

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 929**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028501**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14723561 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2970876**

54 Título: **Medio de cultivo celular sin suero**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361790136 P

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

24.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**OSHODI, SHADIA;
JOHNSON, AMY y
LAWRENCE, SHAWN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 682 929 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

Medio de cultivo celular sin suero

5 **Campo**

La invención se refiere a medios para el cultivo de células y para la producción de proteínas recombinantes. La invención se refiere, en concreto, a medios sin suero para el cultivo de células CHO recombinantes para la producción de agentes bioterapéuticos proteicos.

10

Antecedentes

Los medios de cultivo celular que comprenden suero o componentes hidrolizados proteicos (es decir, peptonas y triptonas) tienen una larga historia de uso en la producción de proteínas recombinantes a partir de células cultivadas. Estos componentes contienen factores de crecimiento y una amplia variedad de otros elementos no caracterizados beneficiosos para el crecimiento y el cultivo celular. Sin embargo, también contienen elementos no caracterizados que reducen el crecimiento o tienen un impacto negativo por otra razón en la producción de proteínas recombinantes. También pueden ser una posible fuente de variabilidad no deseada. A pesar de sus inconvenientes, los beneficios del uso de sueros e hidrolizados han superado algunas de las desventajas y se han usado ampliamente en muchas aplicaciones de cultivo celular.

Los agentes terapéuticos biológicos humanos (productos biofarmacéuticos), en general, se producen en cultivos celulares de mamíferos, en particular, en cultivo de células CHO. La presencia de componentes no caracterizados o parcialmente caracterizados en esos cultivos celulares es altamente indeseable para la fabricación de productos biofarmacéuticos para uso humano. El uso de dichos componentes no caracterizados o parcialmente caracterizados no solo introduce incoherencias en la producción y la regulación, sino que también plantea la posibilidad de una infección vírica o fúngica del cultivo de producción.

La reducción de la variabilidad de lote a lote en el rendimiento del producto farmacológico y la composición es otro factor importante en la selección de un proceso de cultivo. Los sueros, los hidrolizados y otros elementos indefinidos introducen variabilidad en el rendimiento, la composición y la calidad de los lotes de producción biofarmacéuticos. La calidad y la pureza de los elementos de los medios también pueden afectar al rendimiento, ya que los títulos de los fármacos se suelen basar, en parte, en el mantenimiento de un determinado equilibrio de los nutrientes. Cuando las cantidades relativas de los nutrientes varían de un lote de medios a otro, el rendimiento del fármaco puede variar, y esta variación puede ser inaceptable o poco rentable.

El uso de medios que contienen suero o a base de hidrolizados introduce desafíos de procesamiento aguas abajo. En general, la concentración de un producto biofarmacéutico deseado en cultivo es del orden de los gramos por litro. La presencia de suero e hidrolizados en los medios puede añadir más de 10 g/l de péptidos y proteínas no caracterizados, que deben eliminarse en las etapas de procesamiento posteriores. El suero y los hidrolizados también pueden introducir variabilidad en la cantidad de metales y otros oligoelementos en los medios. La eliminación del suero y de los hidrolizados de los medios de cultivo elimina, por tanto, estas variaciones y posibles impedimentos para la producción y el procesamiento de la sustancia farmacológica.

Entre otros, los beneficios de usar medio sin suero y sin hidrolizados incluyen la reducción en el coste, la reducción de la variabilidad entre lotes de fármaco, y la reducción al mínimo del riesgo de introducir agentes foráneos procedentes de componentes no definidos y sin refinar. Además, cuando los medios son definidos y uniformes entre las ejecuciones de lotes, también se reducen al mínimo las ejecuciones de calificación para probar lotes de medios nuevos con los medios actuales. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de medios para cultivar células de mamífero, de manera que los medios estén químicamente definidos y sin suero ni hidrolizados, o que estén sin suero y contengan niveles bajos manejables de hidrolizados, y que permitan a la vez el crecimiento y el mantenimiento de células sanas y robustas, y la producción de un alto título de sustancias farmacológicas biofarmacéuticas.

El documento US2010285533 se refiere a un medio de cultivo que contiene al menos una poliamina a una concentración de al menos 20 mg/l y al menos una fuente de hierro a una concentración de al menos 2 mg/l, en el que la poliamina es una de entre espermina, espermidina, noespermina, noespermina, noespermidina, homoespermina, homoespermidina o cadaverina.

El documento WO2007077217 se refiere a un medio de cultivo celular sin oligopéptidos, que comprende al menos 0,5 mg/l de una poliamina. El documento EP1321515 se refiere a un método para cultivar células de una estirpe celular, que comprende proporcionar células para cultivar, poner en contacto dichas células con un medio de cultivo celular sin suero en un receptáculo de cultivo celular en presencia de una matriz proteica, y cultivar dichas células en ausencia de suero. El documento US2011229933 describe un método para producir una proteína que comprende inocular un medio de crecimiento celular de mamífero inicial con células hospedadoras que expresan la proteína y añadir complementos que comprenden, entre otros, HCl de L-ornitina.

El documento US2012034674 describe medios de cultivo celular que, en ciertas realizaciones, contienen al menos una poliamina a una concentración de o de entre aproximadamente 0,5 mg/l y 30 mg/l.

Holtta *et al.*, (1982) *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, vol.721, n.º 4, 30 de diciembre de 1982, páginas 321-327 informa que la dependencia de la poliamina de las células CHO en el cultivo sin suero se debe a una actividad deficiente de la arginasa. Hawel *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, vol. 1222(1), 26 de mayo de 1994, páginas 15-26, informa que la exportación selectiva de putrescina está regulada por la insulina y la ornitina en las células de hepatoma Reuber H35.

