dominio distinto. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo- o heteromultímero) con otras, regiones variables distintas o dominios variables en los que otras regiones o dominios no son necesarios para la unión de antígeno mediante el dominio variable único de inmunoglobulina (es decir, en los que el dominio variable único de inmunoglobulina se une a antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es lo mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" que es capaz de unirse a un antígeno tal como el término se usa en el presente documento. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo único a partir de otras especies tales como roedores (por ejemplo tal como se desvela en el documento WO 00/29004), tiburón nodriza y dAbs  $V_{HH}$  de camélidos (nanocuerpos).  $V_{HH}$  de camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies entre las que se incluye camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada naturalmente libres de cadenas ligeras. Tales dominios de  $V_{HH}$  pueden humanizarse según las técnicas estándar disponibles en la técnica y tales dominios aún se consideran "anticuerpos de dominio" según la invención. Tal como se usa en el presente documento, " $V_H$  incluye dominios  $V_{HH}$  de camélidos. VRAN son otro tipo de dominio variable único de inmunoglobulina que se identificaron en pez cartilaginoso incluyendo tiburón nodriza. Estos dominios también son conocidos como región variable de receptor de antígeno nuevo (comúnmente abreviados como V(RAN) o VRAN). Para más detalles, véase, Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) y el documento US20050043519A.
- 30 El término "dominio que se une a epítipo" se refiere a un dominio que se une de forma específica a un antígeno o epítipo independientemente de una región V o dominio distinto, este puede ser un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo un ser un dominio de variable único de inmunoglobulina humano, camélido o de tiburón.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de unión a antígeno" se refiere a un sitio sobre una proteína en el cual es capaz de unirse específicamente a un antígeno, este puede ser un dominio único, por ejemplo un dominio que se une a epítipo, o pueden ser dominios  $V_H/V_L$  emparejados como se pueden encontrar en un anticuerpo estándar. En algunos aspectos de la invención dominios de cadena única  $F_v$  (ScFv) pueden proporcionar

sitios de unión a antígeno.

Los términos "mAbAb" y dAbmAb" se usan en el presente documento para referirse a proteínas que se unen a antígeno de la presente invención. Los dos términos pueden usarse indistintamente y están previstos para que tengan el mismo significado tal como se usa en el presente documento.

**5 Ejemplo 1--Materiales y procedimientos/Diseño experimental**

Se seleccionaron varios compuestos intermedios de ciclo de ATC para un experimento de respuesta a la dosis basándose en la disponibilidad en el mercado, bien el ácido o su sal sódica se adquirieron de Sigma Aldrich para preparar soluciones de alimentación para usarse en el estudio. Los compuestos seleccionados fueron ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido de  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido fumárico, ácido málico (o sales de sodio) y ácido oxaloacético (no hay sal sódica disponible).

El ácido oxaloacético y el ácido málico se añadieron al cultivo a una concentración final de 5 mM, 10 mM y de 15mM. El resto de los intermedios de ATC se sometieron a ensayo y se añadieron al cultivo a una concentración final de 15 mM, 30 mM y 45 mM. La Figura 1 resume los componentes del ciclo de ATC sometidos a ensayo y su ubicación en la trayectoria. La Tabla 1 resume la condición de operación de los matraces de agitación en el estudio así como los programas de alimentación para el estudio de respuesta a la dosis.

Los matraces de agitación se control se les estableció cada vez un brazo en el estudio iniciado. Los matraces de agitación de control eran cultivos discontinuos alimentados sin la adición de ningún compuesto intermedio de ATC. Todas las condiciones sometidas a ensayo se realizaron en duplicado en matraces de agitación.

Tabla 1 Condiciones de operación para matraces de agitación para el estudio de respuesta a la dosis

Línea celular	DG44 CHO
Volumen del recipiente/volumen de trabajo (ml)	250/150
Velocidad de agitación (RPM)	150
Temperatura (°C)	35
Concentración de CO <sub>2</sub> en la incubadora (%)	5
Concentración de células viables Inicial diana (CCVi) (x 10 <sup>6</sup> células/ml)	0,8-1,0
Tipo medio	9-01-3-0174
Alimentación de hidrolisatos	En el día 4 después de la inoculación
Alimentación de compuestos intermedios de ATC	En el día 5 después de la inoculación

**20 Ejemplo 2-- Diseño de experimento (DDE) para probar interacciones sobre compuestos intermedios de ATC seleccionados/Procedimientos analíticos**

El experimento para probar interacciones de todos los componentes seleccionados se llevó a cabo en dos bloques. Cada uno de los bloques se diseñó para contener puntos centrales y matraces de agitación de control (cultivos discontinuos, sin adición de ningún componente). El primer bloque probó las interacciones del ácido pirúvico, ácido de  $\alpha$ -cetoglutárico, fumárico y ácido oxaloacético. El segundo bloque probó las interacciones del ácido pirúvico, ácido de  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido fumárico, oxaloacético y ácido málico. La Figura 2 muestra la configuración experimental para el bloque n.º 1 y la Figura 3 muestra la configuración experimental par ale bloque n.º 2. Todas las condiciones se llevaron a cabo en duplicados. Las condiciones de operación para los matraces de agitación se muestran en la Tabla 2

**30** Tabla 2 Condiciones de operación para matraces de agitación para el estudio de DDE

Línea celular	DG44 CHO
Volumen del recipiente/volumen de trabajo (ml)	250/150
Velocidad de agitación (RPM)	150
Temperatura (°C)	35

(continuación)

Concentración de CO <sub>2</sub> en la incubadora (%)	5
Concentración de células viables Inicial diana (CCVi) (x 10 <sup>6</sup> células/ml)	1,0
Tipo medio	9-01-3-0174
Alimentación de hidrolisatos y alimentación de vitaminas	En el día 4 después de la inoculación
Alimentación de compuestos intermedios de ATC	En el día 5 después de la inoculación

5 Los cultivos de matraz de agitación se tomaron muestras cada otro día para determinar la concentración celular total (CCT), concentración de células viables (CCV), viabilidad celular, concentración de metabolito (glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amoníaco y osmolaridad. La muestra principa se dividió en ensayos a base de células (CCT, ensayos de viabilidad) y ensayos libres de células (concentración de metabolitos, osmolaridad). Las muestras de seguridad (sobrenadantes libres de células) para referencias futuras se produjeron medinte la centrifugación de la muestra principal y alicotando 1,8 ml en crioviales Nunc que se almacenaron posteriormente a -70°C. El título se determinó sobre las muestras filtrado a travésd eun filtro de 0,22 µm.

10 La CCT, CCV y la viabilidad se determinaron usando un recuento celular automático basándose en el procedimiento de exclusión de azul tripán (ViCell XR, Beckman Coulter). Las muestras se pretrataron con proteasa antes del recuento celular (TripLE, Life Technologies, EE.UU.) usando volúmenes iguales de solución materia de proteasa y cultivo. La incubación para permitir la disociación se llevó a cabo durante 20-25 minutos a 37 °C con agitación suave. Los metabolitos se midieron usando Nova Bioprofile (Nova Bioprofile 400); que se hace funciona sobre reacciones electroquímicas a base de enzimas. La medición de la osmolaridad se basó en el procedimiento de depresión de punto de congelación (Advanced Instruments, Model N/A). Las muestras libres de células filtradas se enviaron el grupo de desarrollo bioanalítico para la acumulación de anticuerpos y la determinación de la actividad de unión (Biacore).

Cálculo de parámetros

Integral de la concentración de células viables (CVI)

20 La integral de las células viables se calculó usando datos de CCV y aplicando la regla del trapecoide siguiendo la fórmula,

$$IVC = \sum_{n=1}^i \left[ \frac{(VCC_n + VCC_{n-1})}{2} (t_n - t_{n-1}) \right]$$

(2)

en la que:

25 CVI, Integral de densidad de células viables [=] (10<sup>6</sup> células/ml).día  
 t, tiempo de cultivo [=] días  
 CCV, densidad de células viables [=] 10<sup>6</sup> células/ml  
 ni, número de muestras tomado a lo largo del cultivo, para fines de cálculo i=4

La productividad específica se calculó usando los últimos datos de título divididos por el último valor de CVI calculado.

30 **Ejemplo 3--Resultados de respuesta a la dosis**

El experimento se dividió en tres bloques. El primer bloque probó el ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido α-cetoglutarico y acido fumárico. El segundo bloque probó el ácido oxaloacético y el tercer bloque el ácido málico.

35 La Figura 4 muestra los resultados de CCV promedio consolidados para todas los matraces de agitación. Todos los cultivos tratados con ácido cítrico perdieron considerablemente viabilidad a los dos días después de la adición de ácido cítrico al cultivo tal como se indica mediante la reducción en la concentración de células viables. Ácido málico añadido en alta concentración (15 mM y 30 mM) al cultivo también indujo la pérdida de viabilidad celular tal como se observa en la Figura 4. En este caso, la adición de ácido málico mostró un efecto de respuesta a la dosis con el descenso más rápido en la viabilidad inducido por la concentración de 30 mM de ácido málico, seguido por 15 mM y ningún descenso en la viabilidad (en comparación con los matraces de agitación de control) cuando la concentración

de ácido málico en el cultivo era de 5 mM.

La acumulación de lactato dependía del tipo y cantidad de compuesto intermedio añadido al cultivo. Los matraces de agitación de control mostraron una baja acumulación de lactato (< 1,0 g/l) alcanzando su máximo alrededor del día 7 seguido por una etapa de consumo de lactato.

- 5 Cuando se añadió 45 mM de ácido pirúvico al cultivo, la acumulación de lactato alcanzó alrededor de 3 g/l. Todos los otros compuestos intermedios de ETC influenciaron la acumulación de lactato a niveles de entre 1 g/l a 2 g/l. El perfil de acumulación de lactato en matraces de agitación con ácido málico a una concentración final de 5 mM fue similar al observado en los matraces de agitación de control.

- 10 Los perfiles de amonio mostraron distintos niveles de acumulación. La concentración de amoníaco en matraces de agitación que analizaba las condiciones de control alcanzó cerca de los 9 mM. La Figura 6 resume los datos para todas las condiciones analizadas en el estudio de respuesta a la dosis. La adición de ácido pirúvico al cultivo a una concentración final de 45 mM el día 5 indujo un consumo de amoníaco hasta el día 10. Después de este punto de tiempo en el cultivo, la acumulación de amoníaco se reinició y alcanzó una concentración final de 7 mM. Cuando se añadió el ácido pirúvico a 30 mM el efecto de consumo de amoníaco duró solo hasta el día 8 y a continuación el amoníaco se acumuló a 8 mM. La adición de ácido pirúvico a una concentración final de 15 mM solo tuvo un efecto mínimo en la reducción de amoníaco y cultivos que acumularon amoníaco a un nivel ligeramente superior que el encontrado en los matraces de agitación de control.

- 15 Los compuestos intermedios de ATC que proporcionaron el mejor control en la acumulación de amoníaco fueron el ácido de  $\alpha$ -cetoglutarico y el ácido oxaloacético. Aquellos compuestos intermedios a concentraciones analizadas mantuvieron una concentración de amoníaco de entre 3 mM y 6 mM. La Figura 7 resume el efecto del ácido de  $\alpha$ -cetoglutarico y el ácido oxaloacético sobre la acumulación de amoníaco.

