

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 945**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/02** (2006.01)

**C12N 5/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2014 PCT/US2014/059993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15054554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014 E 14851841 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 3055409**

54 Título: **Cultivos celulares optimizados metabólicamente**

30 Prioridad:

**11.10.2013 US 201361889815 P**

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

**21.08.2018**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
(100.0%)  
777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**LAWRENCE, SHAWN;  
KIM, ANN y  
JOHNSON, AMY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 678 945 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

Cultivos celulares optimizados metabólicamente

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a células que se cambian metabólicamente hacia el consumo de lactato en cultivo de células. Un cambio hacia un perfil metabólico de consumo de lactato en un cultivo de tren de siembra tiene efectos beneficiosos en la producción del cultivo. Después de la inoculación del reactor de producción, las células exhiben un metabolismo del lactato más eficiente con una baja tasa de producción de lactato, bajos niveles pico de lactato, un cambio precoz hacia el consumo de lactato, y posteriormente un aumento en la productividad del cultivo discontinuo de células de mamíferos. Por lo tanto, se proporciona un método mejorado para la producción a gran escala de proteínas y/o polipéptidos en cultivo celulares.

## 15 Antecedentes de la invención

Los agentes biológicos, particularmente las proteínas y los polipéptidos, se desarrollan más frecuentemente como productos farmacéuticos novedosos. Las células modificadas genéticamente que producen niveles inusualmente altos de la proteína de interés particular han llegado a ser críticamente importantes para la producción comercial exitosa de estas intervenciones farmacéuticas. El control y la optimización de las condiciones de los cultivos celulares varían y tienen gran efecto en el nivel y la calidad de los productos terapéuticos proteicos producidos en cultivo.

Es usual producir proteínas a través de cultivos celulares en un proceso de cultivo por lote o por lote alimentado. Las etapas tempranas de crecimiento del inóculo después de la descongelación del recipiente incluyen el cultivo de las células en un cultivo de siembra. Típicamente, las células se cultivan a una tasa de crecimiento exponencial, tal como en los biorreactores de tren de siembra, para aumentar progresivamente el tamaño y/o el volumen de la población celular. Después que se aumenta la masa celular a través de varias etapas del biorreactor, las células se transfieren entonces a un biorreactor de producción mientras que las células se encuentran aún en crecimiento exponencial (fase logarítmica) (Gambhir, A. y otros, 2003, J Bioscience Bioeng 95(4):317-327). Generalmente se considera poco conveniente permitir que las células en el cultivo por lote, por ejemplo, cultivo de siembra, pasen de la fase logarítmica a la fase estacionaria. Se ha recomendado que los cultivos deben someterse a pases mientras estén en la fase logarítmica, antes de que las células, por ejemplo, las células adherentes, alcancen la confluencia debido a la inhibición por contacto o a que la acumulación de productos de desecho inhiba el crecimiento celular, entre otras razones (Cell Culture Basics, Gibco/Invitrogen Online Handbook, www.invitrogen.com; ATCC® Animal Cell Culture Guide, www.atcc.org).

Después de la transferencia a un cultivo por lote alimentado, las células se cultivan durante un período de tiempo mientras que la composición del medio se supervisa y controla para permitir la producción de la proteína o el polipéptido de interés. Después que se alcanza un rendimiento o viabilidad celular particular, la acumulación de desechos o el agotamiento de nutrientes determinan que el cultivo debería terminarse, y se aísla la proteína o el polipéptido de interés. En la década pasada se hicieron avances significativos con la intención de mejorar la producción de proteínas recombinantes, que actualmente alcanza títulos de múltiples gramos por litro. Los avances en los procesos de producción de proteínas, así como también en las líneas celulares modificadas genéticamente, los medios de cultivos celulares y los sistemas de alimentación, contribuyeron a la ganancia en el rendimiento de proteínas.

La producción por lote alimentado implica la adición de pequeños volúmenes de alimentos para complementar los nutrientes presentes en el biorreactor en la medida que las células crecen y progresa la producción del producto. Se entiende que, en general, las células de mamíferos tienden a metabolizar los carbohidratos continuamente, lo que resulta en una acumulación de lactato que, por lo tanto, requiere la adición de bases para neutralizar el ácido láctico. La adición de bases aumenta la osmolalidad en el medio celular que a su vez restringe en gran medida la viabilidad celular y/o la productividad factible en el biorreactor. La acumulación de lactato en el medio es perjudicial para el crecimiento celular y es uno de los factores comunes que limitan la productividad máxima que puede lograrse en el cultivo por lote. En un cultivo celular por lote típico, el crecimiento y la productividad se inhiben después de que la concentración de lactato en el cultivo alcanza aproximadamente 30-50 mM y/o la concentración de amonio alcanza 3-5 mM (Ozturk, S.S., Riley, M.R., y Palsson, B.O. 1992. Biotechnol. and Bioeng. 39: 418-431). Hasta la fecha, los esquemas ampliamente adoptados incluyen complementar los nutrientes y el diseño de medios libres de suero definidos químicamente para sustentar el crecimiento continuo de las células y la secreción óptima del producto.

Los esfuerzos relacionados particularmente con la reducción de la salida de productos de desechos metabólicos, tales como la acumulación de lactato, en cultivos celular han mejorado la cantidad global de los títulos de proteínas finales. Estos esfuerzos se enfocan en los procesos por lotes alimentados limitados en nutrientes o con glucosa controlada (ver por ejemplo, los documentos WO2004104186; US8192951B2), la mejora de las condiciones de los medios de cultivos celulares (por ejemplo los documentos US7390660; Zagari, y otros, 2013, New Biotechnol., 30(2):238-45), o la modificación genética de las células, que incluye el direccionamiento hacia las enzimas de la vía

de la glicólisis (por ejemplo, Kim, S.H. y Lee, G.M., 2007, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 152-159; Kim, S.H. y Lee, G.M., 2007, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 659-665; Wlaschin, K.F. y Hu, W-S., 2007, J. Biotechnol. 131,168-176).

La alimentación controlada de las células se usa en un intento para alcanzar un fenotipo metabólico más eficiente (Europa, A. F., y otros, 2000, Biotechnol. Bioeng. 67:25-34; Cruz y otros, 1999, Biotechnol Bioeng, 66(2):104-113; Zhou y otros, 1997, Cytotechnology 24, 99-108; Xie y Wang, 1994, Biotechnol Bioeng, 43:1174-89). Sin embargo, esto es complicado por el hecho de que la carencia de nutrientes, así como también los cambios rápidos en, por ejemplo, la concentración de amonio observados en el cultivo por lote alimentado de alta densidad celular pueden inducir la apoptosis ("muerte celular programada") (Newland y otros, 1994, Biotechnol. Bioeng. 43(5):434-8). Por lo tanto, un enfoque común de optimización es cultivar células hasta una densidad moderadamente alta en un cultivo por lote alimentado y después inducir intencionalmente una fase estacionaria productiva, prolongada mediante, por ejemplo, un cambio de temperatura o pH (Quek y otros, 2010, Metab Eng 12(2):161-71. doi: 10.1016/j.ymben.2009.09.002. Epub 2009 Oct 13).

Las técnicas de optimización, tales como las discutidas más arriba, se han enfocado en los cultivos celulares por lote alimentado y este proceso dependiente de nutrientes debe adaptarse para cada célula huésped modificada genéticamente para la producción de un polipéptido de interés. Los métodos para adaptar las células al consumo de lactato en los cultivos son altamente convenientes en el proceso de producción de productos terapéuticos biológicos. Optimizar una línea celular con un fenotipo metabólico para el consumo de lactato resultaría beneficioso para la producción comercial de polipéptidos. Mulukutla B.C. y otros describen un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en un cultivo por lote alimentado de células de mamíferos. (2011, Metab Eng., 14(2):138-49). Zagari F. y otros describen el cambio del metabolismo de lactato en cultivo de células CHO y el papel de la actividad oxidativa mitocondrial (2013, N Biotechnol., 30(2):238-45). Young D.J. describe la reprogramación del flujo metabólico en los cultivos de células de mamíferos (2013, Curr Opin Biotechnol., 24(6):1108-1115). Zhou W. y otros describen el cultivo por lote alimentado de células recombinantes de mieloma NS0 con alta producción de anticuerpos monoclonales (1997, Biotechnol Bioeng., 55(5):783-92). Li F. y otros describen los procesos de cultivos celulares para la producción de anticuerpos monoclonales (2010, MAbs., 2(5):466-79). Le H. y otros describen el análisis multivariado de los datos del proceso biológico de los cultivos celulares y el consumo de lactato como indicador del proceso (2012, J Biotechnol. 162(2-3):210-23). El documento US8470552 B2 describe una estrategia para reducir la producción de ácido láctico y controlar el PH en cultivo de células animales. Sheikholeslami Z. y otros describen el impacto del momento de la inducción sobre el metabolismo y la productividad de las células CHO en cultivo (2013, Biochem Eng J., 79:162-171). Ma N. y otros describen una única alimentación de nutrientes que apoya los procesos por lote alimentados tanto de NS0 como de CHO definidos químicamente: Improved productivity and lactate metabolism (2009, Biotechnol Prog. 25(5):1353-63).

### Resumen de la invención

La invención proporciona un método para cultivar células que comprende:

- (a) cultivar las células en un primer cultivo celular,
- (b) determinar que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en el primer cultivo celular, y
- (c) transferir las células a un segundo cultivo celular después que se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células,

en donde la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato.

La invención proporciona, además, el método de la invención, en donde las células se transfectan con el ADN que codifica un polipéptido de interés antes de cultivar las células en un primer cultivo celular, y que comprende mantener el segundo cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés, y cosechar el polipéptido de interés a partir del segundo cultivo celular.