Sumario

Los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que la inclusión de ornitina, ya sea con o sin putrescina, en los medios de cultivo celular sin suero (medios "OS") aumenta la viabilidad y la densidad celular, reduce el tiempo de duplicación celular y permite la producción de proteína de alto título por esas células. Los inventores también han descubierto que los medios OS que contienen cantidades bajas o traza de hidrolizados proteicos o que están definidos químicamente (es decir, que no contienen hidrolizados proteicos) restablecen, en particular, la viabilidad y la densidad celulares, el tiempo de duplicación celular y la producción de proteína de alto título.

En un aspecto, la invención proporciona un medio de cultivo celular, que es sin suero y que comprende ornitina al menos $0,09 \text{ mM} \pm 0,014 \text{ mM}$. En una realización, la ornitina está presente en el medio a una concentración que varía de $0,09 \pm 0,014 \text{ mM}$ a $0,9 \pm 0,14 \text{ mM}$, tal como ornitina $0,09 \pm 0,014 \text{ mM}$, $0,3 \pm 0,05 \text{ mM}$, $0,6 \pm 0,09 \text{ mM}$ o $0,9 \pm 0,14 \text{ mM}$. El medio también contiene putrescina al menos $0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$. En algunas realizaciones, la putrescina adicional está a una concentración que varía de $0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$ a $0,714 \pm 0,11 \text{ mM}$, tal como putrescina $0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$, $0,35 \pm 0,06 \text{ mM}$ o $0,714 \pm 0,11 \text{ mM}$. En algunas realizaciones, el medio contiene hidrolizado a $\leq 7,5 \text{ g/l}$. En algunas realizaciones, el medio está libre de cualquier hidrolizado.

En una realización, el medio contiene un medio base que está definido químicamente, tal como una formulación de encargo o un medio base disponible en el mercado. En una realización, el medio completo está definido químicamente, y es sin suero y sin hidrolizado.

En algunas realizaciones, el medio, que está a su concentración útil (es decir, x1) contiene al menos $40 \pm 6 \text{ mM}$ o al menos $70 \pm 10,5 \text{ mM}$ de una mezcla de aminoácidos o sales de aminoácidos. En una realización, el medio contiene al menos 40 mM de una mezcla de aminoácidos. En esta u otra realización, el medio contiene al menos 70 mM de una mezcla de aminoácidos. En una realización, la mezcla de aminoácidos (con la notable excepción de la glutamina, que puede añadirse de nuevo al medio como una adición en el momento de uso) contiene alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

En algunas realizaciones, el medio contiene uno o más ácidos grasos. En una realización particular, el medio contiene una mezcla de ácidos grasos (o derivados de ácidos grasos) y alfa tocoferol. Los ácidos grasos o derivados de ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en ácido linoleico, ácido linolénico, ácido tióctico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido, ácido láurico, ácido behénico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido hexanoico, ácido lignocérico, ácido mirístico y ácido octanoico.

En algunas realizaciones, el medio contiene una mezcla de nucleósidos. En una realización, el medio contiene adenosina, guanósina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina.

En algunas realizaciones, el medio contiene una mezcla de sales. Las sales incluyen cationes divalentes, tales como calcio y magnesio. En una realización, el medio contiene cloruro de calcio y sulfato de magnesio. Otras sales pueden incluir las de fosfato.

En una realización específica, el medio (1) contiene $\leq 7,5 \text{ g/l}$ de un hidrolizado; (2) es sin suero; (3) contiene ornitina $0,09 \pm 0,014 \text{ mM}$, $0,3 \pm 0,05 \text{ mM}$, $0,6 \pm 0,09 \text{ mM}$ o $0,9 \pm 0,14 \text{ mM}$; (4) además, contiene putrescina $0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$, $0,35 \pm 0,06 \text{ mM}$ o $0,714 \pm 0,11 \text{ mM}$; (5) contiene al menos aproximadamente 40 mM o al menos aproximadamente 70 mM de una mezcla de aminoácidos que incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; (6) contiene tocoferol y una mezcla de ácidos grasos; (7) contiene una mezcla de nucleósidos que incluyen adenosina, guanósina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina; y (8) contiene sales de calcio, magnesio y fosfato.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para cultivar células en un medio de cultivo celular, tal como cualquier realización del medio descrito en el aspecto anterior, y propagar o mantener una célula en el medio de cultivo celular para formar un cultivo celular. En una realización, el método emplea las etapas de propagar o mantener una célula o células en un medio que (1) contiene hidrolizado a $\leq 7,5 \text{ g/l}$ o que no contiene hidrolizado; (2) es sin suero; (3) contiene ornitina a una concentración de al menos $0,09 \text{ mM} \pm 0,014 \text{ mM}$; (4) y contiene putrescina a una concentración de al menos $0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$.

En algunas realizaciones, la célula o las células son células de mamífero, células aviares, células de insecto, células

de levadura o células de bacterias. En una realización, las células son células de mamífero útiles en la producción de proteínas recombinantes, tales como células CHO o el derivado CHO-K1. En algunas realizaciones, las células expresan una proteína de interés, tal como una proteína bioterapéutica. La proteína bioterapéutica puede ser una proteína de unión a antígeno, que puede contener un dominio Fc. En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína de fusión de receptor-Fc, tal como una molécula ScFv o una molécula TRAP. Las moléculas TRAP incluyen las proteínas VEGF TRAP e IL-1 TRAP. En algunas realizaciones, la proteína de interés es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo.