- 20 La adición de compuestos intermedios de ATC al cultivo también afectó la productividad específica de las células final. En el caso de los cultivos de control, el valor de productividad específica de las células que se calculó tenía un promedio de 31 pg/célula/día (intervalo 24-35 pcd); los cultivos tratados con 45 mM de ácido pirúvico mostraron una disminución en la productividad específica de las células a ~24 pg/célula/día. Solo los cultivos tratados con ácido oxaloacético mostraron una reducción en los niveles de acumulación de amoníaco y mantuvieron los valores de productividad específicos celulares tal como se muestra en la Figura 8. La adición de todos los otros compuestos intermedios de ATC mostró una disminución en la productividad específica de las células.

- 25 Por lo tanto, el mejor compuesto intermedio de ATC para controlar el amoníaco y mantener niveles de productividad específicos celulares es el ácido oxaloacético en concentraciones de 5-15 mM en el cultivo.

- 30 Ejemplo 4--Interacciones entre compuestos intermedios de ATC (dos a cinco). Resultados del DDE

- A partir de los experimentos de respuesta a la dosis, el ácido pirúvico, ácido málico, ácido oxaloacético, ácido fumárico y ácido de  $\alpha$ -cetoglutarico fueron superiores a las interacciones de prueba. La concentración de cada uno de los compuestos intermedios se escogió según la concentración que mostraba una respuesta durante el experimento de respuesta a la dosis. En algunos casos, la concentración escogida fue entre dos valores realmente analizados durante el experimento de respuesta a la dosis.

- 35 El experimento se configuró en dos bloques debido al número de matraces de agitación en el estudio completo. La Figura 2 y la Figura 3 muestra las condiciones analizadas por bloque. Cada bloque contenía condiciones de control (sin la adición de compuestos intermedios de ATC).

- 40 La concentración de células viables mostró valores máximos similares para todas las condiciones analizadas tal como se muestra en la Figura 9. El descenso en la CCV el día 6 se explica por la adición de los compuestos intermedios de ATC ya que alguna dilución del cultivo ocurrió para obtener las concentraciones finales deseadas en el cultivo.

- 45 En el caso de la acumulación de amoníaco, la respuesta a los compuestos intermedios mostró una gran variación. Los cultivos en condiciones de control mostraron una acumulación de amoníaco tan alta como 9 mM mientras que la mezcla de 20 mM de ácido pirúvico, 20 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato, 20 mM de ácido fumárico mostró la acumulación de amoníaco más baja a 2 mM al final del cultivo. Tal como se ha observado en los estudios de respuesta a la dosis, el ácido málico y el ácido pirúvico pudo suprimir la generación de amoníaco durante unos pocos días y a continuación los niveles de amoníaco aumentar a una concentración final similar a la de los cultivos de control. La Figura 10 resume los datos para todas las condiciones.

- 50 La Figura 11 muestra la acumulación de amoníaco máxima para todas las condiciones sometidas a ensayo. Los cuadros con texto muestran las condiciones con la acumulación de amoníaco más baja. Varias de las combinaciones mostraron un control sobre la concentración de amoníaco. Todas las condiciones marcadas mostraron una concentración de amoníaco máxima cerca de 4 mM (concentración de amoníaco en el control es de ~ 9 mM).

- 55 Cuando las condiciones que conducen a una acumulación de amoníaco se registran en los datos de productividad

específicos celulares (Figura 12), los resultados muestran que algunas de las combinaciones de compuestos intermedios de ATC tienen un efecto negativo sobre la productividad específica de las células en comparación con los de control.

5 De todas las condiciones analizadas, las combinaciones de 5 mM de ácido málico / 20 mM de ácido pirúvico, 5 mM de ácido málico / 20 mM de ácido fumárico, 5 mM de ácido málico / 20 mM de ácido de  $\alpha$ -cetoglutárico y 20 mM de ácido de  $\alpha$ -cetoglutárico mantienen la productividad específica de las células y controlan la generación de amoníaco. En todos los casos, la productividad específica de las células se mantuvo a un nivel cerca de los 30 pg/célula/día.

Ejemplo 5--Análisis adicional de experimentos de compuestos intermedios de ATC.

10 Las Figuras 13a, 13b y 13c muestran la respuesta a la dosis de piruvato en comparación con el cultivo de control. La concentración de  $\text{NH}_4^+$  depende de la dosis, pero el efecto dura solo unos pocos días. La producción de  $\text{NH}_4^+$  se reanuda una vez se ha consumido el piruvato (Figura 13b). El orden de las figuras muestra (a) la concentración viable celular, (b) acumulación de  $\text{NH}_4^+$  como una función del tiempo de cultivo 30 y (c) producción de  $\text{NH}_4^+$  específico celular. En la figura (c) la pendiente de la curva indica la producción específica celular o tasas de consumo.

15 En el caso del malato, el experimento de respuesta a la dosis indica que las concentraciones superiores a 5 mM son tóxicas para las células. A una concentración de 5 mM, no hay un efecto claro del ácido málico sobre la acumulación o producción de  $\text{NH}_4^+$  tal como muestran las Figuras 14b y 14c.

20 La adición de ácido de citrato tiene efectos perjudiciales en el cultivo. Debe evitarse su uso para reducir la acumulación de  $\text{NH}_4^+$ .

25 Se configuró un segundo experimento para verificar los resultados del primer experimento usando compuestos intermedios seleccionados añadidos a una determinada concentración. En este experimento, solo se observaron efectos mínimos en la concentración celular mientras que se confirmaron los resultados. La adición de malato, oxaloacetato y piruvato redujeron parcialmente la acumulación y reducción de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 16b y 16c); la adición de fumarato ralentiza la producción y acumulación de  $\text{NH}_4^+$ . En el caso del  $\alpha$ -KG, la Figura 16c indica que el  $\text{NH}_4^+$  se consume, lo que también se muestra en la Figura 18b.

Las Figuras 17a a 17c muestran el efecto de la adición de dos compuestos intermedios de ATC al cultivo. En general, la CCV no se vio gravemente afectada (Figura 17a) puesto que los recuentos de células no mostraron grandes diferencias en comparación con el cultivo de control o se recuperaron según continuó el cultivo.

30 En el caso de la producción y acumulación de  $\text{NH}_4^+$ , resultó evidente que la adición de dos compuestos intermedios de ATC resulta en un mejor control de  $\text{NH}_4^+$ . A partir de la Figura 17c, es posible notar que las combinaciones que contienen  $\alpha$ -KG resultaron en tasas de producción específicas celulares inferiores y una concentración de  $\text{NH}_4^+$  estable en el cultivo (curvas alrededor de la línea de puntos negra).

35 Las Figuras 18a a 18c muestran el efecto de la adición de 3 compuestos intermedios de ATC al cultivo. Para las combinaciones de  $\alpha$ -KG/Fumarato/OAA y Piruvato/ $\alpha$ -KG/OAA, el recuento de células,

se vio significativamente afectados después de la adición de esta combinación sugiriendo que su uso debe evitarse. En el caso de la combinación de piruvato/ $\alpha$ -KG/fumarato, el efecto sobre los recuentos de células fue menos pronunciado. Esta misma combinación mostró una reducción en la tasa de producción de  $\text{NH}_4^+$  y estabilización de la concentración de  $\text{NH}_4^+$  (Figuras 18c y 18b, respectivamente).

40 Las Figuras 19 a 22 muestran el promedio de productividad específica de las células para la adición de un compuesto intermedio de ATC (Figuras 19 y 20), combinaciones de dos compuestos intermedios de ATC (Figura 21) y tres compuestos intermedios de ATC (Figura 22).

45  $\alpha$ -KG se identificó como el compuesto intermedio de ATC más eficaz para reducir la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  cuando se usa solo. Sin embargo, También tiende a mostrar una reducción en la productividad específica de las células tal como se muestra en las Figuras 19 y 20 (por aproximadamente un 10-20 % en comparación con el control).

50 En caso de combinaciones de compuestos intermedios de ATC, la combinación de Piruvato/Malato (5mM/20mM) preservó la productividad específica de las células mientras que alcanzó una reducción aceptable de  $\text{NH}_4^+$  (Figuras 17b y 17c). Existe una cantidad de combinaciones posibles que podrían usarse para reducir la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  y deben evaluarse basándose en el objetivo. Se espera que las combinaciones que incluyen  $\alpha$ -KG funcionen mejor que otras combinaciones a costa de la productividad específica de las células reducida.

Finalmente, algunas combinaciones que incluyen 3 compuestos intermedios de ATC también reducen la acumulación de  $\text{NH}_4^+$ .

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de reducción de la concentración de iones amonio en un cultivo de células de mamífero, que comprende las etapas de:
- 5 cultivar las células en un medio de cultivo celular y  
poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición de compuestos intermedios de ácido tricarboxílico ("ATC") al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuestos intermedios de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.
- 10 2. Un procedimiento de mantenimiento o aumento de la productividad celular de células diseñadas para expresar proteínas terapéuticas en un cultivo de células de mamífero, en la que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:
- 15 cultivar las células en un medio de cultivo celular y  
poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición de compuestos intermedios de ATC al medio celular, en el que la composición de compuestos intermedios de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.
- 20 3. Un procedimiento de mantenimiento o aumento de cultivo celular en un cultivo de células de mamífero, en el que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:
- 20 cultivar las células en un medio de cultivo celular y  
poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición de compuestos intermedios de ATC al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuestos intermedios de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.
- 25 4. Un procedimiento de reducción de la influencia de la acumulación de iones de amonio en patrones de glicosilación de anticuerpos en un cultivo celular, en el que la generación de iones de amonio se reduce, que comprende las etapas de:
- 30 cultivar las células en un medio de cultivo celular y  
poner en contacto o administrar una cantidad eficaz de una composición de compuestos intermedios de ATC al medio de cultivo celular, en el que la composición de compuestos intermedios de ATC comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.
- 35 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el cual la productividad específica de las células también se mantiene.
6. Un medio de cultivo celular que comprende aproximadamente de 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido málico y de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 45 mM de ácido pirúvico.
7. Un medio de cultivo celular según la reivindicación 6, en el cual la productividad específica de las células también se mantiene.