La descripción proporciona las células y los métodos para cultivar las células que cambiaron metabólicamente hacia el consumo de lactato. Las células adaptadas metabólicamente son ideales para la producción de proteínas a gran escala.

Un aspecto de la invención es un método para cultivar las células que comprende transferir las células de un primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para cultivar células que comprende, cultivar las células en un primer cultivo celular, determinar que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular, y transferir las células a un segundo cultivo celular después que se produjo en las células el cambio metabólico hacia el consumo de lactato, en donde la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato durante el segundo cultivo. En una modalidad, el método proporciona, además, una disminución en la acumulación de lactato en el segundo cultivo celular en comparación con la que se determinó en un cultivo celular de otra manera idéntico en condiciones de otra manera idénticas excepto porque la

transferencia de las células al segundo cultivo celular se hizo antes de que se produjera un cambio metabólico en el primer cultivo celular.

5 Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para producir una proteína que comprende transferir las células desde un primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células, y mantener el segundo cultivo celular durante un período de tiempo de manera que la proteína se acumule en el cultivo celular. En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para producir una proteína que comprende cultivar las células en un primer cultivo celular, determinar que en las células se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en el primer cultivo celular, transferir las células a un segundo cultivo celular después que se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células, y mantener el segundo cultivo celular durante un período de tiempo de manera que la proteína se acumule en el cultivo celular. En una modalidad, el método proporciona, además, un aumento en la productividad en el segundo cultivo celular en comparación con la que se determinó en un cultivo celular de otra manera idéntico en condiciones de otra manera idénticas excepto porque la transferencia de las células al segundo cultivo celular se hizo antes de que se produjera un cambio metabólico en el primer cultivo celular.

20 Un tercer aspecto de la invención proporciona un método mejorado para cultivar células, en donde las células comprenden un gen que codifica un polipéptido de interés, que comprende las etapas de: cultivar las células en un primer cultivo celular, mantener el primer cultivo celular en condiciones que permitan la expansión de la masa celular, transferir las células a un segundo cultivo celular después que se produce el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células, mantener el segundo cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés, y cosechar el polipéptido de interés a partir del segundo cultivo celular. En una modalidad, el método comprende, además, determinar que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular.

25 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método mejorado para producir un polipéptido en un cultivo celular que comprende las etapas de: transfectar las células con el ADN que codifica un polipéptido de interés, cultivar las células en un primer cultivo celular, transferir las células a un segundo cultivo celular después que se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células, en donde el polipéptido de interés se expresa en las condiciones de un segundo cultivo celular, y mantener el segundo cultivo celular durante un período de tiempo de manera que el polipéptido de interés se acumule en el cultivo celular. En una modalidad, el método comprende, además, determinar que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células en el primer cultivo celular.

30 Un quinto aspecto de la invención proporciona un método para producir una línea celular con cambios metabólicos, que comprende las etapas de: mantener una población celular en un primer cultivo celular en condiciones que permitan la expansión de la masa celular, determinar cuándo se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células, transferir una fracción de la población celular desde el primer cultivo celular a un segundo cultivo celular después que se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en las células, mantener la población celular en el segundo cultivo celular durante un período de tiempo, y opcionalmente cosechar las células y de esa manera producir la línea celular con cambios metabólicos.

45 Otro aspecto de la descripción proporciona una línea celular con cambios metabólicos producida mediante cualquiera de los métodos de la invención descritos en la presente descripción.

50 En algunas modalidades, la línea celular con cambios metabólicos producida mediante los métodos de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico integrada de manera estable en el genoma celular en donde la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido o una proteína de interés. En otras modalidades, la célula con cambios metabólicos producida mediante los métodos de la invención comprende un vector de expresión que codifica un polipéptido o proteína de interés.

55 En una modalidad, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta mediante las mediciones del pH, lactato o base en el primer cultivo celular. En otras modalidades, las células se transfieren a un segundo cultivo celular cuando se detecta el consumo de lactato. Aún en otras modalidades, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta después que el pH aumenta en el medio del primer cultivo celular sin la adición de base. En otras modalidades, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta cuando los niveles de lactato se estabilizan en el primer cultivo celular. Aún en otras modalidades, el método comprende, además, determinar el cambio metabólico que comprende: medir el pH en el primer cultivo celular, adicionar una base para mantener el pH por encima de un límite inferior predeterminado, determinar que el pH se encuentra por encima del límite inferior predeterminado durante intervalos consecutivos, y dejar de adicionar una base, lo que determina de esta manera que se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato en el primer cultivo celular.

60 En otras modalidades, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta mediante indicadores o productos del metabolismo celular, que incluyen pero no se limitan al consumo de oxígeno, y metabolitos tales como glicina, triptófano, fenilalanina, adenina, ácido palmítico, ácido glutámico, metionina y asparagina. En otra modalidad, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta mediante análisis metabólico o análisis proteómico.

En una modalidad, el cambio metabólico se produce cuando las células emergen de la fase logarítmica (es decir crecimiento exponencial) en el primer cultivo celular. En otra modalidad, las células se transfieren después que las células emergen de la fase logarítmica en el primer cultivo celular.

5 En otra modalidad, el cambio metabólico se produce cuando las células han alcanzado la fase estacionaria de crecimiento en el primer cultivo celular. En otra modalidad, las células se transfieren después que las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento en el primer cultivo celular.

10 En una modalidad, el cambio metabólico se produce en el primer cultivo celular en o después de 3 días de crecimiento celular en el primer cultivo celular. En otra modalidad, el cambio metabólico se produce en el primer cultivo celular en o después de 3,5 días de crecimiento celular en el primer cultivo celular.

15 En algunas modalidades, el primer cultivo celular es un cultivo de siembra. En algunas modalidades, el segundo cultivo celular es un cultivo por lote alimentado. En otras modalidades, el segundo cultivo celular es un cultivo de producción. En otras modalidades, el segundo cultivo celular se realiza en un biorreactor de producción.

20 Aún en otras modalidades, las células se transfieren al segundo cultivo celular a una densidad celular de partida mayor que, o igual a aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/mL. En algunas modalidades, las células se transfieren al segundo cultivo celular a una densidad celular de partida entre aproximadamente  $0,5-3,0 \times 10^6$  células/mL.

25 En algunas modalidades, la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato, por ejemplo, el consumo neto de lactato se alcanza en o después de 2 días, 3 días, 4 días o 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En más modalidades, la disminución en la acumulación de lactato es una reducción en la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la reducción en la concentración máxima de lactato se produce en el segundo cultivo celular en, o después de 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular es menor que aproximadamente 6 g/L, 5 g/L, 4 g/L, 3 g/L, 2 g/L, o menor que aproximadamente 1 g/L.

30 En algunas modalidades de la invención, la célula o células se seleccionan del grupo que consiste en CHO, COS, células de retina, Vero, CV1, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431, CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT, PER.C6, células linfoides murina, y células de hibridomas murino.

35 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Un recipiente de siembra de la línea celular CHO que produce proteínas de fusión se usó para inocular biorreactores de producción replicados en (Figura 1A) tres estados metabólicos diferentes (pH en línea y lactato fuera de línea) y recuentos de células viables (VCC). Se muestra, además, el uso de una base normalizado a 1 para el recipiente de siembra. Los parámetros (tiempo, pH, lactato, VCC y base) para cada cultivo celular (Condición #1, #2, y #3) por los que se transfirieron las células a los biorreactores de producción se indican mediante rectángulos abiertos (línea punteada). Todos los biorreactores de producción se ejecutaron con las mismas condiciones de operación. Se muestra el impacto de cada siembra en serie y su estado metabólico en el título de proteína (Figura 1B) y lactato (Figura 1C) en un biorreactor de producción. Las líneas de tendencia del biorreactor de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan  $\pm$  una desviación estándar.

50 Figura 2: Un recipiente de siembra de la línea celular CHO productora de anticuerpos se usó para inocular biorreactores de producción replicados en un proceso definido químicamente en (Figura 2A) cuatro estados metabólicos diferentes (pH y lactato fuera de línea) y recuentos de células viables (VCC). Los parámetros (tiempo, pH, lactato, y VCC) para cada cultivo celular (Condición #1, #2, #3 y #4) por los que se transfirieron las células a los biorreactores de producción se indican mediante rectángulos abiertos (línea punteada). Todos los biorreactores de producción se ejecutaron con las mismas condiciones de operación. La Condición #1 se perdió después de una semana. Se muestra, además, el impacto de cada tren de siembra y su estado metabólico en el título de proteína (Figura 2B) y en la acumulación de lactato (Figura 2C) en un biorreactor de producción. Las líneas de tendencia del biorreactor de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan  $\pm$  una desviación estándar.

60 Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritas, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

65 Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, y “el/la” incluyen

las referencias plurales a menos que el contexto establezca claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en la presente descripción y/o los que sean evidentes para los expertos en la técnica después de la lectura de esta descripción.

5 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica de la presente invención, ahora se describirán métodos y materiales particulares.

10 Cultivo celular

15 "Cultivo por lote" o "modo por lote", como se usa en la presente descripción, es una frase que se refiere a una unidad (por ejemplo un recipiente de cultivo) que está lleno de células y con un volumen de trabajo completo inicial de medio que nunca se intercambia. En tal cultivo por lote, todos los componentes para el cultivo celular se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del proceso de cultivo. Usualmente el cultivo se ejecuta hasta que los nutrientes se agotan o los productos de desechos alcanzan niveles tóxicos y las células detienen su crecimiento.