Teniendo en cuenta los efectos positivos sobre el crecimiento celular mediante la inclusión de la ornitina o una combinación de ornitina y putrescina en medios sin suero, las células cultivadas de acuerdo con este método tienen un tiempo medio de duplicación que no es superior a 30 horas. En una realización, el tiempo de duplicación de la célula no es superior a 24 horas. En una realización, cuando se compara con el crecimiento celular en medios que contienen ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM (u ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM y putrescina a menos de $0,2 \pm 0,03$ mM), las células cultivadas de acuerdo con este método tienen un tiempo de duplicación medio que es al menos un tercio del tiempo de duplicación del cultivo de control del comparador.

Asimismo, la inclusión de ornitina sola o de una combinación de ornitina y putrescina en medios sin suero permite que las células cultivadas alcancen una densidad de recuento de células viables mayor que sin la inclusión de la ornitina o la combinación de ornitina y putrescina. En una realización sin suero y sin hidrolizado del medio OS, el cultivo celular es capaz de alcanzar una densidad de recuento de células viables que es al menos un 15 % superior a la de un cultivo celular similar en un medio de cultivo celular similar que contiene ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM (u ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM y putrescina a menos de $0,2 \pm 0,03$ mM). En otra realización sin suero y sin hidrolizado del medio OS, el cultivo celular es capaz de alcanzar una densidad de recuento de células viables que es al menos 3 veces superior a la de un cultivo celular similar en un medio de cultivo celular similar que contiene ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM (u ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM y putrescina a menos de $0,2 \pm 0,03$ mM).

En otra realización, el método incluye la etapa de añadir una o más adiciones en el momento de uso al medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la adición en el momento de uso es una cualquiera o más de NaHCO_3 , glutamina, insulina, glucosa, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , EDTA de Na_4 y citrato de Na_3 . En una realización, el método emplea la etapa de añadir cada uno de los siguientes productos químicos en el momento de uso al medio de cultivo celular: NaHCO_3 , glutamina, insulina, glucosa, CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , NiSO_4 , EDTA de Na_4 y citrato de Na_3 . En algunas realizaciones, las adiciones en el momento de uso pueden incluirse en el medio al comienzo.

En una realización específica, el aspecto proporciona un método para el cultivo de células en un medio sin suero que contiene (1) ornitina bien a $0,09 \pm 0,014$ mM, $0,3 \pm 0,05$ mM, $0,6 \pm 0,09$ mM o $0,9 \pm 0,14$ mM de medio de cultivo celular; (2) además, putrescina bien a $0,20 \pm 0,03$ mM, $0,35 \pm 0,06$ mM o $0,714 \pm 0,11$ mM; (3) al menos aproximadamente 40 mM o al menos aproximadamente 70 mM de una mezcla de amino ácidos que incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; (4) tocoferol y un mezcla de ácidos grasos; (6) una mezcla de nucleósidos que incluyen adenosina, guanosina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina; y (9) sales de calcio, magnesio y fosfato, en el que las células cultivadas de acuerdo con este método tienen un tiempo de duplicación medio que no es superior a 24 horas o que es al menos un tercio del tiempo de duplicación del cultivo de control del comparador; y las células cultivadas son capaces de alcanzar una densidad de recuento de células viables que es al menos un 15 % superior o al menos 3 veces superior a la de un cultivo celular similar en un medio de cultivo celular similar que contiene ornitina a menos de $0,09 \pm 0,015$ mM (u ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM y putrescina a menos de $0,2 \pm 0,03$ mM). En otra realización, el cultivo celular es capaz de alcanzar una densidad de recuento de células viables que es al menos 3 veces superior a la de un cultivo celular similar en un medio de cultivo celular similar que contiene ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM (u ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM y putrescina a menos de $0,2 \pm 0,03$ mM). En una realización, el medio contiene hidrolizado a $\leq 7,5$ g/l; y en otra realización, es sin hidrolizados.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una proteína de interés empleando las etapas de (1) introducir, en una célula, una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de interés; (2) seleccionar una célula que porte esa secuencia de ácido nucleico; (3) cultivar la célula seleccionada en una realización del medio de cultivo celular sin suero descrito en el primer aspecto o de acuerdo con cualquier realización del método descrito en el segundo aspecto; y (4) expresar la proteína de interés en la célula, de modo que la proteína de interés se secrete en el medio. En algunas realizaciones, la célula usada en la producción de la proteína es una célula de mamífero capaz de producir una célula bioterapéutica, tal como CHO, 293 y BHK, o cualquier derivado de las mismas. En una realización, la célula es una célula CHO, tal como una célula CHO-K1.

En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína que tiene un dominio Fc. En algunos casos, esas dos proteínas de interés pueden solaparse, tal como en el caso de una proteína de fusión de receptor-Fc, un anticuerpo y una proteína ScFv, por ejemplo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la proteína de interés es un anticuerpo, tal como un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab'_2 o $\text{F(ab}')_2$, un anticuerpo

biespecífico, una molécula TRAP, tal como una VEGF TRAP o una IL-1 TRAP, una molécula scFv, una proteína de fusión de TCR-Fc soluble, o similares.