Experimento de compuestos intermedios del ciclo TCA

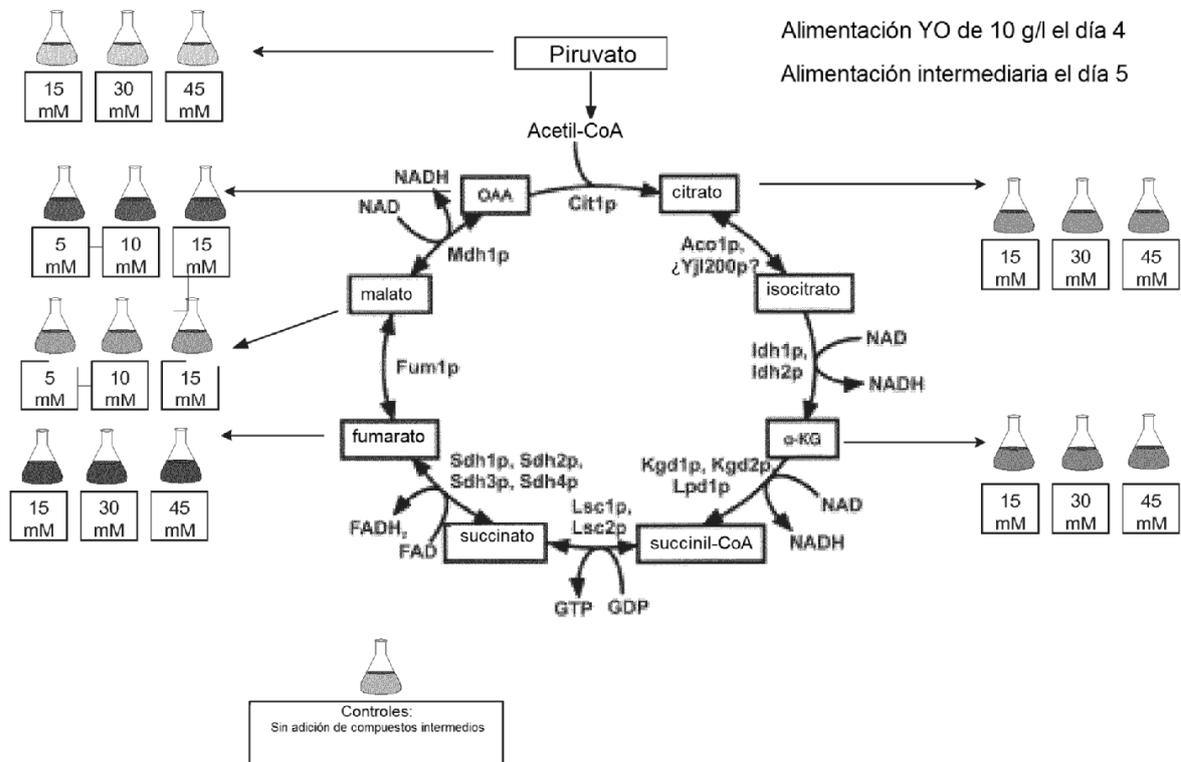


Figura 1

Diseño experimental para el estudio de respuesta a la dosis de los compuestos intermedios del ciclo de ATC

Experimento de interacción de compuestos intermedios del ciclo de ATC del Bloque 1

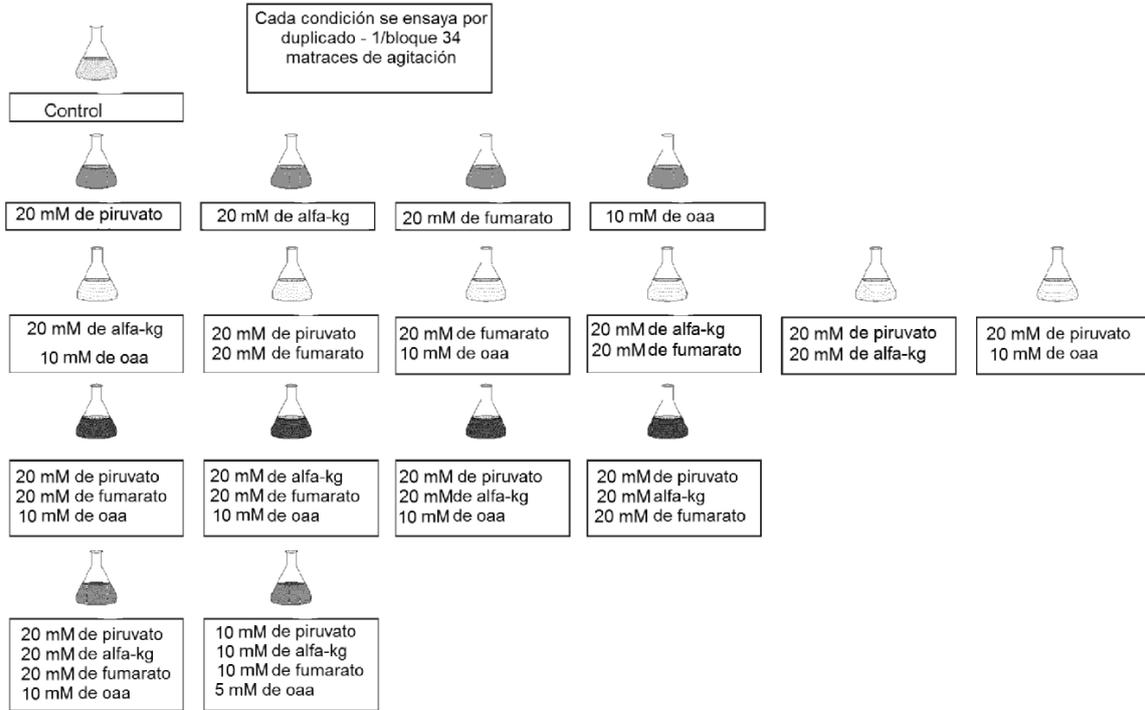


Figura 2 Diseño experimental para el bloque n.º 1 del estudio de interacción de compuestos intermedios del ciclo de ATC

Experimento de interacción de compuestos intermedios  
de malato del Bloque 2

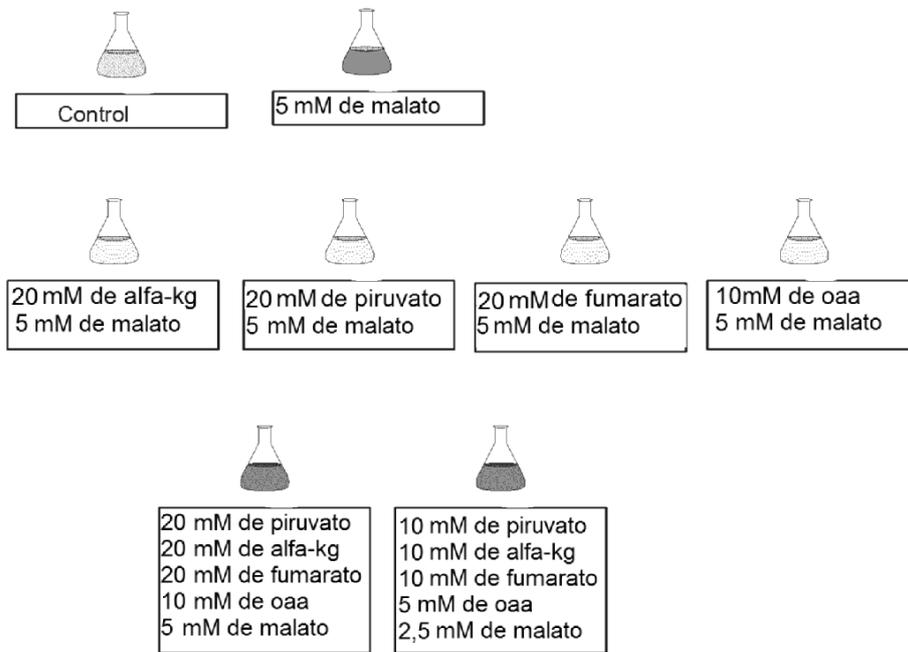


Figura 3

Diseño experimental n.º 2 del estudio  
de interacción de compuestos intermedios del ciclo de ATC

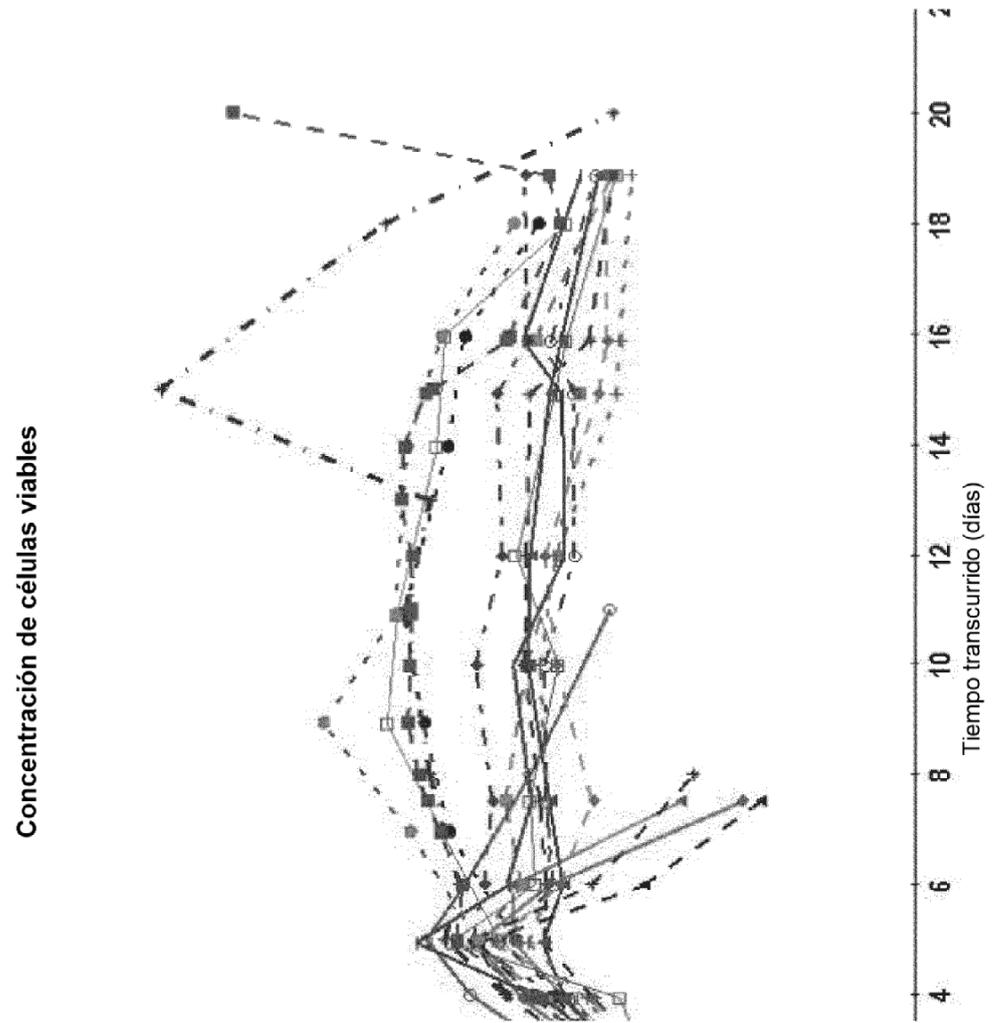


Figura 4

Concentración de células viables para matraces de agitación de duplicados, las líneas muestran el promedio de matraces de agitación de duplicados

58 importaciones:\respuesta a dosis de TCATCA.Resultado contiene datos no-cGMP

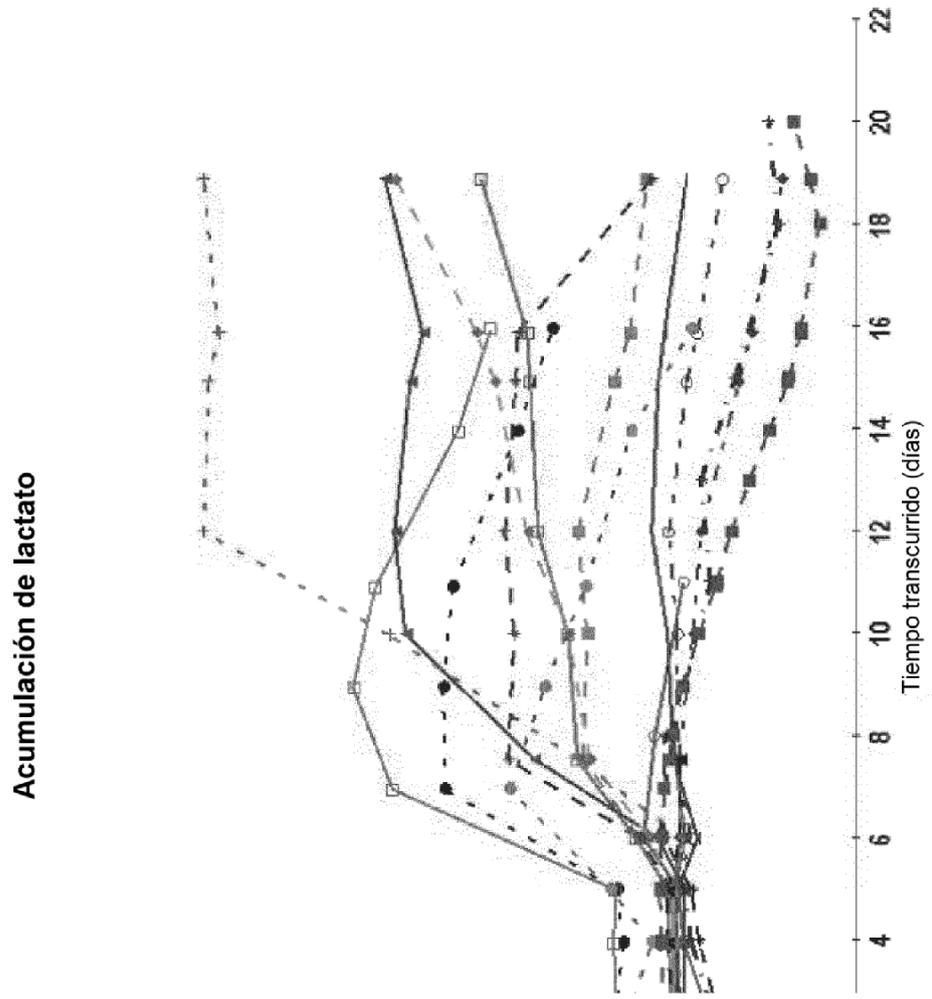


Figura 5

Acumulación de lactato en estudios de matraz de agitación. Las líneas muestran el promedio de condiciones de duplicados