20 La frase "cultivo de siembra" o "tren de siembra" (referida además como tren de inoculación), como se usa en la presente descripción, incluye la fuente de inoculación de una población celular que se dejan expandir en el cultivo por lote, o en series de cultivos por lote, hasta que esté lista para la escala de producción. El proceso de expansión del tren de siembra constituye la fase de crecimiento inicial de las células, o fase de crecimiento del inóculo, después de una descongelación de las células congeladas. El intervalo entre la descongelación de las células y la acumulación de suficiente masa celular para inocular un biorreactor de producción constituye la fase de expansión del tren de siembra. La masa celular puede ampliarse a través de varias etapas del biorreactor en el cultivo de siembra, y las células se cultivan en el medio de cultivo celular en condiciones favorables para la supervivencia, el crecimiento y la viabilidad del cultivo celular. Se entenderá que el tren de siembra se destina a maximizar la fase de crecimiento exponencial, o alcanzar la tasa de crecimiento máxima para el tipo de célula particular que se cultiva. Por lo tanto, el pase de las células de un biorreactor o recipiente a otro puede ser una vía para lograr la tasa de crecimiento máxima. Las condiciones precisas variarán en dependencia del tipo de célula, el organismo del que se deriva la célula y la naturaleza y el carácter del polipéptido o proteína que se expresa. Un cambio en el metabolismo hacia el consumo de lactato puede producirse o detectarse en cualquiera de los recipientes de expansión del tren de siembra.

35 La frase "cultivo celular por lote alimentado" o "cultivo por lote alimentado" cuando se usa en la presente descripción se refiere a un cultivo por lote en donde las células animales y el medio de cultivo se suministran inicialmente al recipiente de cultivo y los nutrientes adicionales del cultivo se suministran lentamente, continuamente o en incrementos discretos, al cultivo durante el proceso de cultivo, con o sin cosecha periódica de células y/o productos antes de finalizar el cultivo. El cultivo por lote alimentado incluye el "cultivo por lote alimentado semicontinuo" en donde periódicamente el cultivo completo (que puede incluir las células y el medio) se elimina y se sustituye por medio fresco. El cultivo por lote alimentado se diferencia del "cultivo por lote" simple en que todos los componentes del cultivo celular (que incluyen las células animales y todos los nutrientes del cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al inicio del proceso de cultivo en un cultivo por lote. El cultivo por lote alimentado puede diferenciarse, además, del cultivo por perfusión en cuanto a que el sobrenadante no se elimina del recipiente de cultivo durante el proceso, mientras que en el cultivo por perfusión, las células se conservan en el cultivo mediante, por ejemplo, filtración, y el medio de cultivo se introduce y se elimina continuamente o de manera intermitente del recipiente de cultivo. Sin embargo, se contempla la eliminación de muestras con propósitos de prueba durante el cultivo celular por lote alimentado. El proceso por lote alimentado continúa hasta que se determina que se alcanzó el volumen de trabajo máximo y/o la producción de proteína.

50 La frase "cultivo celular continuo" cuando se usa en la presente descripción se refiere a una técnica que se usa para cultivar células continuamente, usualmente en una fase particular de crecimiento. Por ejemplo, si se requiere un suministro constante de células, o se requiere la producción de un polipéptido o proteína de interés particular, el cultivo celular puede requerir mantenimiento en una fase particular de crecimiento. Por lo tanto, las condiciones deben supervisarse y ajustarse continuamente en consecuencia para mantener las células en esa fase particular.

60 La frase "fase logarítmica", como se usa en la presente descripción significa un período de crecimiento celular típicamente caracterizado por la duplicación celular. Las frases "fase de crecimiento exponencial" o "fase exponencial" se usan indistintamente con la fase logarítmica. En la fase logarítmica, el número de células nuevas que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población celular presente, por lo tanto, representar gráficamente el logaritmo natural del número de células en función del tiempo produce una línea recta. Si el crecimiento no es limitado, la duplicación continuará a un ritmo constante, de modo que tanto el número de células como la tasa de crecimiento de la población se duplicarán con cada período de tiempo consecutivo.

65 La frase "fase estacionaria", como se usa en la presente descripción, se refiere al punto donde la tasa de crecimiento

celular es igual a la tasa de muerte celular. Cuando se representa en un gráfico, la fase estacionaria se representa como una meseta, o "llanura" en la parte lineal horizontal de la curva.

El término "célula" cuando se usa en la presente descripción incluye cualquier célula que es adecuada para la expresión de una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen aquellas de eucariotas, tales como células de animal no humano, células de mamíferos, células humanas, o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En determinadas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, hámster, rata, o ratón. En otras modalidades, la célula se selecciona a partir de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), células de retina, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmicas), CV-1, U937, 3T3, células L, células C127, SP2/0, NS-0, células MMT, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6®). En algunas modalidades, la célula es una célula CHO. En otras modalidades, la célula es una célula CHO K1.

Una "línea celular", como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula o células que se derivan de un linaje particular a través de pases en serie o subcultivos de células. El término "células" se usa indistintamente con "población celular".

Dado el estado de la técnica actual acerca de las estrategias de alimentación, las células CHO han alcanzado números celulares tal como  $11 \times 10^6$  células/mL (en el día 8) y títulos de, por ejemplo, 2,3 g/L de IgG humana (cosechada en el día 14), números que son valores industriales típicos para cultivos por lote alimentado de células CHO (Kim, BJ, y otros, *Biotechnol Bioeng.* 2012 Jan;109(1):137-45. doi: 10.1002/bit.23289. Epub 2011 Oct 3). Incluso se ha informado una producción de anticuerpos de más de 10 g/L a partir de células CHO que han sido bien establecidas como una línea de células de mamíferos industrial importante (Omasa y otros, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11: 233-240).

Los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" se refieren a una solución de nutrientes que se usa para el crecimiento de células de mamíferos que proporciona, típicamente, los nutrientes necesarios para potenciar el crecimiento de las células, tales como una fuente de energía de carbohidratos, aminoácidos esenciales, elementos traza, vitaminas, etcétera. El medio de cultivo celular puede contener extractos, por ejemplo, suero o peptonas (hidrolizados), que complementan la materia prima que sustenta el crecimiento celular. Los medios pueden contener extractos de soja o derivados de levadura, en lugar de extractos derivados de animales. El medio definido químicamente se refiere a un medio de cultivo celular en el que se conocen todos los componentes químicos. El medio definido químicamente es completamente libre de componentes derivados de animales, tales como suero o peptonas derivadas de animales.

Un aspecto de la invención se refiere a una fase de crecimiento en donde las condiciones de cultivo celular se modifican para potenciar el crecimiento de células eucariotas recombinantes. En la fase de crecimiento, a un recipiente de cultivo en lote se suministran un medio de cultivo basal y las células.

El recipiente de cultivo se inocula con las células. Una densidad de siembra adecuada para la fase de crecimiento celular inicial varía en dependencia de la línea celular de partida, por ejemplo, en el intervalo de 0,2 a  $3 \times 10^6$  células/mL. Los recipientes de cultivo incluyen, pero no se limitan a placas de pocillos, matraces T, matraces de agitación, recipientes agitados, matraces de agitación, biorreactores con elevación de aire, de fibra hueca, y similares. Un recipiente de cultivo celular adecuado es un biorreactor. Un biorreactor se refiere a cualquier recipiente de cultivo que se fabrica o diseña para manipular o controlar las condiciones ambientales. Tales recipientes de cultivo se conocen bien en la técnica.

Los procesos y sistemas de biorreactor se han desarrollado para optimizar el intercambio de gases, suministrar suficiente oxígeno para mantener el crecimiento y la productividad de las células, y eliminar el CO<sub>2</sub>. Mantener la eficiencia del intercambio de gases es un criterio importante para garantizar una ampliación exitosa del cultivo celular y la producción de proteínas. Tales sistemas se conocen bien por el experto en la técnica.

La fase de crecimiento exponencial o el cultivo de siembra (es decir el primer cultivo celular) típicamente es seguida por un segundo cultivo distinto, conocido como la fase de producción de polipéptidos. En una modalidad, las células que experimentan un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en un primer cultivo celular se transfieren a un segundo cultivo celular. En una modalidad, el segundo cultivo celular se realiza en un recipiente de cultivo diferente al de la fase de crecimiento celular o del cultivo de siembra. En algunas modalidades, el segundo cultivo celular tiene lugar en un biorreactor de producción. En este contexto, la transferencia de células se refiere a la extracción de una fracción de la población celular del primer recipiente de cultivo celular y la colocación de la fracción de la población celular en un segundo recipiente de cultivo celular para iniciar el segundo cultivo celular.

En otros aspectos, la transferencia de células puede referirse a que un volumen de células que contiene las células del primer cultivo celular se coloca en un recipiente diferente y el volumen del inóculo es una fracción del volumen

final del segundo cultivo celular, por ejemplo, aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, o 50 %, o 60 %, o 70 % u 80 % del volumen final. En otros aspectos, la transferencia de células puede referirse a un volumen de células que contiene las células del primer cultivo celular que permanecen en el recipiente inicial y se agrega medio de manera que el volumen inicial (primer cultivo celular) es una fracción del volumen final del segundo cultivo celular. En este contexto, el primer cultivo celular se diluye, de esa manera se transfieren las células a un segundo cultivo celular.

La frase "emergen de" o "emerge de" como se usa en la presente descripción, se refiere a un cambio de una fase a otra fase, o a punto de cambiar de una fase a otra fase. Emerger de una fase particular, por ejemplo, una fase de crecimiento, incluye el período de tiempo donde las mediciones indican que una primera fase disminuye su ritmo o casi termina, y que comienza la fase siguiente. Emerger de la fase logarítmica, por ejemplo, indica que las células se encuentran en la terminación de la fase logarítmica, y/o que comienzan o han alcanzado la fase estacionaria. Típicamente, las fases de crecimiento se miden mediante la concentración de células viables.