- 5 En una realización, la proteína de interés es capaz de producirse a un título medio de siete días, que es al menos un 7 % superior, al menos un 14 % superior, al menos un 80 % superior, al menos dos veces superior o al menos tres veces superior al título medio de siete días producido por una célula similar en un medio de cultivo celular sin suero que contiene ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM (u ornitina a menos de $0,09 \pm 0,014$ mM y putrescina a menos de $0,2 \pm 0,03$ mM) (medios "no OS").
- 10 En una realización específica, la proteína de interés se produce mediante (1) la introducción, en una célula CHO, de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de interés, tal como un anticuerpo u otra proteína de unión a antígeno; (2) la selección de una célula que porta esa secuencia de ácido nucleico; (3) el cultivo de la célula seleccionada en un medio de cultivo celular sin suero que contiene (a) ornitina a $0,09 \pm 0,014$, $0,3 \pm 0,05$ mM, $0,6 \pm 0,09$ mM o $0,9 \pm 0,14$ mM; (b) además, putrescina bien a $0,20 \pm 0,03$ mM, $0,35 \pm 0,06$ mM o $0,714 \pm 0,11$ mM; (c) al menos 40 mM o al menos 70 mM de una mezcla de amino ácidos que incluyen: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina; (d) tocoferol y un mezcla de ácidos grasos; (e) una mezcla de nucleósidos que incluyen adenosina, guanosina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina; y (f) sales de calcio, magnesio y fosfato; y (d) la expresión de la proteína de interés en la célula CHO, de modo que la proteína de interés se secrete en el medio. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular sin suero puede incluir $\leq 7,5$ g/l de hidrolizados; o, en otras realizaciones, ningún hidrolizado en absoluto.

Descripción detallada

- 25 Los solicitantes han hecho el sorprendente descubrimiento de que la adición de ornitina, o una combinación de ornitina y putrescina ("medio OS") mejora la densidad de células viables, el tiempo de duplicación celular y la producción de proteína por una célula en un cultivo celular en comparación con un medio sin suero que contenga muy poca ornitina o que no contenga nada de ornitina, o poco o nada de una combinación de ornitina y putrescina ("medio no OS").

- 30 Antes de describir los presentes cultivos celulares y métodos, se ha de entender que la presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales descritos en particular, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También se comprende que la terminología usada en la presente memoria es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

- 35 Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente solicitud tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente solicitud, a continuación, se describen determinados métodos y materiales específicos. Las unidades, los prefijos y los símbolos se pueden denotar en su forma aceptada del SI. Los intervalos numéricos enumerados en el presente documento están entre corchetes, lo que significa que incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique otra cosa, los términos "un" o "una" deben interpretarse en el sentido de "al menos uno/a de". Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita. los métodos y las técnicas que se describen en el presente documento, en general, se realizan de acuerdo con métodos convencionales ya conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001) y Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates (1992), Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), y Julio E. Celis, "Cell Biology: A Laboratory Handbook", 2ª ed., Academic Press, Nueva York, N.Y. (1998), y Dieffenbach y Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995).

55 Definiciones

- 60 Como se usa en el presente documento, "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente a lo largo del presente documento, y se refieren a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. Los péptidos, los polipéptidos y las proteínas también pueden incluir modificaciones tales como glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, alquilación, hidroxilación y ribosilación de ADP. Los péptidos, los polipéptidos y las proteínas pueden ser de interés científico o comercial, incluyendo los fármacos a base de proteínas. Los péptidos, los polipéptidos y las proteínas incluyen, entre otros, anticuerpos y proteínas quiméricas o de fusión. Los péptidos, los polipéptidos y las proteínas son producidos por estirpes de células animales recombinantes usando métodos de cultivo celular.

- 65 La expresión "secuencia polinucleotídica heteróloga", como se usa en el presente documento, se refiere a polímeros

de ácido nucleico que codifican proteínas de interés, tales como proteínas quiméricas (como moléculas TRAP), anticuerpos o partes de anticuerpo (por ejemplo, VH, VL, CDR3) que se producen como una sustancia farmacológica biofarmacéutica. La secuencia polinucleotídica heteróloga puede fabricarse mediante técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, tal como una secuencia que codifica una proteína quimérica o una secuencia optimizada por codones, una secuencia sin intrones, etc.) e introducirse en la célula, en la que puede residir como un episoma o integrarse en el genoma de la célula. La secuencia polinucleotídica heteróloga puede ser una secuencia natural que se introduce en un sitio ectópico dentro del genoma de la célula de producción. La secuencia polipeptídica heteróloga puede ser una secuencia natural de otro organismo, tal como una secuencia que codifique un ortólogo humano.

"Anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada tiene una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada contiene tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera tiene una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera consiste en un dominio (CL). Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. El término "anticuerpo" incluye la referencia a inmunoglobulinas tanto glicosiladas como no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase. El término "anticuerpo" incluye moléculas de anticuerpo preparadas, expresadas, creadas o aisladas por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula hospedadora transfectada para expresar el anticuerpo. El término anticuerpo también incluye un anticuerpo biespecífico, que incluye una inmunoglobulina heterotetramérica que se puede unir a más de un epítipo diferente. Los anticuerpos biespecíficos se describen en general en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2010/0331527.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "fragmento del anticuerpo"), se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno). Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados en la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento de dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 241:544-546), que consiste en un dominio VH; (vi) una CDR aislada; y (vii) un scFv, que consiste en los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un enlazador sintético para formar una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos, también están abarcados por el término "anticuerpo" (véase, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) *PNAS* EE.UU., 90:6444-6448; Poljak *et al.*, (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Además, un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo puede formar parte de una molécula de inmunoadhesión mayor, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o de la parte de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para formar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov *et al.*, (1995) "Human Antibodies and Hybridomas" 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para producir moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov *et al.*, (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las partes de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las partes de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante convencionales comúnmente conocidas en la materia (véase Sambrook *et al.*, 1989).