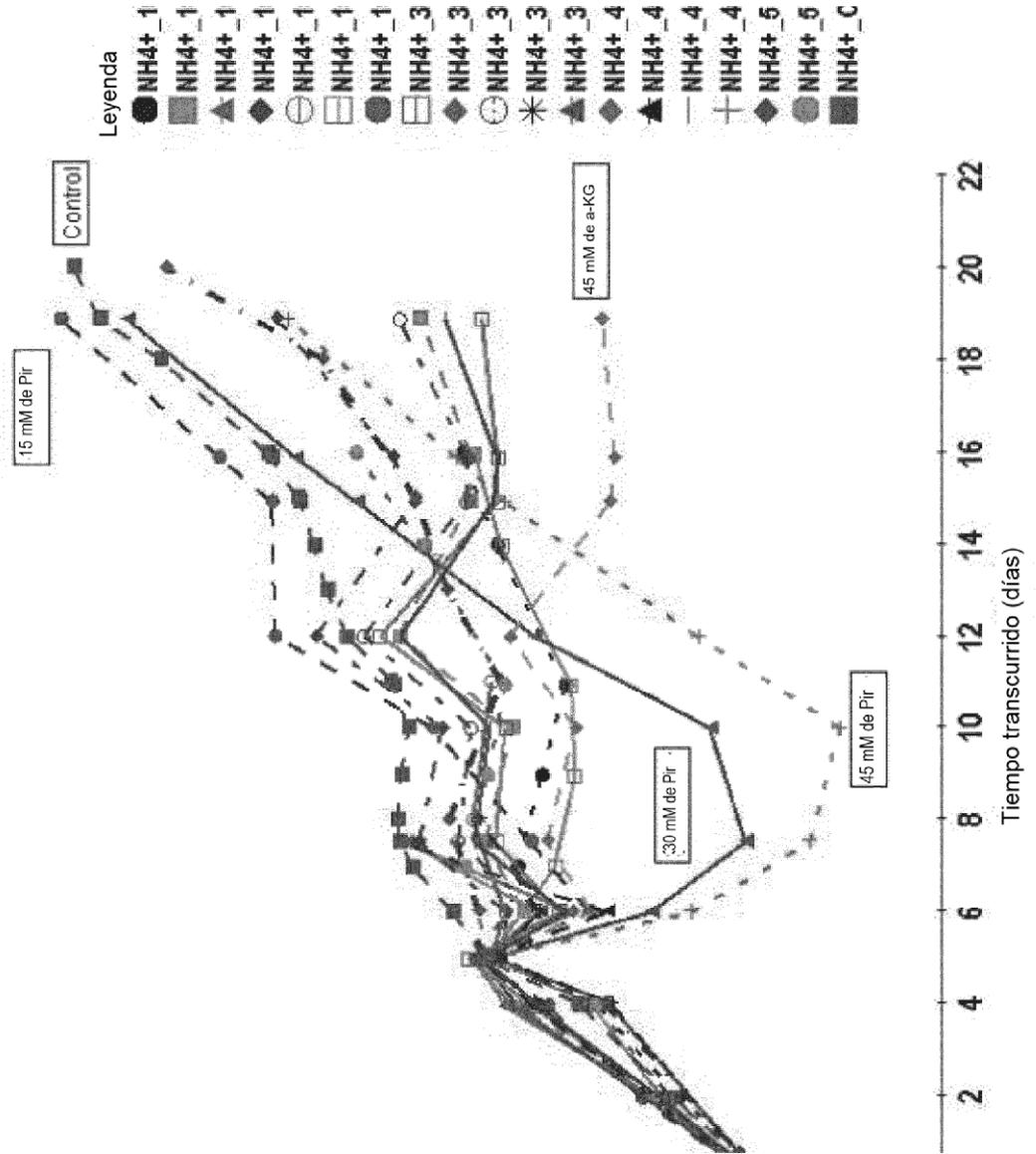


Figura 6

Acumulación de amonio para todas las condiciones sometidas a ensayo. Las líneas muestran el promedio de matraces de agitación de duplicados para cada condición sometida a ensayo.

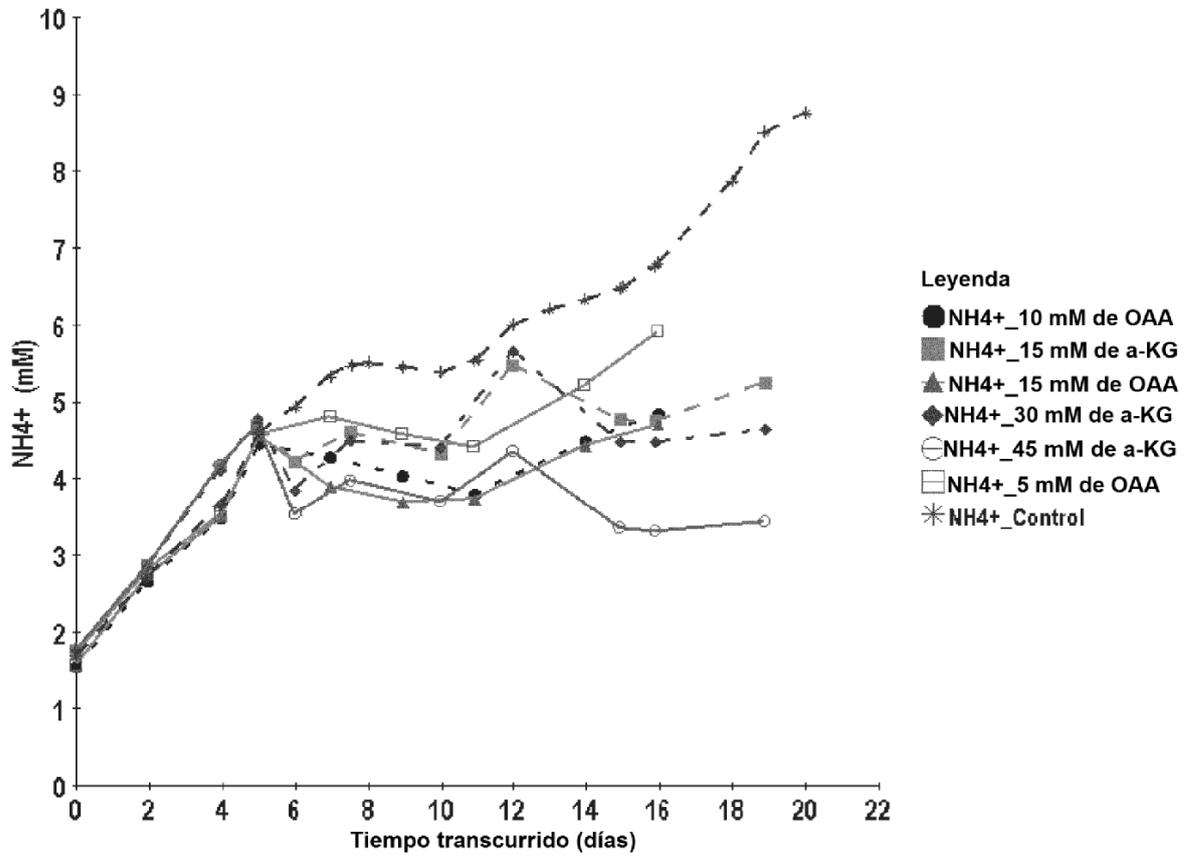


Figura 7

Acumulación de amonio para la adición de  $\alpha$ -KG y ácido oxaloacético a cultivo. Las líneas muestran el promedio de matraces de agitación de duplicados para cada condición sometida a ensayo

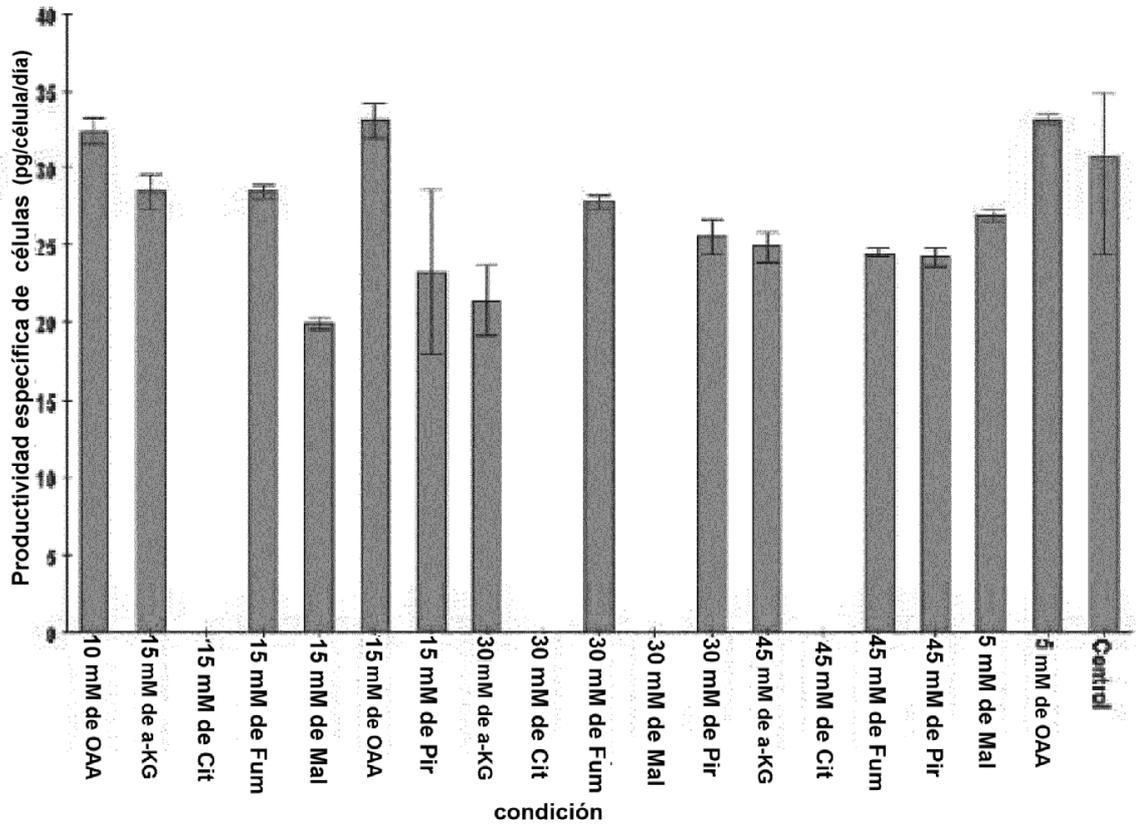


Figura 8

Productividad específica de células de cultivos tratados con distintos niveles de compuestos intermedios de ATC. Las barras de error muestran los intervalos de valor