La frase "densidad celular" se refiere al número de células por volumen de muestra, por ejemplo, como el número total de células (viables y muertas) por mL. El número de células puede contarse manualmente o mediante automatización, tal como con un citómetro de flujo. Los contadores celulares automatizados se han adaptado para contar el número de células viables o muertas o ambas, viables/muertas, mediante el uso, por ejemplo, de una técnica estándar de absorción de azul tripán. La frase "densidad de células viables" o "concentración de células viables" se refiere al número de células viables por volumen de muestra (denominado además como "recuento de células viables"). Para determinar la densidad celular pueden usarse una serie de técnicas manuales o automatizadas bien conocidas. Las dimensiones de la biomasa en línea del cultivo pueden medirse, donde la capacitancia o la densidad óptica se correlaciona con el número de células por volumen.

La densidad celular final en un primer cultivo celular, tal como la densidad del tren de siembra, varía en dependencia de la línea celular de partida, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente  $1,0$  a  $10 \times 10^6$  células/mL. En algunas modalidades, la densidad final del tren de siembra alcanza  $1,0$  a  $10 \times 10^6$  células/mL antes de la transferencia de las células a un segundo cultivo celular. En otras modalidades, la densidad final del tren de siembra alcanza  $5,0$  a  $10 \times 10^6$  células/mL antes de la transferencia de las células a un segundo cultivo celular.

En algunas modalidades, una fracción de la población celular en el primer cultivo celular se transfiere al segundo cultivo celular. En otras modalidades, la población celular en el primer cultivo celular se transfiere al segundo cultivo celular de manera que el primer cultivo celular es una fracción del segundo cultivo celular. La densidad celular de partida del segundo cultivo puede elegirse por el experto en la técnica. En algunas modalidades, la densidad celular de partida en el segundo cultivo celular está entre aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/mL a aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células/mL. En otras modalidades, la densidad celular de partida en el segundo cultivo celular es aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, o  $3,0 \times 10^6$  células/mL.

En determinadas modalidades, el sobrenadante celular o lisado celular se cosecha después de la fase de producción. En otras modalidades, el polipéptido o proteína de interés se recupera del medio de cultivo o lisado celular, mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica.

Las propiedades de las células y la ubicación del producto producido dictan el método que se usa para el crecimiento y la producción, y en consecuencia la selección de un tipo adecuado de biorreactor o recipiente de cultivo. (Bleckwenn, NA y Shiloach, J. 2004 "Large-scale cell culture" Curr Protoc Immunol. 59: Appendix 1U.1-Appendix 1U.44.)

#### Cambio Metabólico

La frase "cambio metabólico" cuando se usa en la presente descripción se refiere a un cambio en el metabolismo celular, o al uso de fuentes de nutrientes de carbono, desde la producción de lactato hasta el consumo neto de lactato. Sin estar atado a ninguna teoría, las fuentes de nutrientes de carbono más comunes en los medios libres de suero son la glucosa y la glutamina, que sustentan el crecimiento celular rápido. La glucosa puede oxidarse completamente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , o, en base a la disponibilidad de oxígeno, convertirse en lactato, como en la glucólisis aeróbica. Las células de crecimiento rápido consumen glucosa y glutamina rápidamente, lo que provoca un metabolismo oxidativo incompleto y, por lo tanto, un exceso de producción de lactato. El metabolismo de los carbohidratos puede cambiar hacia el consumo de lactato, y por lo tanto, reducir la acumulación de lactato.

La frase "consumo de lactato" cuando se usa en la presente descripción se refiere al uso de lactato como una fuente de carbono en el metabolismo celular.

La frase "consumo neto de lactato" cuando se usa en la presente descripción se refiere al consumo de lactato mientras que las células simultáneamente consumen lactato y producen lactato como un subproducto del metabolismo celular, y la tasa general de consumo es mayor que, o igual a la tasa de producción de lactato. Cuando el consumo neto de lactato aumenta, la acumulación total de lactato en un medio de cultivo celular disminuye.



Al inicio de un cultivo por lote alimentado, la acumulación de lactato, y posiblemente amoníaco, provocan que la viabilidad de las células disminuya rápidamente. Se ha informado que en cultivos por lote alimentado que no cambian metabólicamente, ninguno podía alcanzar una viabilidad superior al 90 % cuando la concentración celular había alcanzado su máximo. (Xie y Wang, 1994, *Biotechnol. Bioeng.* 43(11):1175-1189). Tal método de cambio metabólico, aunque deseable para la realización de un proceso óptimo, no es ni genérico ni fácilmente controlable (Zagari, y otros, 2013, *New Biotechnol.* 30(2):238-245). Los inventores descubrieron que el tiempo y las condiciones para la transferencia de las células de un primer cultivo por lote (por ejemplo, un cultivo de siembra) a un segundo cultivo por lote (por ejemplo, un cultivo por lote alimentado o cultivo de producción) tienen un impacto significativo en los títulos de la proteína final. Se determinó inesperadamente que las células cultivadas durante un período de tiempo más largo en un primer cultivo por lote cambiarán hacia el consumo de lactato y conferirán una preferencia metabólica, o fenotipo metabólico, para el consumo de lactato. Es un objetivo de esta invención crear células en un estado con cambio metabólico constante, por lo tanto, células con una memoria metabólica para el consumo de lactato. El método de la invención es muy apropiado para el condicionamiento previo de las células en un estado con cambios metabólicos, de manera que las células puedan usarse en cualquier segundo o posterior cultivo celular donde se prefiera el consumo de lactato.

En una modalidad, la acumulación global de lactato disminuye en el segundo cultivo celular. En algunas modalidades, el consumo neto de lactato se alcanza durante el segundo cultivo celular, por ejemplo, el consumo neto de lactato se alcanza en, o después de 2 días, 3 días, 4 días o 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En más modalidades, la disminución en la acumulación de lactato es una reducción en la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la reducción en la concentración máxima de lactato se produce en el segundo cultivo celular en, o después de 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, la concentración máxima de lactato en el segundo cultivo celular es menor que aproximadamente 6 g/L, 5 g/L, 4 g/L, 3 g/L, 2 g/L, o menor que aproximadamente 1 g/L.

En algunas modalidades, las células con cambios metabólicos producen valores de concentración de lactato al menos 2 veces, o 3 veces, o 4 veces o 5 veces o hasta 10 veces menor en un segundo cultivo celular. En algunas modalidades adicionales, los valores de concentración de lactato inferiores en un segundo cultivo celular o la disminución de la acumulación global de lactato en el segundo cultivo celular se comparan con la que se determinó en un cultivo celular, de otra manera idéntico, en condiciones de otra manera idénticas excepto porque la transferencia de las células al segundo cultivo celular se hace antes de que se produzca un cambio metabólico en el primer cultivo celular. Aún en otras modalidades, la acumulación global de lactato disminuye en el segundo cultivo celular en, o después de 5 días de crecimiento celular en el segundo cultivo celular.

En otra modalidad, el título global del producto aumenta en el segundo cultivo celular. En otras modalidades, las células con cambios metabólicos producen títulos del producto al menos 2 veces, o 2,5 veces, 3 veces, o 4 veces, o 5 veces, o hasta 10 veces más altos en un segundo cultivo celular. Aún en otras modalidades, los valores de títulos de proteína más altos en un segundo cultivo celular se comparan con los que se determinó en un cultivo celular, de otra manera idéntico, en condiciones de otra manera idénticas excepto porque la transferencia de las células al segundo cultivo celular se hace antes de que se produzca un cambio metabólico en el primer cultivo celular.

La optimización del control metabólico de las células en cultivo antes de la etapa de por lote alimentado o de producción tiene muchas ventajas. El cambio metabólico hacia el consumo de lactato en un primer cultivo puede determinarse por múltiples parámetros. La determinación de un cambio metabólico comprende un número de métodos conocidos por los expertos en la técnica para determinar el estado metabólico de las células en crecimiento.

La medición de los valores de la concentración de lactato en un primer cultivo celular puede realizarse mediante una variedad de sistemas de ensayos biológicos y kit bien conocidos por el experto en la técnica, tales como los analizadores que usan electroquímica (por ejemplo, Bioprofile® Flex, Nova Biomedical, Waltham, MA), o espectroscopía Raman, y puede usarse para supervisión fuera de línea o en línea, de la acumulación de lactato en el cultivo celular.

Se entiende que la acumulación de lactato tiene un efecto perjudicial sobre el cultivo celular, y posteriormente tiene un efecto negativo sobre el rendimiento del producto proteico.

En una modalidad, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando la acumulación neta de lactato disminuye o cesa.

En una modalidad, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta mediante las mediciones de lactato en el primer cultivo celular. En algunas modalidades, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando se determina una meseta, o línea esencialmente horizontal, en un gráfico que representa la medición consecutiva de los valores de la concentración de lactato en el cultivo. En otras modalidades, el valor de la concentración de lactato permanece por debajo del límite de tolerancia superior para mediciones consecutivas. Aún

en otras modalidades, el límite de tolerancia superior para la concentración de lactato no es mayor que 4 g/L. Se entiende que los niveles de lactato se estabilizan cuando las células experimentan un consumo neto de lactato.

5 En otras modalidades, la determinación del cambio metabólico comprende medir lactato en el primer cultivo celular a intervalos, y determinar que el lactato está por debajo del límite superior predeterminado para intervalos consecutivos, de esta manera se determina que en las células se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato.