La expresión "anticuerpo humano" pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, en CDR3. Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como los anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de un banco combinatorio de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor *et al.*, (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulinas humanas con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y

constantes que provienen de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden de y están relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humanas, no pueden existir de manera natural en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo*.

Las "proteínas de fusión Fc" comprenden parte o la totalidad de dos o más proteínas, una de las cuales es una parte Fc de una molécula de inmunoglobulina, que, en cambio, no se encuentran juntas en la naturaleza. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas partes de polipéptidos derivados de anticuerpos (que incluyen el dominio Fc) se ha descrito, por ejemplo, por Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.U.* 88: 10535, 1991; Byrn *et al.*, *Nature* 344:677, 1990; y Hollenbaugh *et al.*, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Supl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11, 1992. "Las proteínas de fusión de receptor y Fc" comprenden uno o más dominios extracelulares de un receptor acoplado a una fracción Fc, que, en algunas realizaciones, comprende una región de bisagra seguida de un dominio CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la proteína de fusión Fc contiene dos o más cadenas de receptor distintas que se unen a uno o más ligandos. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc es una TRAP, tal como, por ejemplo, una IL-1 TRAP (por ejemplo, riloncept, que contiene la región de unión al ligando IL-1RAcP fusionada a la región extracelular de IL-1R1 fusionada a Fc de hlgG1; Véase la patente de EE.UU. n.º 6.927.004) o una VEGF TRAP (por ejemplo, aflibercept, que contiene el dominio de Ig 2 del receptor Flt1 de VEGF fusionado al dominio de Ig 3 del receptor Flk1 de VEGF fusionado a Fc de hlgG1; Véanse las patentes de EE.UU. n.º 7.087.411 y 7.279.159).

MEDIOS

La presente invención proporciona un medio sin suero que es útil en el cultivo de células y la producción de una sustancia farmacológica biofarmacéutica. "Sin suero" se aplica a un medio de cultivo celular que no contiene suero animal, tal como suero bovino fetal. Los medios sin suero pueden contener < 7,5 g/l de hidrolizados, tales como hidrolizado de soja. La presente invención también proporciona medios definidos químicamente, que no solo son sin suero, sino también sin hidrolizados. "Libre de hidrolizados" se aplica al medio de cultivo celular que no contiene hidrolizados proteicos exógenos tales como hidrolizados proteicos animales o vegetales tales como, por ejemplo, peptonas, triptonas y similares.

La eliminación del suero, y la reducción o eliminación de los hidrolizados de los medios de cultivo celular, aunque reduce la variabilidad de lote a lote y mejora las etapas de procesamiento aguas abajo, por desgracia, disminuye el crecimiento celular, la viabilidad celular y la expresión de proteínas. Por lo tanto, los medios químicamente definidos sin suero y de bajo a nulo contenido de hidrolizados requieren ingredientes adicionales para mejorar el crecimiento celular y la producción de proteínas. Los medios de cultivo celular de la invención se pueden complementar con ingredientes adicionales tales como poliaminas o mayores concentraciones de componentes como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, tampones, antibióticos, lípidos, oligoelementos y similares, dependiendo de las necesidades de las células que se vayan a cultivar o de los parámetros de cultivo celular deseados. En concreto, el medio de cultivo celular se complementa con ornitina, putrescina o ambas ("medio OS") para mejorar el crecimiento celular, la viabilidad celular y la producción de proteína recombinante.

En algunas realizaciones, el medio OS contiene ornitina a una concentración (expresada en micromoles por litro) de al menos aproximadamente 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 568, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 700, 750, 800, 850 o 900 μM .

En algunas realizaciones, el medio contiene ornitina a una concentración de aproximadamente 85, 90, 95, 100, 105, 110, 113 o 115 μM . En una realización, el medio contiene ornitina a 100 $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$. En una realización, el medio contiene HCl de ornitina a 15 mg/l $\pm 2,25$ mg/l.

En algunas realizaciones, los medios contienen ornitina a una concentración de aproximadamente 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340 o 345 μM . En una realización, el medio contiene ornitina a 300 $\mu\text{M} \pm 45 \mu\text{M}$. En una realización, el medio contiene HCl de ornitina a 50 mg/l $\pm 7,5$ mg/l.

En algunas realizaciones, los medios contienen ornitina a una concentración de aproximadamente 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685 o 690 μM . En una realización, el medio contiene ornitina a 600 $\mu\text{M} \pm 90 \mu\text{M}$. En una realización, el medio contiene HCl de ornitina a 100 mg/l ± 15 mg/l.

En algunas realizaciones, los medios contienen ornitina a una concentración de 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995, 1.000, 1.005, 1.010, 1.015, 1.020, 1.025, 1.030 o 1.035 μM . En una realización, el medio contiene ornitina a 900 $\mu\text{M} \pm 135 \mu\text{M}$. En una

realización, el medio contiene HCl de ornitina a 150 mg/l \pm 22,5 mg/l.

Los medios complementados con ornitina también comprenden putrescina. La putrescina se ha incluido, a concentraciones muy bajas, como componente en algunas formulaciones de medios de cultivo celular; véase, por ejemplo, el documento WO 2005/028626, que describe putrescina a 0,02-0,08 mg/l; la patente de EE.UU. n.º 5.426.699 (0,08 mg/l); la patente de EE.UU. n.º RE30,985 (0,16 mg/l); la patente de EE.UU. n.º 5.811.299 (0,27 mg/l); la patente de EE.UU. n.º 5.122.469 (0,5635 mg/l); la patente de EE.UU. n.º 5.063.157 (1 mg/l); el documento WO 2008/154014 (-100 μ M - \sim 1.000 μ M); La publicación de solicitud de patente n.º 2007/0212770 (poliamina a 0,5-30 mg/l; putrescina a 2 mg/l; putrescina a 2 mg/l + ornitina a 2 mg/l; putrescina a 2 mg/l + ornitina a 10 mg/l).