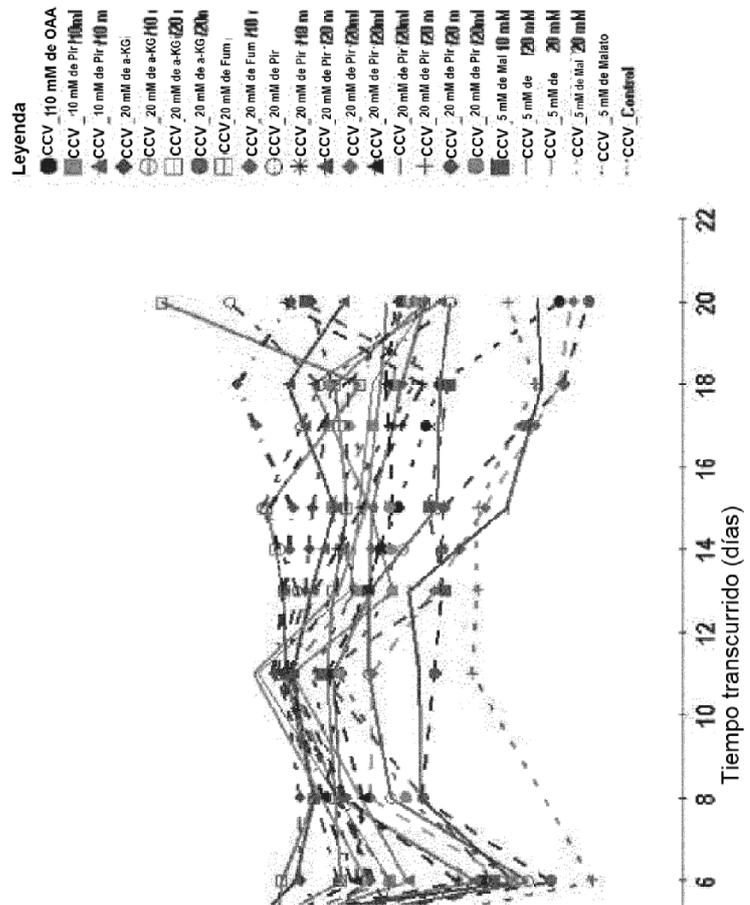


Figura 9

Concentración viable celular para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y en el Bloque 2 del DDE

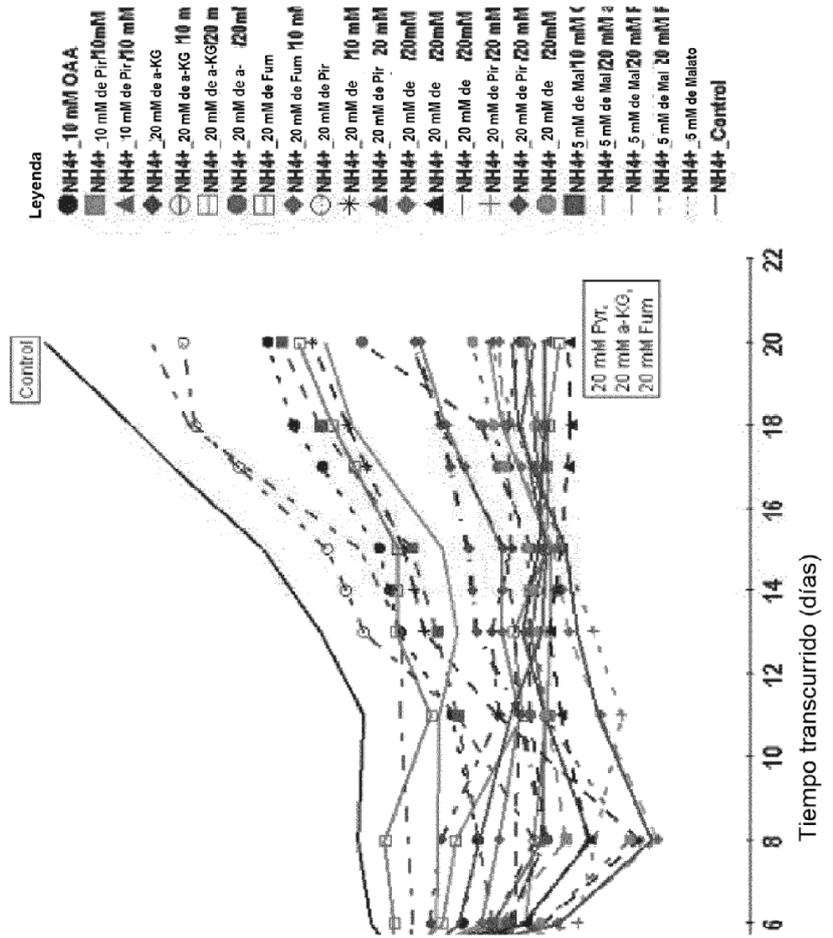


Figura 10

Acumulación de amoníaco para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y en el Bloque 2 del DDE

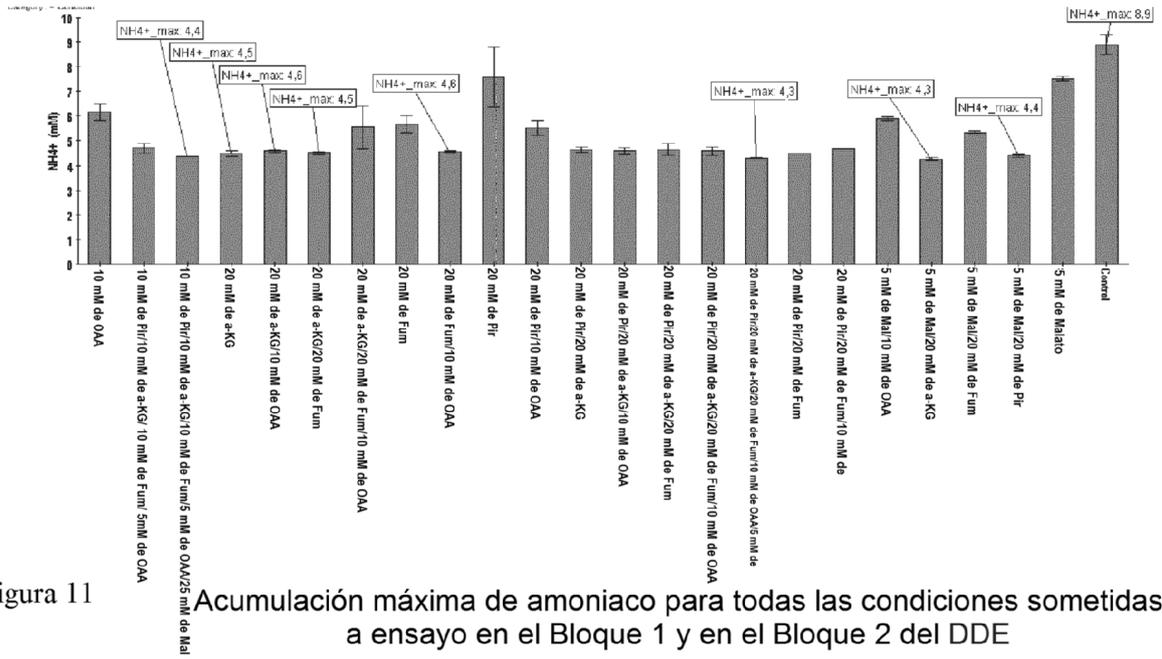


Figura 11

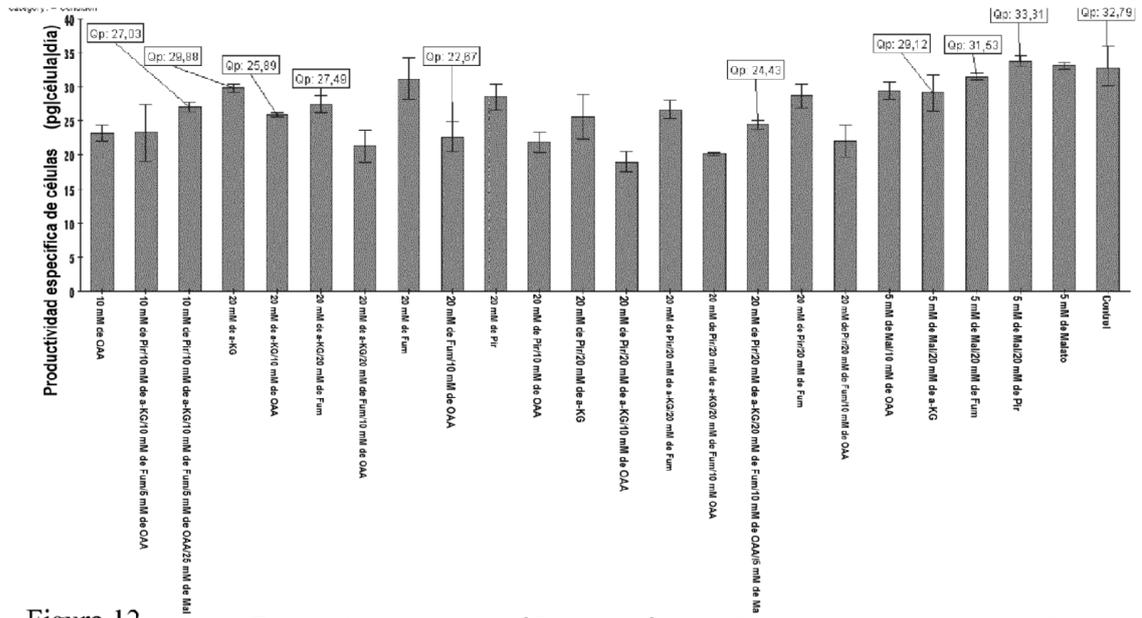


Figura 12

Productividad específica de células final para todas las condiciones sometidas a ensayo en el Bloque 1 y en el Bloque 2 del DDE