10 El manejo y el control del pH es un aspecto importante del mantenimiento de las células en un cultivo de biorreactor. El crecimiento de la mayoría de las células es óptimo dentro de límites estrechos del pH. Generalmente, el cultivo celular se mantiene a un pH neutro de 7,0, dentro de un rango de valores superiores e inferiores de los puntos establecidos. Los valores de los puntos establecidos los determina un experto en la técnica en dependencia de la línea celular particular en cultivo, la composición del medio y las condiciones óptimas para el crecimiento de esa célula. Como se usa en la presente descripción, la expresión "pH neutro" se refiere a un pH de aproximadamente 15 6,85 a aproximadamente 7,4. La expresión "pH neutro" incluye valores del pH de aproximadamente 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, y 7,4

La supervisión del pH y la adición de una base en línea, o "en tiempo real", puede realizarse mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos por el experto en la técnica. En un sistema en línea, las mediciones en tiempo real 20 de los parámetros biológicos y químicos en el cultivo celular, mediante conexión directa a un analizador, proporcionan la retroalimentación para realizar acciones adicionales, por ejemplo, agregar una base o agregar nutrientes al medio de cultivo. Además, pueden realizarse las mediciones fuera de línea, mientras se realiza el muestreo periódico y la intervención manual del operador. La medición continua del pH permite supervisar el medio celular y se añade una base, por ejemplo, si la acidez alcanza un valor inferior al punto establecido fuera de los 25 límites de tolerancia. Si el pH alcanza los límites superiores de tolerancia establecidos (es decir, se vuelve demasiado básico), puede añadirse CO<sub>2</sub>.

La supervisión en línea puede realizarse mediante una variedad de métodos. Los electrodos, tales como los 30 electrodos de flujo continuo, se usan comúnmente para medir el pH u otros parámetros como el O<sub>2</sub> disuelto (dO<sub>2</sub>) y la temperatura en el medio de cultivo celular. Tales electrodos de flujo continuo se conectan directamente a cualquier registrador de gráfico de banda estándar para el registro continuo o pueden interconectarse con cualquier medidor del pH o de milivoltios estándar de laboratorio. El pH puede medirse, además, por medio de una medición óptica con el uso de un punto de sensor fluorescente montado en el biorreactor.

35 Cualquier sistema de supervisión de este tipo integrará un límite de tolerancia (o banda muerta) alrededor de los valores superiores e inferiores establecidos. La banda muerta evita que el sistema de dosificación se encienda y se apague demasiado rápido. Durante el control del pH, no se realizará ninguna dosificación o titulación si la desviación del pH a partir del punto establecido se encuentra dentro de los límites de tolerancia. Si los valores de la medición del pH son mayores que el límite inferior de tolerancia (ácido), entonces se agregará una base líquida (por ejemplo, 40 KOH, NaOH, NaHCO<sub>3</sub> o NH<sub>3</sub> gaseoso. Si los valores de la medición del pH están por encima del límite superior de tolerancia (básico), se agregará un ácido o CO<sub>2</sub> gaseoso. El punto del pH establecido y la estrategia de control, por ejemplo, la banda muerta, se vinculan a múltiples parámetros tales como CO<sub>2</sub> disuelto, consumo de una base para el control del pH, y por lo tanto, la osmolalidad. (Ver por ejemplo, Li, F., y otros, 2010, mAbs 2(5):466-479.)

45 En una modalidad, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando se detiene la adición de una base (es decir, la titulación). La tendencia de la base incluye una tendencia en línea en donde puede usarse un método de supervisión automático para determinar el pH y la adición periódica de una base. En el presente método, los puntos establecidos del pH pueden variar, pero el aumento del pH fuera de la banda muerta inferior es indicativo de cambio metabólico en el primer cultivo celular. Los métodos en línea y manuales para medir la tendencia de la 50 base se conocen en la técnica, e incluyen métodos para supervisar el peso del recipiente, o la velocidad de flujo de la bomba para detectar la adición de base o la detención de la adición de base.

En otra modalidad, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo celular cuando la adición de una base ya no es necesaria para elevar el pH por encima del límite de tolerancia inferior. 55

En algunas modalidades, el cambio metabólico se determina en un primer cultivo cuando el valor del pH aumenta sin adición de una base. En otras modalidades, el valor del pH aumenta por encima del límite inferior de tolerancia durante mediciones consecutivas.

60 En otras modalidades, la determinación del cambio metabólico comprende: (a) calibrar un instrumento de detección del pH para detectar el nivel de ruido en el primer cultivo celular, (b) medir continuamente el pH en el primer cultivo celular a intervalos regulares, (c) adicionar una base según sea necesario para mantener el pH por encima de un límite inferior predeterminado; (d) determinar que el pH se encuentra por encima del límite inferior predeterminado durante varios intervalos consecutivos, y (e) dejar de adicionar una base para determinar, de esta manera, que en 65 las células se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato.

En una modalidad, el límite inferior de tolerancia es un pH de aproximadamente 6,5, 6,55, 6,6, 6,65, 6,7, 6,75, 6,8, 6,85, 6,9, 6,95, 7,0, 7,05 o aproximadamente 7,1.

5 En algunas modalidades, el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta mediante indicadores o productos del metabolismo celular en el primer cultivo celular. Uno de tales indicadores del metabolismo celular es el consumo de oxígeno (Zagari, y otros, 2013, *New Biotechnol.* 30(2):238-245). Puede usarse una medida precisa de la tasa de depleción de oxígeno en el medio de cultivo celular para determinar la presencia de células viables en el cultivo después de la inoculación, así como también, la tasa de crecimiento de las células en cultivo (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,165,741 y la patente de Estados Unidos núm. 7,575,890). La medición del consumo de oxígeno es bien conocida en la técnica.

15 Otros indicadores del metabolismo celular, como enzimas y metabolitos, pueden medirse mediante técnicas proteómicas o metabolómicas, tales como arreglos inmunológicos, resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas. Los metabolitos, tales como glicina, triptófano, fenilalanina, adenina, ácido palmítico, ácido glutámico, metionina y asparagina se han correlacionado con un aumento de la biomasa celular (ver, por ejemplo, Jain, M., y otros, *Science*. 2012 May 25; 336(6084): 1040-1044. doi:10.1126/science.1218595; y De la Luz-Hdez, K., 2012, *Metabolomics and Mammalian Cell Culture*, *Metabolomics*, Dr Ute Roessner (Ed.), ISBN: 978-953-51-0046-1, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/metabolomics/metabolomics-and-mammalian-cell-cultures>). Para determinar que se produjo un cambio metabólico pueden usarse cualquier cantidad de cambios moleculares que coincidan con, o que conduzcan directamente al cambio metabólico en el primer cultivo celular.

#### Producción de Proteínas

25 Los métodos de la invención producen una proteína o polipéptido de interés en un cultivo celular. Para facilitar la producción de proteínas en los métodos de la invención, las células se modifican genéticamente para expresar de manera recombinante el polipéptido o proteína de interés.

30 Las células se transfieren a un segundo cultivo celular, por ejemplo un cultivo de producción, después que en las células se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato, y se mantendrán en el segundo cultivo celular durante un período de tiempo de manera que el polipéptido o proteína se acumule en el cultivo celular.

35 Como se usa en la presente descripción, un "polipéptido" es una cadena de polímero lineal única de aminoácidos que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de los residuos de aminoácidos adyacentes. El término "proteína" puede usarse, además, para describir un polipéptido grande, tal como una proteína de siete dominios que se extiende a través de la membrana, con una estructura espacial o plegada particular. Como tal, el término "proteína" se destina a incluir estructuras cuaternarias, estructuras ternarias y otras macromoléculas complejas compuestas por al menos un polipéptido. Si la proteína comprende más de un polipéptido que se asocian físicamente entre sí, entonces el término "proteína", como se usa en la presente descripción, se refiere a los polipéptidos múltiples que se acoplan físicamente y funcionan juntos como la unidad discreta. El término "proteína" incluye polipéptido.

45 Los ejemplos de polipéptidos y proteínas producidos por los métodos de la invención incluyen anticuerpos, proteínas de fusión, proteínas de fusión Fc, receptores, proteínas de fusión Fc-receptor, y similares.

50 El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos pares de cadenas de polipéptidos, un par de cadenas ligeras (L) y un par de cadenas pesadas (H), que pueden interconectarse las cuatro mediante enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado bien. Ver por ejemplo, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2a ed. Raven Press, Nueva York (1989)). Brevemente, cada cadena pesada típicamente, comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente descripción como  $V_H$  o  $VH$ ) y una región constante de la cadena pesada ( $C_H$ ). La región constante de la cadena pesada típicamente comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$ . Los dominios  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$  se unen mediante una bisagra. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como  $V_L$  o  $VL$ ) y una región constante de la cadena ligera. En los humanos, y otros mamíferos hay dos tipos de cadenas ligeras: cadena kappa ( $\kappa$ ) y cadena lambda ( $\lambda$ ). La región constante de la cadena ligera típicamente comprende un dominio ( $C_L$ ). Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o formas de lazos definidos estructuralmente), denominados, además, regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, ordenados desde el amino terminal (N-terminal) hasta el carboxilo terminal (C-terminal) en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver además Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Típicamente, la numeración de los residuos de aminoácidos en esta región es de acuerdo con IMGT, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), o por el sistema de numeración de la UE de Kabat (conocido, además, como "numeración de la UE" o "índice de la UE"), por ejemplo, como en Kabat, E.A. y otros *Sequences of Proteins of*

Immunological interest. 5ta ed. US Department of Health and Human Services, NIH publicación Núm. 91-3242 (1991).

El término "Fc" se refiere a una porción de una región constante de la cadena pesada que comprende al menos los dominios CH2 y CH3 que se unen típicamente a un receptor de Fc por ejemplo, un FcγR, particularmente FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) o un FcRn, es decir, un receptor Fc neonatal. Se entiende que una proteína de fusión Fc puede contener todo o parte de un dominio Fc natural o contener delecciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que lo hacen incapaz de unirse a cualquier receptor de Fc, en consecuencia hace que el dominio no sea funcional o "sin eficacia" en términos de su función biológica típica como se logra a través de un receptor de Fc.