En algunas realizaciones, los medios contienen una combinación de ornitina y putrescina, en la que la putrescina puede estar a una concentración de al menos aproximadamente 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 260, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405 o 410 μ M.

En algunas realizaciones, los medios contienen putrescina a una concentración de aproximadamente 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225 o 230 μ M. En una realización, el medio contiene putrescina a 200 μ M \pm 30 μ M además de ornitina a \geq 90 μ M \pm 14 μ M. En una realización, el medio contiene 2HCl de putrescina a 30 mg/l \pm 4,5 mg/l, además de HCl de ornitina a \geq 15 mg/l \pm 2,25 mg/l.

En algunas realizaciones, los medios contienen putrescina a una concentración de aproximadamente 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400 o 405 μ M. En una realización, el medio contiene putrescina a 350 μ M \pm 52,5 μ M además de ornitina a \geq 90 μ M \pm 14 μ M. En una realización, el medio contiene 2HCl de putrescina a 57 mg/l \pm 8,55 mg/l, además de HCl de ornitina a \geq 15 mg/l \pm 2,25 mg/l.

En algunas realizaciones, los medios contienen putrescina a una concentración de aproximadamente 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800 o 805 μ M. En una realización, el medio contiene putrescina a 714 μ M \pm 105 μ M además de ornitina a \geq 90 μ M \pm 14 μ M. En una realización, el medio contiene 2HCl de putrescina a 115 mg/l \pm 17,25 mg/l, además de HCl de ornitina a \geq 15 mg/l \pm 2,25 mg/l.

En algunas realizaciones, los medios contienen una combinación de dos de cualquiera de las concentraciones de putrescina y ornitina enumeradas anteriormente. En algunas realizaciones, los medios contienen cualquier combinación de dos de putrescina a aproximadamente 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800 o 805 μ M, y ornitina a aproximadamente 510, 515, 520, 525, 530, 535, 540, 545, 550, 555, 560, 565, 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685 o 690 μ M. Por ejemplo, los medios, en una realización, contienen putrescina a aproximadamente 700 μ M más ornitina a una cualquiera de 510, 511, 512 μ M, *et sequens*; o putrescina a 701 μ M más ornitina a una cualquiera de 510, 511, 512 μ M, *et sequens*; etcétera. Además, por ejemplo, los medios, en una realización, contienen ornitina a aproximadamente 600 μ M más putrescina a una cualquiera de 700, 701, 702 μ M, *et sequens*; u ornitina a 601 μ M más putrescina a una cualquiera de 700, 701, 702 μ M, *et sequens*; etcétera. En algunas realizaciones, los medios contienen putrescina a 702 μ M \pm 106 μ M + ornitina a 593 μ M \pm 89 μ M. En una realización particular, los medios contienen putrescina a aproximadamente 714 μ M y ornitina a 593 μ M. En una realización, los medios contienen 2HCl de putrescina a 115 mg/l \pm 17 mg/l y HCl de ornitina a 100 mg/l \pm 15 mg/l. En una realización particular, los medios contienen 2HCl de putrescina a 115 mg/l y HCl de ornitina a 100 mg/l.

En una realización, y además de la inclusión de ornitina y putrescina, los medios contienen una mezcla de nucleósidos a una concentración acumulada de al menos 50 μ M, al menos 60 μ M, al menos 70 μ M, al menos 80 μ M, al menos 90 μ M, al menos 100 μ M, al menos 110 μ M, al menos 115 μ M, al menos 120 μ M, al menos 125 μ M, al menos 130 μ M, al menos 135 μ M, al menos 140 μ M, al menos 145 μ M, al menos 150 μ M, al menos 155 μ M, al menos 160 μ M, al menos 165 μ M o al menos 170 μ M. En una realización, los medios contienen nucleósido a aproximadamente 174 μ M \pm 26 μ M. En una realización, los medios contienen derivados de purina a una concentración acumulada de al menos 40 μ M, al menos 45 μ M, al menos 50 μ M, al menos 55 μ M, al menos 60 μ M, al menos 65 μ M, al menos 70 μ M, al menos 75 μ M, al menos 80 μ M, al menos 85 μ M, al menos 90 μ M, al menos 95 μ M, al menos 100 μ M o al menos 105 μ M. En una realización, los medios contienen derivados de purina a aproximadamente 106 μ M \pm 5 μ M. Los derivados de purina incluyen hipoxantina y los nucleósidos adenosina y guanosina. En una realización, los medios contienen derivados de pirimidina a una concentración acumulada de al menos 30 μ M, al menos 35 μ M, al menos 40 μ M, al menos 45 μ M, al menos 50 μ M, al menos 55 μ M, al menos 60 μ M o al menos 65 μ M. En una realización, los medios contienen derivados de pirimidina a aproximadamente 68 μ M \pm 5 μ M. Los derivados de pirimidina incluyen los nucleósidos timidina, uridina y citidina. En una realización particular, los medios contienen adenosina, guanosina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina.