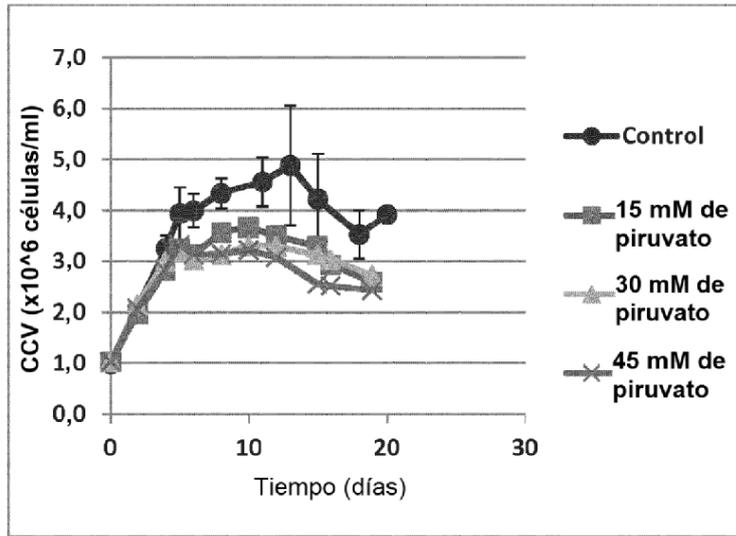


Figura 13a

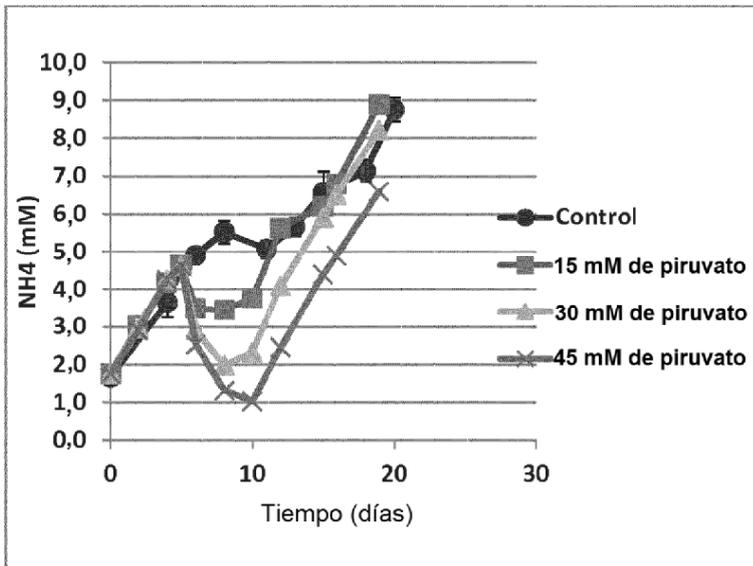


Figura 13b

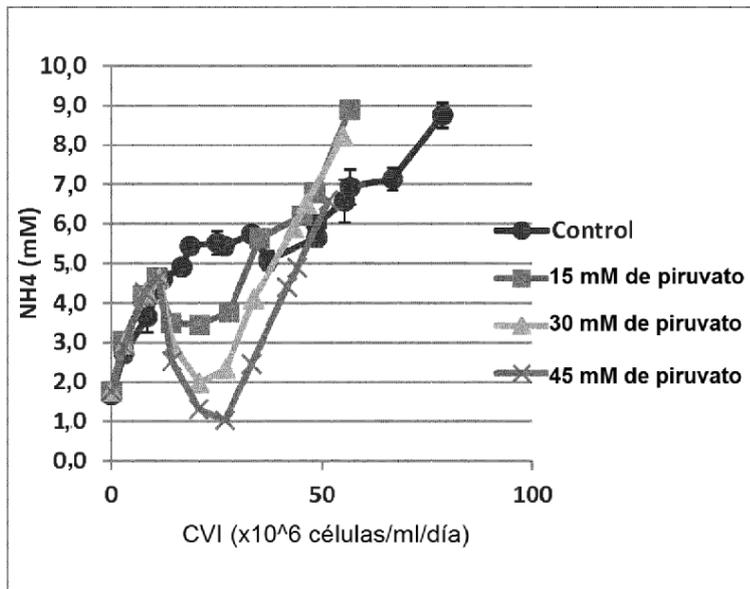


Figura 13c

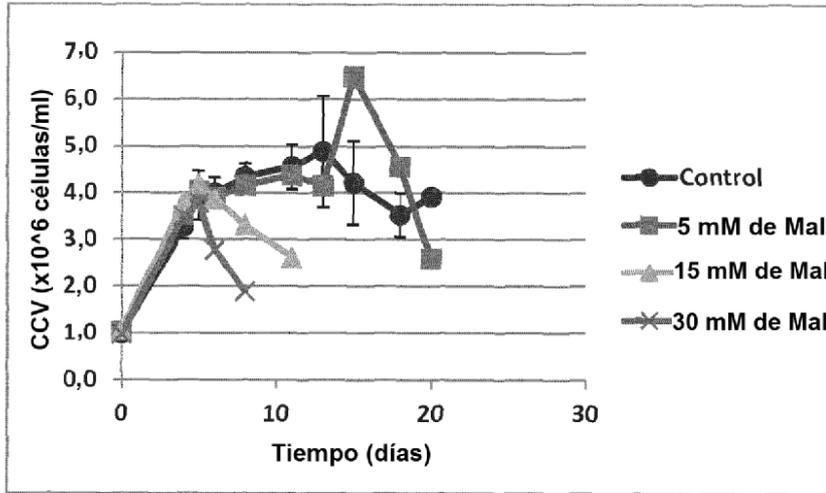


Figura 14a

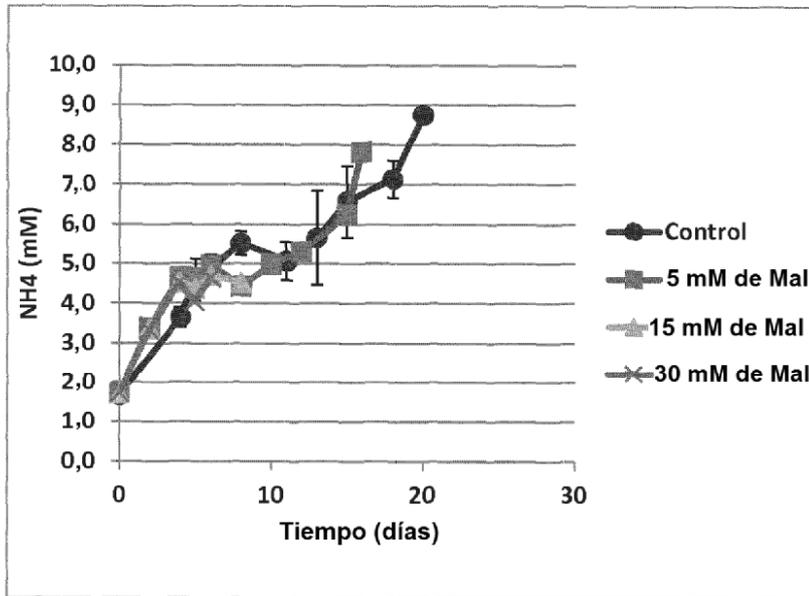


Figura 14b

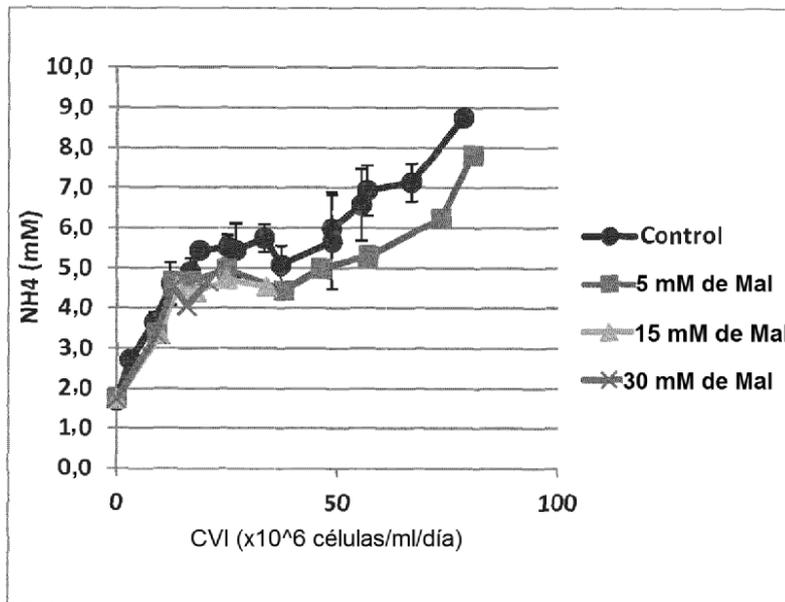


Figura 14c

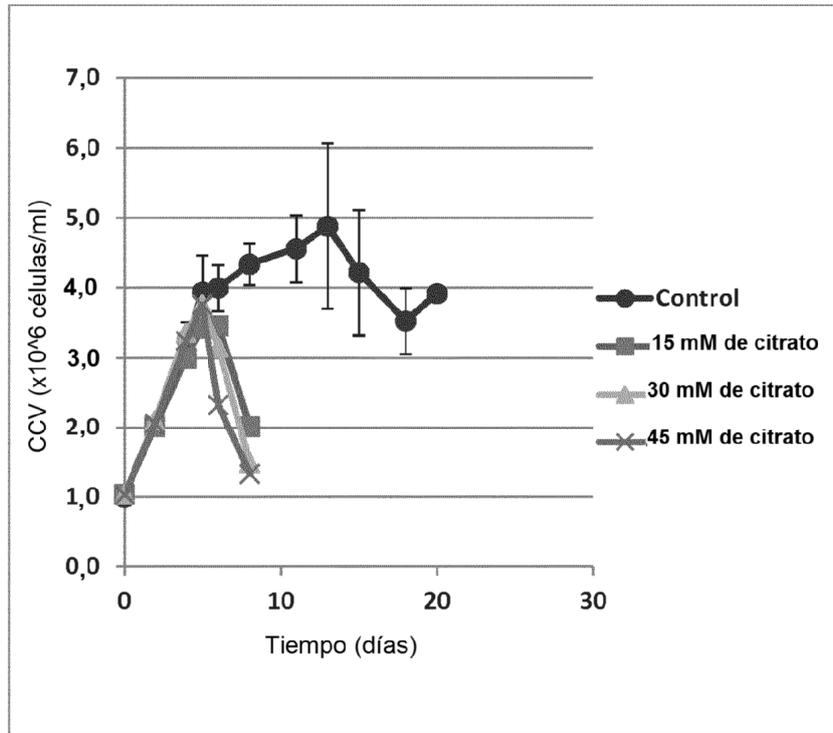