El término "anticuerpo" (Ab) como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de esta, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno como se describe anteriormente en "inmunoglobulina". Además, un anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar (ver por ejemplo, Holliger, y otros, 1993, PNAS USA 90(14), 6444-8, para una descripción de los diacuerpos). Además, se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, es decir "fragmentos de unión a antígeno" o "proteínas de unión a antígeno". Al igual que con las moléculas de anticuerpo completo, las proteínas de unión a antígeno pueden ser monoespecíficas o multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas). Los ejemplos de moléculas o fragmentos de unión comprendidos dentro del término "anticuerpo" incluyen, pero no se limitan a (i) un Fab' o fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H</sub>1, o un anticuerpo monovalente como se describió en la publicación de patente internacional número WO2007059782; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en un dominio V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, 1989, Nature 341, 544-546), que consiste esencialmente en un dominio V<sub>H</sub> y además los llamados anticuerpos de dominio (Holt y otros, 2003, Trends Biotechnol. 21(11):484-90); (vi) camélido o nanocuerpos (Revetz y otros, 2005, Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en la presente descripción, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas in vitro mediante mutagénesis aleatoria o específica de un sitio, o durante los reordenamientos génicos o mediante mutación somática in vivo). El término "anticuerpo monoclonal murino o de ratón" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal murina o de ratón.

El término "proteína de fusión", como se usa en la presente descripción, incluye la proteína de fusión Fc y la proteína de fusión Fc-receptor. Una proteína de fusión puede ser cualquier polipéptido formado por la expresión de un gen quimérico obtenido mediante la combinación de más de una secuencia de ADN de diferentes orígenes, típicamente mediante la clonación de un gen en un vector de expresión en el marco con un segundo gen de manera que los dos genes codifican un polipéptido continuo.

En un aspecto, la invención proporciona un método descrito en la presente descripción para producir una proteína o polipéptido recombinante de interés. En algunas modalidades, la proteína o polipéptido recombinante de interés se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, proteína de unión a antígeno, proteína de fusión, proteína de fusión Fc y proteína de fusión Fc-receptor.

#### Sistemas de expresión celular

El uso de sistemas de expresión celular es un requisito previo para la producción elevada de tales polipéptidos o proteínas en el cultivo celular.

Un producto de acuerdo con la invención es un polipéptido, o una proteína, que se expresa en las células y se cosecha a partir del sistema de cultivo, es decir, las células y/o el medio celular. Este puede ser cualquier polipéptido o proteína de interés (más arriba).

Los vectores de expresión típicamente usan promotores génicos fuertes para conducir la transcripción del ARNm del producto. En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un vector de expresión que codifica un polipéptido, por

ejemplo, un anticuerpo, proteína de unión a antígeno o proteína de fusión, de interés. Tales vectores de expresión pueden usarse en los métodos de la invención para la producción recombinante de proteínas o polipéptidos de interés a través del cultivo celular.

- 5 Un vector de expresión en el contexto de los métodos de la invención puede ser cualquier vector adecuado, que incluye vectores cromosómicos, no cromosómicos, y de ácidos nucleicos sintéticos (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores de ácidos nucleicos virales (ARN o ADN).  
10 Tales vectores de ácidos nucleicos y el uso de estos se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, los documentos US 5,589,466 y US 5,973,972).

Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido o proteína de interés se proporciona dentro de la célula huésped, en donde la molécula de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de control de la expresión adecuada para la expresión en una célula huésped de mamífero.

15 Las secuencias control de la expresión se modifican genéticamente para controlar y conducir la transcripción de los genes que codifican los polipéptidos de interés, y la expresión posterior de proteínas o polipéptidos en diversos sistemas celulares. Los plásmidos combinan un gen expresable de interés con secuencias de control de la expresión (es decir, casetes de expresión) que comprenden elementos deseables tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, marcadores de selección, operadores, etcétera. En un vector de expresión las moléculas de ácido nucleico pueden comprender o asociarse con cualquier promotor, potenciador, marcador de selección, operador, proteína represora, secuencia de terminación poliA y otros elementos que facilitan la expresión.

25 "Promotor", como se usa en la presente descripción, indica una secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN a la que se une operativamente, es decir, se une de tal manera que controla la transcripción de la secuencia de nucleótidos. La expresión de una secuencia de nucleótidos puede estar bajo el control de cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica. Los ejemplos de tales elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano o promotor IE principal de CMV (CMV-MIE), así como también el promotor tardío de SV40, y los promotores de RSV, SL3-3, MMTV, ubiquitina (Ubi), ubiquitina C (UbC), y LTR de HIV).

30 En algunas modalidades, el vector comprende un promotor seleccionado del grupo que consiste en SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC y LTR de HIV.

35 Las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína o polipéptido de interés pueden unirse operativamente, además, a una secuencia de terminación de poli (A) eficaz, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección, y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos pueden comprender, además, un promotor inducible y regulable (que puede inducirse, reprimirse, regularse embriológicamente) en contraste con un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la técnica reconocerá que dichos términos son realmente descriptores de un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

45 Los marcadores de selección son elementos bien conocidos en la técnica. Bajo las condiciones selectivas, solo las células que expresan el marcador de selección apropiado pueden sobrevivir. Comúnmente, los genes de los marcadores de selección expresan proteínas, usualmente enzimas que confieren resistencia a diversos antibióticos en el cultivo celular. En otras condiciones selectivas, las células que expresan un marcador de una proteína fluorescente se hacen visibles, y por lo tanto pueden seleccionarse. Las modalidades incluyen beta-lactamasa (bla) (resistencia a antibióticos betalactámicos o gen de resistencia a la ampicilina o ampR), bls (gen de acetil transferasa resistente a blasticidina), bsd (gen de resistencia a blastidinas-desaminasa), bsr (gen de resistencia a blasticidina-S), Sh ble (gen de resistencia Zeocin®), higromicina fosfotransferasa (hpt) (gen de resistencia a higromicina), tetM (gen de resistencia a tetraciclina o tetR), neomicina fosfotransferasa II (npt) (gen de resistencia a neomicina o neoR), kanR (gen de resistencia a kanamicina), y pac (gen de resistencia a puromicina). Los marcadores seleccionables (o de selección) se usan típicamente en el desarrollo de líneas celulares estables.

55 En determinadas modalidades, el vector comprende uno o más genes de los marcadores de selección seleccionados del grupo que consiste en bla, bls, BSD, bsr, Sh ble, hpt, tetR, tetM, npt, kanR y pac. En algunas modalidades, el vector comprende uno o más genes de los marcadores de selección que codifican la proteína verde fluorescente (GFP), proteína verde fluorescente potenciada (eGFP), proteína ciano fluorescente (CFP), proteína ciano fluorescente potenciada (eCFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), o similares.

60 Para los propósitos de esta invención, la expresión génica en células eucariotas puede regularse rigurosamente mediante el uso de un promotor fuerte que se controla mediante un operador que a su vez se regula mediante una proteína de fusión reguladora (RFP). La RFP consiste esencialmente en un dominio bloqueador de la transcripción, y un dominio de unión al ligando que regula su actividad. Los ejemplos de tales sistemas de expresión se describen en el documento US20090162901A1.

Como se usa en la presente descripción, "operador" indica una secuencia de ADN que se introduce en un gen de interés o cerca de este, de manera tal que el gen puede regularse por la unión de la RFP al operador y, como un resultado, impide o permite la transcripción del gen de interés. Varios de los operadores en células procariotas y bacteriófagos han sido bien caracterizados (Neidhardt, ed. *Escherichia coli and Salmonella; Cellular and Molecular Biology 2d. Vol 2 ASM Press, Washington D.C. 1996*). Estos incluyen pero no se limitan a, la región del operador del gen LexA de *E. coli*, que se une al péptido LexA, y los operadores lactosa y triptófano, que se unen a proteínas represoras codificadas por los genes Lacl y trpR de *E. coli*. Estos incluyen, además, los operadores de bacteriófagos del fago lambda P<sub>R</sub> y los genes del fago P22 ant/mnt que se unen a las proteínas represoras codificadas por lambda cl y P22 arc. En algunas modalidades, cuando el dominio bloqueador de la transcripción de la RFP es una enzima de restricción, tal como NotI, el operador es la secuencia de reconocimiento de esa enzima. Un experto en la técnica reconocerá que el operador debe ubicarse adyacente, o en posición 3' al promotor de manera que sea capaz de controlar la transcripción mediante el promotor. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,972,650, especifica que las secuencias tetO se encontrarán a una distancia específica de la caja TATA.

En determinadas modalidades, el operador se selecciona del grupo que consiste en operador tet (tetO), secuencia de reconocimiento de NotI, operador de LexA, operador de lactosa, operador de triptófano y operador de Arc (AO). En algunas modalidades, la proteína represora se selecciona del grupo que consiste en TetR, LexA, Lacl, TrpR, Arc, LambdaC1 y GAL4. En otras modalidades, el dominio bloqueador de la transcripción se deriva de una proteína represora eucariota, por ejemplo un dominio represor derivado de GAL4.

En un sistema de expresión celular ilustrativo, las células se modifican genéticamente para expresar la proteína represora de la tetraciclina (TetR) y un polipéptido de interés se ubica bajo el control transcripcional de un promotor cuya actividad se regula por TetR. Dos operadores de TetR en tándem (tetO) se ubican inmediatamente corriente abajo de un promotor/potenciador de CMV-MIE en el vector. La transcripción del gen que codifica la proteína de interés dirigida por el promotor de CMV-MIE en tal vector puede bloquearse por TetR en ausencia de tetraciclina o algún otro inductor adecuado (por ejemplo doxiciclina). En presencia de un inductor, la proteína TetR no es capaz de unirse a tetO, por lo tanto se produce la transcripción y después la traducción (expresión) del polipéptido de interés. (Ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,435,553.

Tales sistemas de expresión celular pueden usarse para "activar" la producción del polipéptido de interés solamente durante el cultivo de producción. Por lo tanto, los antibióticos, tales como la tetraciclina u otros inductores adecuados, pueden añadirse al biorreactor para un primer cultivo celular.