Además de la inclusión de ornitina y putrescina, en una realización, los medios también contienen aminoácidos a

una concentración acumulada de al menos 40 mM, en los que la cantidad de glutamina no está incluido en el cálculo del total acumulado. En una realización, la glutamina no se incluye en el medio, pero puede suministrarse como una "adición en el momento de uso" a los medios durante el cultivo celular, tal como durante la producción de proteína. Por lo tanto, en algunas realizaciones, tales como en el método para cultivar células o el método para producir una proteína de interés, los medios se pueden complementar con glutamina como una adición en el momento de uso. En una de dichas realizaciones, la glutamina se añade en una cantidad inferior a aproximadamente 40 mM, inferior a aproximadamente 35 mM, inferior a aproximadamente 30 mM, inferior a aproximadamente 25 mM, inferior a aproximadamente 20 mM, inferior a aproximadamente 15 mM, inferior a aproximadamente 10 mM, inferior a aproximadamente 8 mM, inferior a aproximadamente 7 mM, inferior a aproximadamente 6 mM, inferior a aproximadamente 5 mM, inferior a aproximadamente 4 mM, inferior a aproximadamente 3 mM o inferior a aproximadamente 2,5 mM. En una realización, la cantidad de glutamina en los medios que se complementó con glutamina es de aproximadamente 2 mM \pm 0,5 mM.

En una realización, además de la inclusión de una combinación tanto de ornitina como de putrescina, los medios también contienen aminoácidos que tienen un grupo lateral no polar a una concentración de al menos 15 mM, al menos 24 mM, al menos 25 mM, al menos 26 mM, al menos 27 mM, al menos 28 mM, al menos 29 mM o al menos 30 mM. En una realización, los medios contienen aproximadamente 30 mM de aminoácidos que tienen un grupo lateral no polar. En una realización, de la cantidad total de aminoácidos por mol contenida dentro de los medios, al menos el 32 %, al menos el 33 %, al menos el 34 %, al menos el 35 %, al menos el 36 %, al menos el 37 %, al menos el 38 %, al menos el 39 %, al menos el 40 % o al menos el 41 % son aminoácidos que tienen grupos laterales no polares. En una realización, aproximadamente el 42 % \pm 1 % por mol de los aminoácidos de los medios son aminoácidos que tienen un grupo lateral no polar. Los aminoácidos que tienen un grupo lateral no polar incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.

En una realización, además de la inclusión de una combinación tanto de ornitina como de putrescina, los medios también contienen aminoácidos que tienen un grupo lateral polar sin carga a una concentración de aproximadamente 10 mM a 34 mM, de aproximadamente 11 mM a 33 mM, de aproximadamente 12 mM a 32 mM, de aproximadamente 13 mM a 31 mM, de aproximadamente 14 mM a 30 mM, de aproximadamente 15 mM a 29 mM, de aproximadamente 16 mM a 28 mM, de aproximadamente 17 mM a 27 mM, de aproximadamente 18 mM a 26 mM, de aproximadamente 19 mM a 25 mM, de aproximadamente 20 mM a 24 mM, de aproximadamente 21 mM a 23 mM o aproximadamente 22 mM. En una realización, el medio contiene aproximadamente 22 mM de aminoácidos que tienen un grupo lateral polar sin carga. En otra realización, el medio contiene aproximadamente 12 mM de aminoácidos que tienen un grupo lateral polar sin carga. En una realización, de la cantidad total por mol de aminoácidos contenidos dentro de los medios, aproximadamente del 14 % al 46 %, aproximadamente del 15 % al 45 %, aproximadamente del 16 % al 44 %, aproximadamente del 17 % al 43 %, aproximadamente del 18 % al 42 %, aproximadamente del 19 % al 41 %, aproximadamente del 20 % al 40 %, aproximadamente del 21 % al 39 %, aproximadamente del 22 % al 38 %, aproximadamente del 23 % al 37 %, aproximadamente del 24 % al 36 %, aproximadamente del 25 % al 35 %, aproximadamente del 26 % al 34 %, aproximadamente del 27 % al 33 %, aproximadamente del 28 % al 32 %, aproximadamente del 29 % al 31 % o aproximadamente el 30 % son aminoácidos que tienen grupos laterales polares sin carga. En una realización, aproximadamente el 30 % \pm 3 % por mol de los aminoácidos de los medios son aminoácidos que tienen un grupo lateral polar sin carga. Los aminoácidos que tienen un grupo lateral polar sin carga incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina.

En una realización, además de la inclusión de una combinación tanto de ornitina como de putrescina, los medios también contienen aminoácidos que tienen una carga negativa a pH 6 (es decir, aminoácidos ácidos) a una concentración de aproximadamente 4 mM a 14 mM, de aproximadamente 5 mM a 13 mM, de aproximadamente 6 mM a 12 mM, de aproximadamente 7 mM a 11 mM, de aproximadamente 8 mM a 10 mM, aproximadamente 9 mM o aproximadamente 4 mM. En una realización, los medios contienen aproximadamente 9 mM de aminoácidos ácidos. En una realización, los medios contienen 9 mM \pm 1 mM de aminoácidos ácidos. En una realización, de la cantidad total por mol de aminoácidos contenidos dentro de los medios, aproximadamente del 8 % al 18 %, aproximadamente del 9 % al 17 %, aproximadamente del 10 % al 16 %, aproximadamente del 11 % al 15 %, aproximadamente del 12 % al 14 % o aproximadamente el 13 % de aminoácidos ácidos. En una realización, aproximadamente el 12,6 % \pm 1 % por mol de los aminoácidos de los medios son aminoácidos ácidos. Los aminoácidos ácidos ácido aspártico y ácido glutámico.