Figura 15

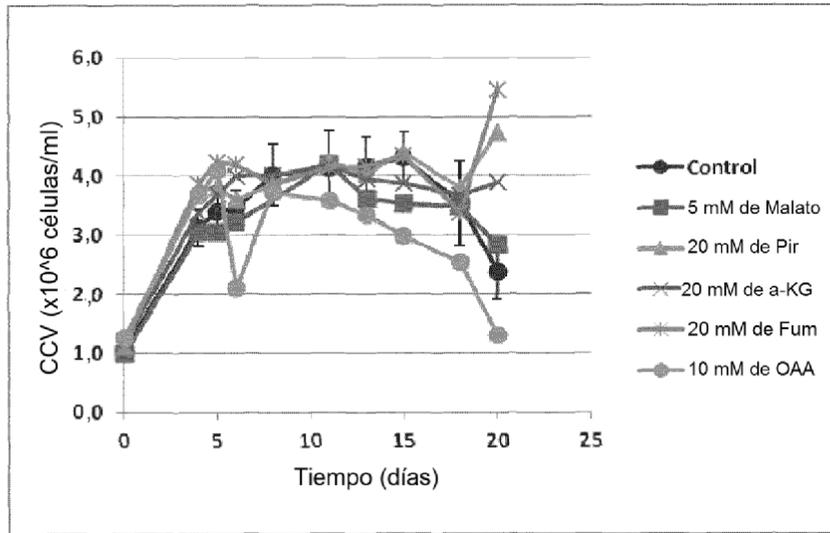


Figura 16a

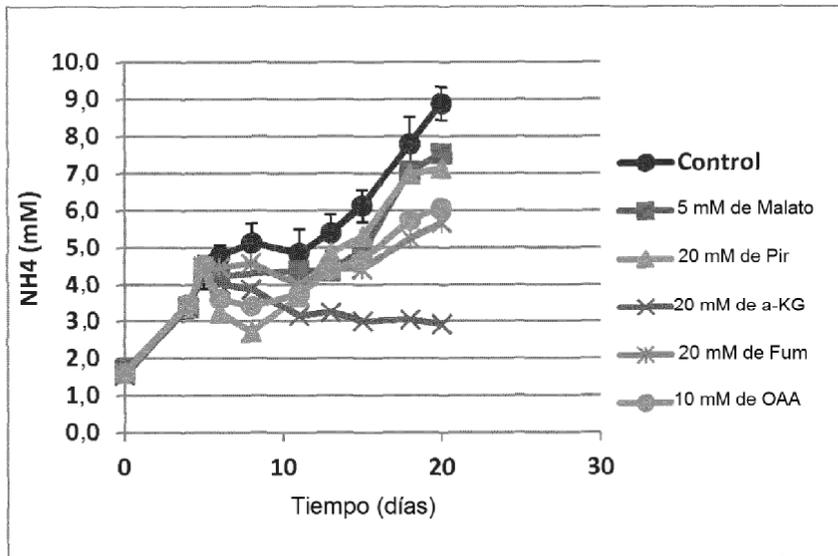


Figura 16b

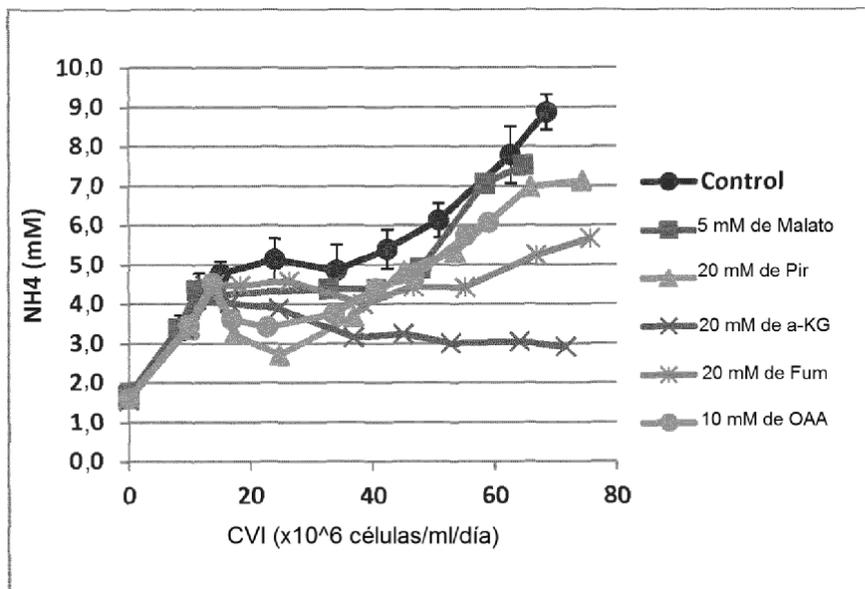


Figura 16c

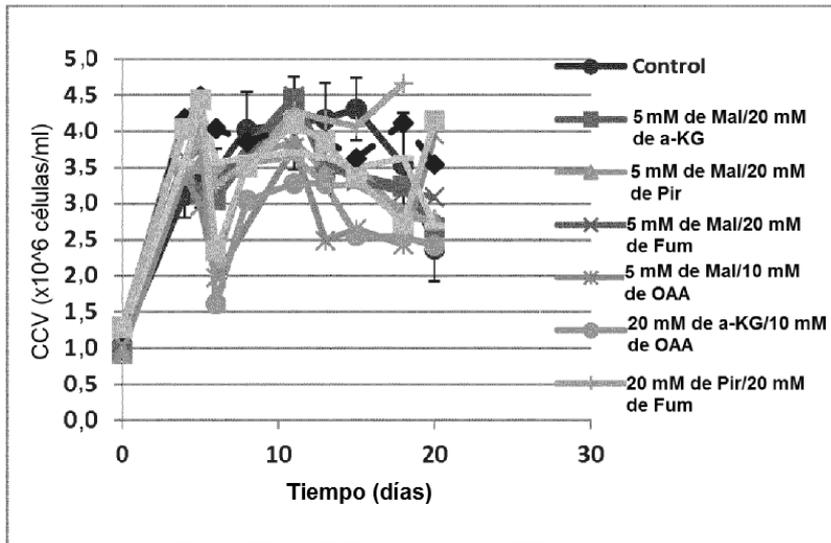


Figura 17a

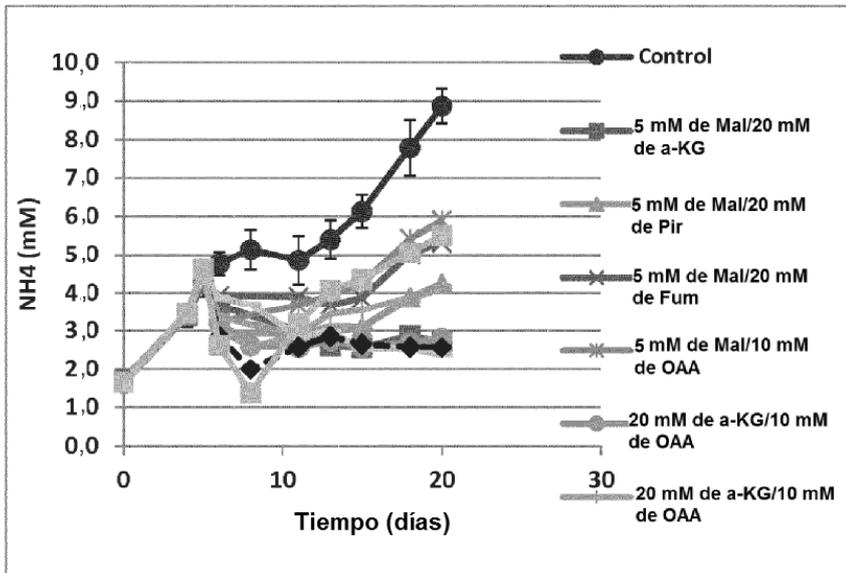


Figura 17b

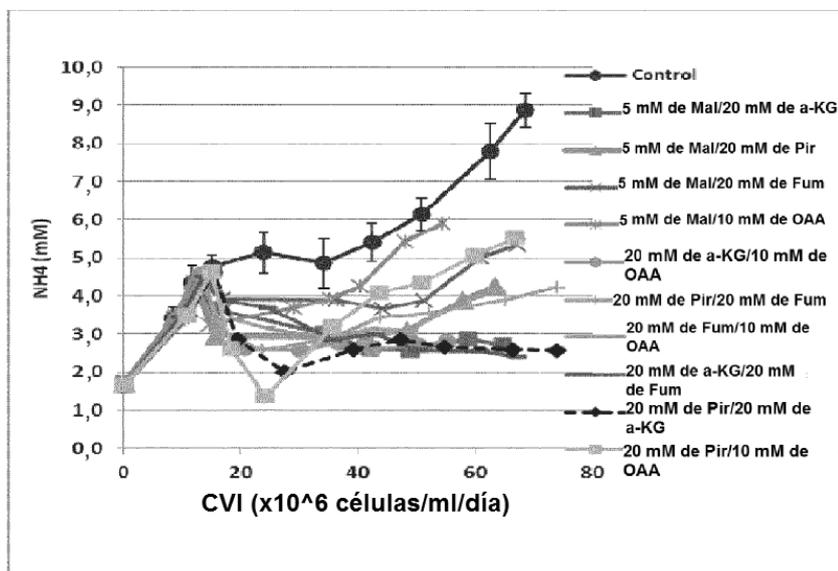


Figura 17c