Otro sistema de expresión celular ilustrativo incluye proteínas de fusión reguladoras tales como la proteína de fusión TetR-ER<sub>LBD</sub>T2, en la que el dominio bloqueador de la transcripción de la proteína de fusión es TetR y el dominio de unión al ligando es el dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos (ER<sub>LBD</sub>) con mutaciones T2 (ER<sub>LBD</sub>T2; Feil y otros, 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:752-757). Cuando las secuencias tetO se ubicaron corriente abajo y próximas al promotor fuerte de CMV-MIE, la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés a partir del promotor de CMV-MIE/tetO se bloqueó en presencia de tamoxifeno y se desbloqueó mediante la eliminación de tamoxifeno. En otro ejemplo, el uso de la proteína de fusión Arc2-ER<sub>LBD</sub>T2, una proteína de fusión que consiste en un dímero de cadena sencilla que consiste en dos proteínas Arc conectadas mediante un enlazador de 15 aminoácidos y ER<sub>LBD</sub>T2 (más arriba), implica un operador de Arc (AO), más específicamente dos operadores de arc en tándem inmediatamente corriente abajo del promotor/potenciador de CMV-MIE. Las líneas celulares pueden regularse mediante Arc2-ER<sub>LBD</sub>T2, en donde las células que expresan la proteína de interés se controlan por un promotor de CMV-MIE/ArcO2 y pueden inducirse mediante la eliminación del tamoxifeno. (Ver, por ejemplo, el documento US 20090162901A1.) En algunas modalidades, el vector comprende un promotor híbrido CMV-MIE/TetO o CMV-MIE/AO2.

Los vectores adecuados usados en los métodos de la invención pueden emplear, además, las herramientas Cre-lox para la tecnología de recombinación con el propósito de facilitar la replicación de un gen de interés. Una estrategia Cre-lox requiere al menos dos componentes: 1) la recombinasa Cre, una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios loxP; y 2) los sitios loxP (por ejemplo, una secuencia específica de 34 pares de bases (pb) que consiste en una secuencia núcleo de 8 pb, donde tiene lugar la recombinación, y dos repeticiones invertidas flanqueantes de 13 pb) o sitios loxP mutantes. (Ver, por ejemplo Araki y otros, 1995, *PNAS* 92:160-4; Nagy, A. y otros, 2000, *Genesis* 26:99-109; Araki y otros, 2002, *Nuc Acids Res* 30(19):e103; y el documento US20100291626A1. En otra estrategia de recombinación, la recombinasa FLP derivada de levadura puede usarse con la secuencia consenso FRT (ver además, por ejemplo Dymecki, S., 1996, *PNAS* 93(12): 6191-6196).

En otro aspecto, un gen (es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante de interés) se inserta en una secuencia potenciadora de la expresión del casete de expresión, y opcionalmente se une operativamente a un promotor, en donde el gen unido al promotor es flanqueado en 5' por un primer sitio de reconocimiento de recombinasas y en 3' por un segundo sitio de reconocimiento de recombinasas. Tales sitios de reconocimiento de recombinasas permiten la recombinación mediada por Cre en la célula huésped del sistema de expresión. En algunos casos, un segundo gen unido a un promotor se encuentra corriente abajo (3') del primer gen y es flanqueado en 3' por el segundo sitio de reconocimiento de recombinasas. Aún en otros casos, un segundo gen

5 unido a un promotor es flanqueado en 5' por el segundo sitio de recombinasas, y es flanqueado en 3' por un tercer sitio de reconocimiento de recombinasas. En algunas modalidades, los sitios de reconocimiento de recombinasas se seleccionan de un sitio loxP, un sitio lox511, un sitio lox2272, y un sitio FRT. En otras modalidades, los sitios de reconocimiento de recombinasas son diferentes. En una modalidad adicional, la célula huésped comprende un gen capaz de expresar una recombinasa Cre.

10 En otro aspecto, el vector comprende un primer gen que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o una cadena pesada de un anticuerpo de interés, y un segundo gen que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o una cadena pesada de un anticuerpo de interés.

15 Se entiende que uno o más vectores que portan una o más secuencias de ácido nucleico que codifican y expresan la proteína de interés pueden usarse en tales sistemas de expresión.

20 Además, las células de la descripción pueden modificarse genéticamente para aumentar la expresión del producto a través de la coexpresión de proteínas tales como chaperonas, inhibidores de apoptosis, inhibidores de la degradación de proteínas, u otras proteínas que pueden potenciar la expresión o la estabilidad del producto.

25 En algunos aspectos, el vector comprende, además, un gen de una proteína 1 de unión a caja X (mXBP1) y/o un gen EDEM2 capaces de potenciar la producción de proteínas/secreción de proteínas a través del control de la expresión de los genes implicados en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER). Ver, por ejemplo Ron D, y Walter P., 2007, Nat Rev Mol Cell Biol.8:519-529; Olivari y otros, 2005, J. Biol. Chem. 280(4): 2424-2428, Vembar y Brodsky, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9(12): 944-957, 2008).

30 El uso de células transfectadas transitoriamente que rápidamente producen cantidades significativas del producto puede realizarse, además, para la optimización de un proceso de cultivo celular, sin embargo, la transfección estable se utiliza típicamente para escalas de producción de gran volumen.

35 En el contexto de la presente descripción, la célula con cambios metabólicos puede contener cualquiera o todos los elementos de un sistema de expresión celular necesarios para la producción recombinante eficiente de una proteína de interés, como se describe en la presente descripción.

40 En un aspecto aún más amplio, la descripción se refiere a una célula huésped eucariota recombinante con cambios metabólicos que produce una proteína de interés. Los ejemplos de células huésped incluyen células de mamíferos, tales como CHO, PER.C6, células linfoides murinas, y líneas celulares de hibridomas murinos (más arriba). Por ejemplo, en un aspecto, la presente descripción proporciona una célula con cambios metabólicos que comprende una secuencia de ácido nucleico integrada de manera estable en el genoma celular, que comprende una secuencia que codifica una proteína de interés. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula con cambios metabólicos que comprende una secuencia de ácido nucleico no integrada (es decir, episomal), tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica una proteína de interés.

45 La "cosecha" o "cosecha celular" tiene lugar al final de un lote de producción en un proceso anterior. Las células se separan del medio mediante una serie de métodos tales como filtración, encapsulación celular, adherencia celular a microportadores, sedimentación celular o centrifugación. La purificación de proteínas tiene lugar en etapas adicionales para aislar el producto proteico. Los polipéptidos o proteínas pueden cosecharse a partir de las células o de los medios de cultivo celular.

50 Las estrategias de purificación de proteínas se conocen bien en la técnica. Las formas solubles del polipéptido, tales como anticuerpos, fragmentos de unión a anticuerpos y proteínas que contienen Fc, pueden someterse a filtros de concentración disponibles comercialmente, y posteriormente purificarse por afinidad mediante métodos bien conocidos, tales como resinas de afinidad, resinas de intercambio iónico, columnas de cromatografía, y similares. Las formas del polipéptido unidas a membrana pueden purificarse mediante la preparación de una fracción de membrana total a partir de la célula de expresión y mediante la extracción de las membranas con un detergente no iónico tal como TRITON® X-100 (EMD Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.). Las proteínas citosólicas o nucleares pueden prepararse mediante la lisis de las células huésped (a través de fuerza mecánica, sonicación, detergente, etcétera), la eliminación de la fracción de membranas celulares mediante centrifugación y la retención del sobrenadante.

55 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo, o proteína de unión a antígeno, o proteína de fusión de interés, dicho método comprende las etapas de a) cultivar células de acuerdo con el método, como se describe en la presente descripción anteriormente, b) cosechar las células, y c) purificar el polipéptido o proteína, tal como anticuerpo, o proteína de unión a antígeno, o proteína de fusión, a partir de las células o medios de cultivo celular.

60 Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo se realizan y se usan los métodos y composiciones de la invención, y no se destinan a limitar el alcance de lo que los inventores consideran

como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo las cantidades, concentraciones, temperatura, etcétera) pero deben considerarse algunos errores y desviaciones experimentales.

## 5 EJEMPLOS

Ejemplo 1- Determinación de los parámetros del cambio metabólico: Línea celular productora de proteínas de fusión

10 Las células CHO se transfectaron con ADN que expresa una proteína de fusión. La línea celular CHO productora de proteínas de fusión se incubó en un cultivo en recipiente de siembra, en medios patentados que contenían soja, y se midieron y registraron parámetros tales como pH en línea, lactato y recuento de células viables fuera de línea, para determinar el estado metabólico (ver #1, #2, o #3 de la Figura 1A). Además, el uso de una base se supervisó y se normalizó a 1 para esta línea celular (ver, además, la Figura 1A).

15 Las células en la condición #1 y en la condición #2 se usaron para inocular biorreactores de producción duplicados cuando el pH se controló en el extremo inferior del intervalo de control y el lactato y la VCC aumentaron. Las células en la condición #3 se inocularon cuando el pH comenzó a aumentar desde el límite inferior del intervalo de control es decir, se detuvo el uso de la base, lo que indica una remetabolización del lactato (es decir consumo). El crecimiento celular en la condición #3 entró en la fase de crecimiento posterior a la fase exponencial. Todos los biorreactores de producción se ejecutaron con las mismas condiciones de operación.

20 Los títulos de producción (ver Figura 1B) y los perfiles de lactato (ver Figura 1C) se midieron en cada biorreactor de producción mediante el uso de los métodos conocidos para determinar el impacto del estado metabólico del tren de siembra #1, #2 o #3. Las líneas de tendencia del biorreactor de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan  $\pm$  una desviación estándar.

25 Las células de la condición #3 tuvieron el efecto más significativo sobre la productividad y la acumulación de lactato en el segundo cultivo celular, que resultó en un aumento en el título del producto mayor que 2 veces (en comparación con las Condiciones #1 y #2), en el biorreactor de producción (ver Figura 1B). Las células de la condición #3 resultaron, además, en una disminución en la concentración de lactato después de la transferencia al segundo cultivo celular (en comparación con las Condiciones #1 y #2- ver Figura 1C). Las células de la Condición #3 tienen un perfil de lactato indicativo del consumo neto de lactato (ver Figura 1C a los 8-12 días del cultivo celular). Las células que se transfirieron del primer cultivo en la Condición #1 (es decir, antes de un cambio metabólico en el primer cultivo) no logran un consumo neto de lactato en el biorreactor de producción.

35 Ejemplo 2- Determinación de los parámetros del cambio metabólico: Línea celular productora de anticuerpos

Se usó un recipiente de siembra de una línea de células CHO productora de anticuerpos para inocular biorreactores de producción replicados similares al Ejemplo 1, sin embargo en un medio químicamente definido. Se midieron cuatro estados metabólicos diferentes (mediante la supervisión del pH, el lactato y los recuentos de células viables fuera de línea- ver #1, #2, #3, y #4 de la Figura 2A). El VCC continuó en aumento durante la duración de la incubación del recipiente de siembra cuando se inocularon los biorreactores de producción.

45 La Condición #1 se inoculó muy temprano en el tren de siembra cuando el pH estaba aún en el extremo superior del intervalo de control y cuando el lactato estaba bajo pero en aumento. La Condición #2 se inoculó cuando el pH comenzaba a disminuir y el lactato estaba en aumento y se aproximaba a niveles máximos. La Condición #3 se inoculó cuando el pH estaba cerca del límite inferior del intervalo de control y el nivel de lactato estaba estacionario. La Condición #4 se inoculó cuando el pH comenzaba a aumentar desde el límite inferior del intervalo de control y durante la remetabolización del lactato (es decir, consumo de lactato). Todos los biorreactores de producción se ejecutaron con las mismas condiciones de operación. La Condición #1 se perdió después de una semana.

50 Se determinó el impacto del estado metabólico del tren de siembra en los títulos del biorreactor de producción (Figura 2B) y el perfil de lactato (Figura 2C). Las líneas de tendencia del biorreactor de producción representan el promedio de los biorreactores duplicados con barras de error que representan  $\pm$  una desviación estándar.

55 Las células de la Condición #3 y #4 tuvieron el efecto más significativo sobre la productividad en el segundo cultivo celular. Las células de la Condición #3 y #4 resultaron, además, en una disminución de la concentración de lactato en el biorreactor de producción (en comparación con las Condiciones #1 y #2), que es indicativo de un fenotipo metabólico para el consumo de lactato (ver Figuras 2B y 2C). De manera similar al Ejemplo 2, las células que se transfieren del primer cultivo en la Condición #1 no logran el consumo neto de lactato durante la fase de producción. Las Condiciones #2, #3 y #4 logran el consumo neto de lactato durante la fase de producción, sin embargo la Condición #4 es la más óptima ya que el consumo neto de lactato se produce más temprano que en las otras condiciones y el nivel máximo de lactato es el mínimo.

65



## REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar células que comprende:
  - (a) cultivar las células en un primer cultivo celular,
  - (b) determinar que se produjo un cambio metabólico hacia el consumo de lactato en el primer cultivo celular, y
  - (c) transferir las células a un segundo cultivo celular después que en las células se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato, en donde la concentración de lactato en el segundo cultivo celular indica el consumo neto de lactato.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde las células se transfectan con ADN que codifica un polipéptido de interés antes de cultivar las células en un primer cultivo celular, y el método comprende mantener el segundo cultivo celular en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de interés, y cosechar el polipéptido de interés a partir del segundo cultivo celular.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta mediante las mediciones del pH, lactato o base en el primer cultivo celular.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el cambio metabólico hacia el consumo de lactato se detecta después que el pH aumenta en el medio del primer cultivo celular sin la adición de base.
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cambio metabólico se produce cuando las células emergen de la fase logarítmica o alcanzan la fase estacionaria en el primer cultivo celular.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el cambio metabólico se produce cuando los niveles de lactato se estabilizan en el primer cultivo celular.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el cambio metabólico se produce en el primer cultivo celular en, o después de 3 días de crecimiento de las células en el primer cultivo celular.
8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las células transferidas tienen una densidad celular de inoculación entre aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/mL a aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células/mL en el segundo cultivo celular.
9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la etapa de determinación del cambio metabólico comprende:
  - (a) medir el pH en el primer cultivo celular,
  - (b) adicionar una base para mantener el pH por encima de un límite inferior predeterminado,
  - (c) determinar que el pH está por encima del límite inferior predeterminado durante intervalos consecutivos, y
  - (d) dejar de adicionar una base para determinar, de esta manera, que en el primer cultivo celular se produjo el cambio metabólico hacia el consumo de lactato.
10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el primer cultivo celular es un cultivo de tren de siembra.
11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el segundo cultivo celular es un cultivo de producción.
12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la transferencia de las células a un segundo cultivo celular comprende transferir las células a un biorreactor de producción.
13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, una proteína de unión a anticuerpo, y una proteína de fusión.
14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde una o más secuencias de ácido nucleico se integran de manera estable en el genoma celular de las células, y en donde las secuencias de ácido nucleico codifican un polipéptido de interés.
15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-12, en donde las células comprenden uno o más vectores que codifican un polipéptido de interés.

16. El método de conformidad con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el polipéptido de interés se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, una proteína de unión a anticuerpo, y una proteína de fusión.
- 5
17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde las células se seleccionan del grupo que consiste en CHO, COS, células de retina, Vero, CV1, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431, CV-1, U937, 3T3, células L, células C127, SP2/0, NS-0, MMT, PER.C6, células linfoides murinas, y células de hibridoma murino.
- 10

Figura 1A: Parámetros metabólicos: Línea celular productora de proteínas de fusión

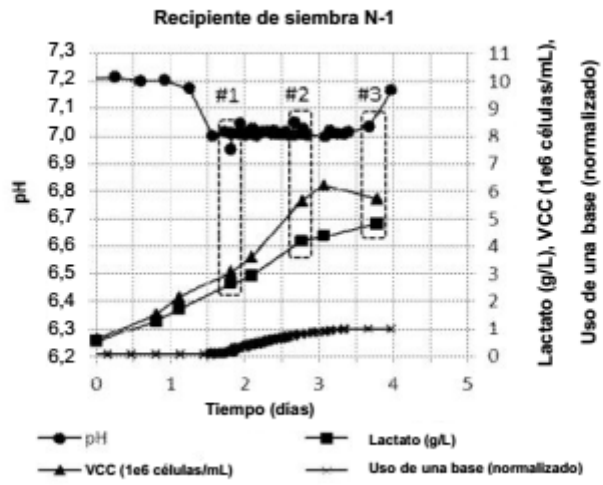


Figura 1B:  
Título de Proteína

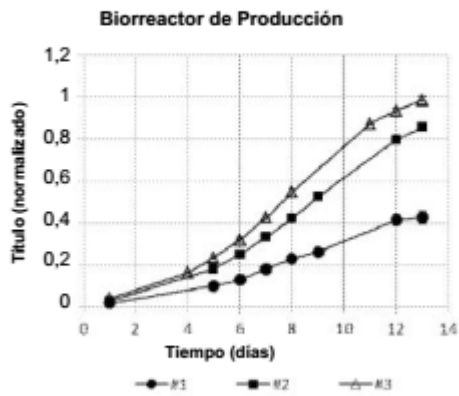


Figura 1C:  
Perfil de Lactato

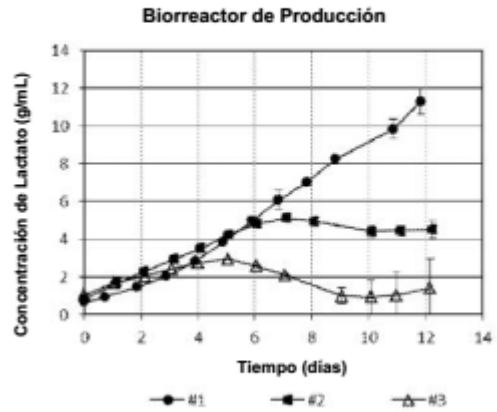


Figura 2A: Parámetros metabólicos: Línea celular productora de anticuerpos

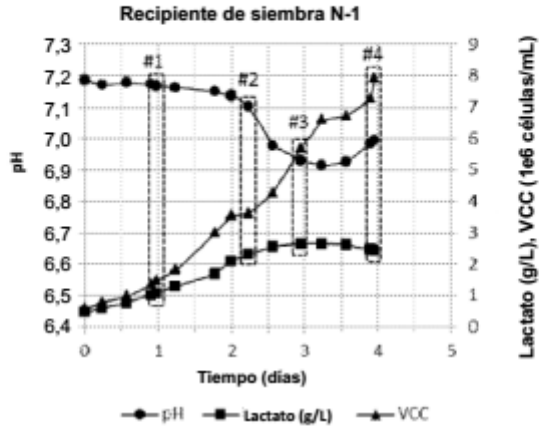


Figura 2B: Título de Proteína

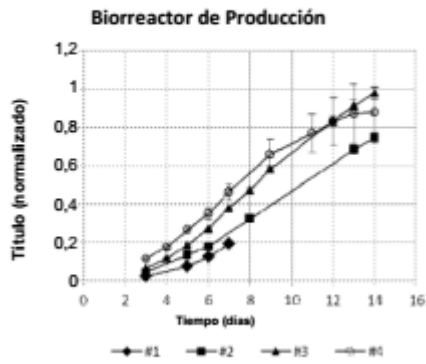


Figura 2C: Perfil de Lactato