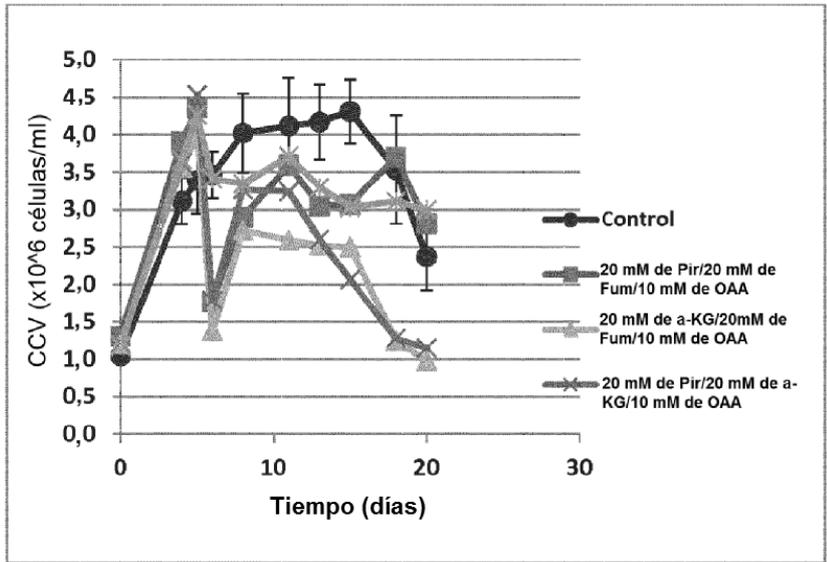


Figura 18a

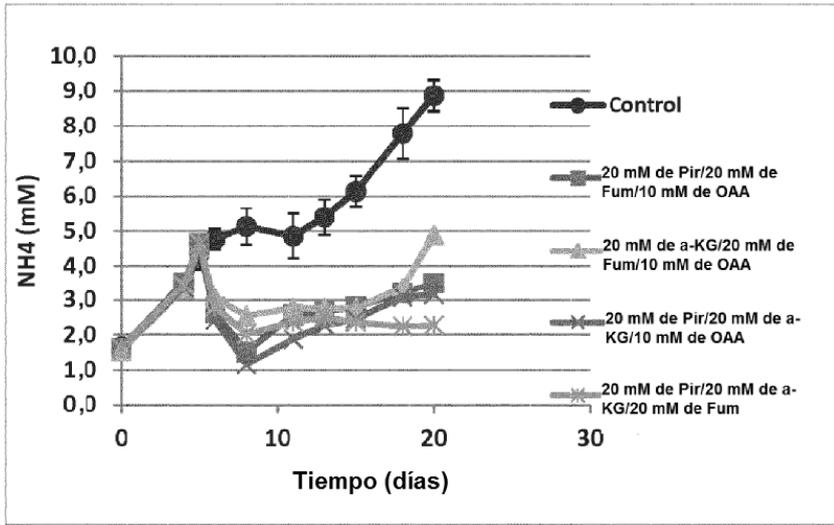


Figura 18b

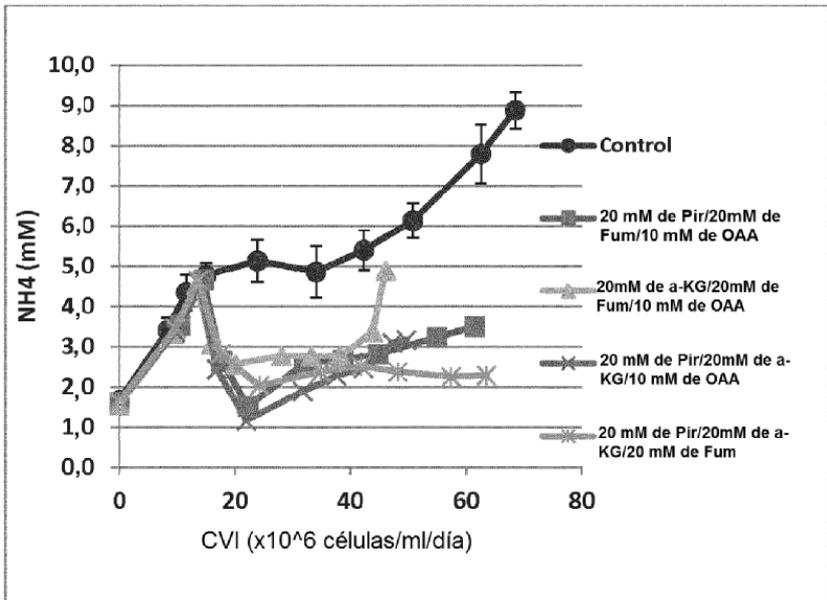


Figura 18c

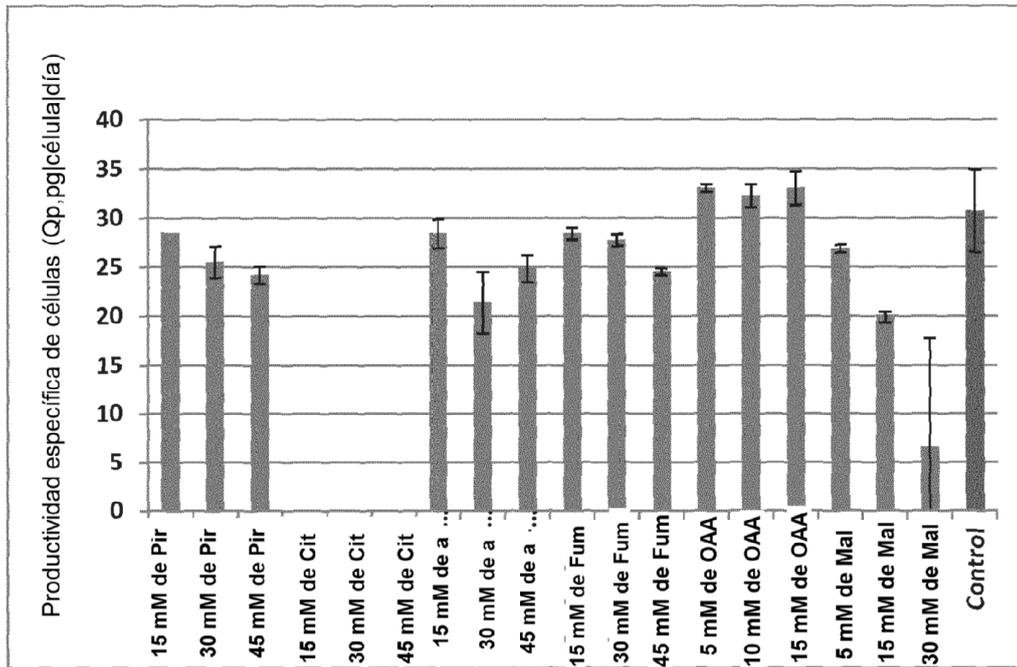


Figura 19

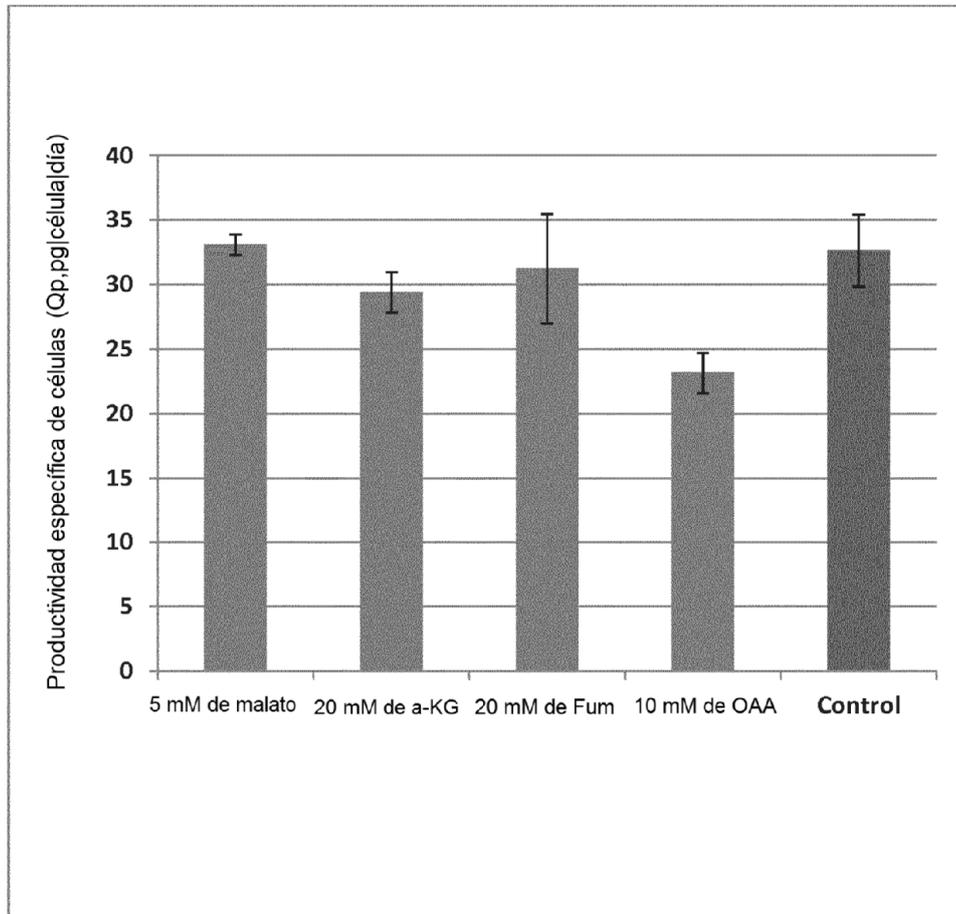


Figura 20

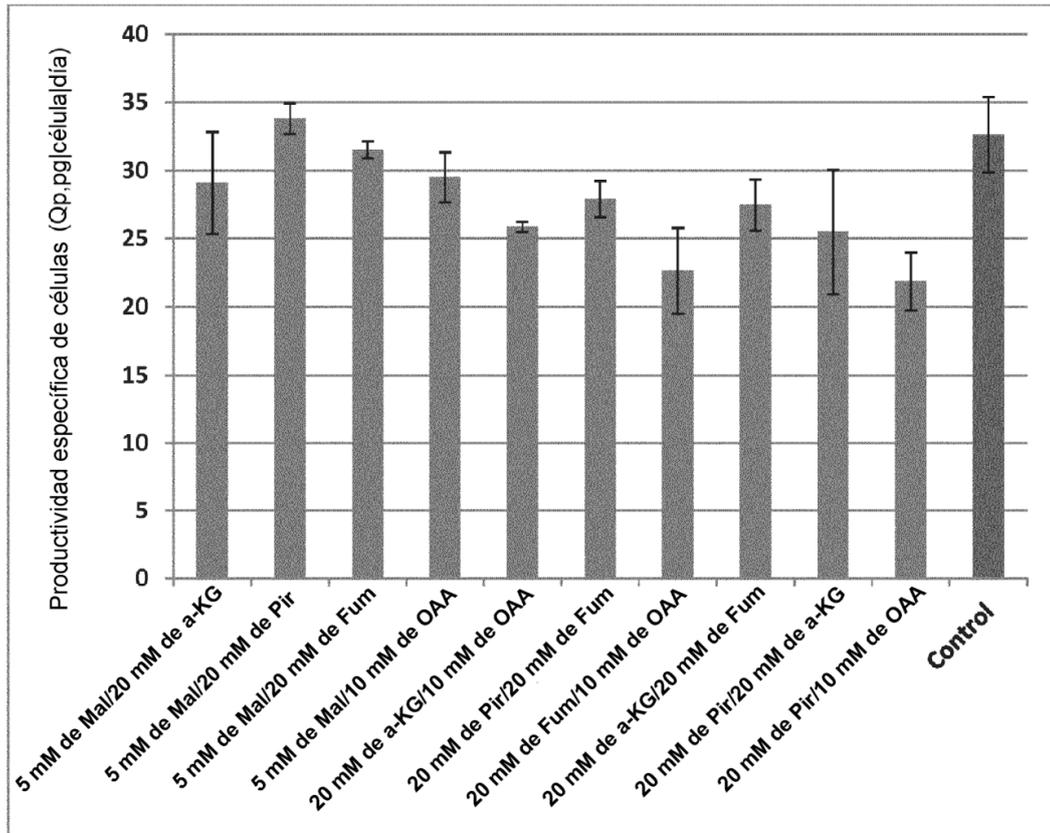


Figura 21

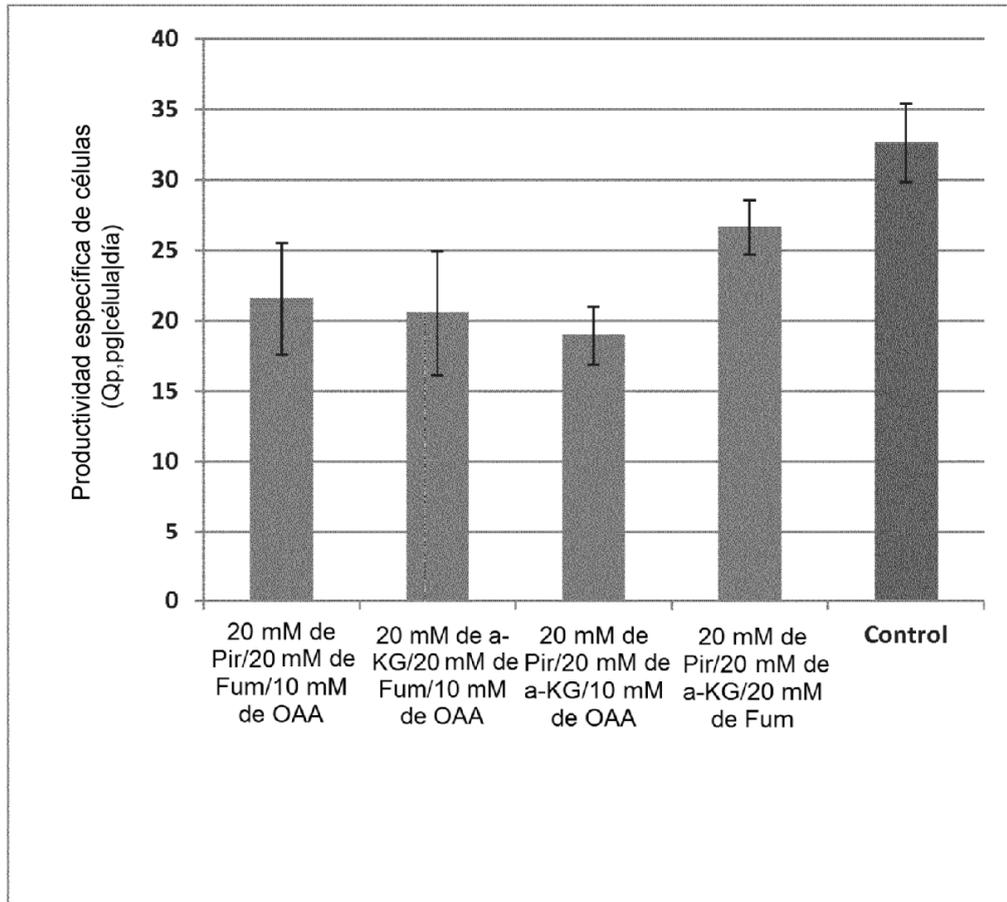


Figura 22