En una realización, además de la inclusión de una combinación tanto de ornitina como de putrescina, los medios también contienen aminoácidos que tienen una carga positiva a pH 6 (es decir, aminoácidos básicos) a una concentración de al menos 3,5 mM, al menos 4 mM, al menos 5 mM, al menos 6 mM, al menos 7 mM, al menos 8 mM, al menos 9 mM, al menos 10 mM o al menos 11 mM. En una realización, los medios contienen aproximadamente 11 mM de aminoácidos básicos. En una realización, los medios contienen aproximadamente 11,42 mM \pm 1 mM de aminoácidos básicos. En una realización, de la cantidad total por mol de aminoácidos contenidos dentro de los medios, al menos el 5 %, al menos el 6 %, al menos el 7 %, al menos el 8 %, al menos el 9 %, al menos el 10 %, al menos el 11 %, al menos el 12 %, al menos el 13 %, al menos el 14 % o al menos el 15 % son aminoácidos básicos. En una realización, aproximadamente el 16 % por mol de los aminoácidos de los medios son aminoácidos básicos. En una realización, aproximadamente el 15,8 % \pm 2,4 % por mol de los aminoácidos de

los medios son aminoácidos básicos. En una realización, aproximadamente el 21 % \pm 3,2 % por mol de los aminoácidos de los medios son aminoácidos básicos. Los aminoácidos básicos incluyen lisina, arginina e histidina.

5 En una realización, además de la inclusión de una combinación tanto de ornitina como de putrescina, los medios también contienen aminoácidos no polares a aproximadamente 30 mM, aminoácidos polares sin carga a aproximadamente 22 mM, aminoácidos ácidos a aproximadamente 9 mM y aminoácidos básicos a aproximadamente 11 mM. En una realización, de los aminoácidos de los medios, aproximadamente el 42 % por mol son aminoácidos no polares, aproximadamente el 30 % por mol son aminoácidos polares sin carga, aproximadamente el 13 % por mol son aminoácidos ácidos y aproximadamente el 16 % por mol son aminoácidos básicos.

15 Además de la inclusión de una combinación tanto de ornitina como de putrescina, en una realización, los medios contienen cantidades micromolares de ácidos grasos (o derivados de ácidos grasos) y tocoferol. En una realización, los ácidos grasos incluyen uno o más de ácido linoleico, ácido linoléico, ácido linolénico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido láurico, ácido bencénico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido hexanoico, ácido lignocérico, ácido mirístico y ácido octanoico. En una realización, los medios contienen tocoferol, ácido linoleico y ácido tióctico.

20 En una realización, los medios también contienen una mezcla de vitaminas, que incluye otros nutrientes y nutrientes esenciales, a una concentración acumulada de al menos aproximadamente 700 μ M o al menos aproximadamente 2 mM. En una realización, la mezcla de vitaminas contiene uno o más de D-biotina, cloruro de colina, ácido fólico, mio-inositol, niacinamida, HCl de piridoxina, ácido D-pantoténico (hemiCa), riboflavina, HCl de tiamina, vitamina B12 y similares. En una realización, la mezcla de vitaminas incluye D-biotina, cloruro de colina, ácido fólico, mio-inositol, niacinamida, HCl de piridoxina, ácido D-pantoténico (hemiCa), riboflavina, HCl de tiamina y vitamina B12.

25 Diversas realizaciones de los medios de la invención incluyen cualquiera de las combinaciones de las realizaciones, incluyendo medios químicamente definidos, sin hidrolizados y sin suero que comprenden ornitina o putrescina en las cantidades indicadas, más, entre otros, (a) aminoácidos; (b) opcionalmente, nucleósidos; (c) sales de cationes divalentes; (d) ácidos grasos y tocoferol; y (e) vitaminas. En algunas realizaciones, todas las pequeñas cantidades de hidrolizados se pueden añadir a los medios OS.

35 Los solicitantes prevén que, en la práctica de la presente invención, se pueden usar uno cualquiera o más de una variedad de medios base o combinaciones de los mismos, a los que se añade la combinación tanto de ornitina como de putrescina. Los medios base son conocidos en general en la técnica, e incluyen, entre otros, MEME de Eagle (medios esenciales mínimos) (Eagle, *Science*, 1955, 112(3168):501-504), F12 de Ham (*Ham, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.*, 1965, 53:288-293), medio F-12 K, medio de Dulbecco, medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.*, agosto de 1952; 38(8): 747-752), DMEM/F12 de Ham a 1:1, T8 de Trowell, medios A2 de Holmes y Wolf, *Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, 10:389-401), medios de Waymouth (Davidson y Waymouth, *Biochem. J.*, 1945, 39(2):188-199), medios E de Williams (William's *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 1971, 69:105 *et seq.*), RPMI 1640 (Moore *et al.*, *J. Amer. Med. Assoc.*, 1967, 199:519-524), medios MCDB 104/110 (Bettger *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.*, 1981, 78(9):5588-5592), medios Ventrex HL-1, medios de albúmina-globulina (Orr *et al.*, *Appl. Microbiol.*, 1973, 25(1):49-54), medio RPMI-1640, medio RPMI-1641, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio 5 A de McCoy, medio L-15 de Leibovitz, y medios sin suero tales como la serie EX-CELL™ 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), medios de protamina-cinc-insulina (Weiss *et al.*, 1974, documento US 4.072.565), medios de biotina-folato (Cartaya, 1978, US Re30,985), medios de transferrina-ácidos grasos (Baker, 1982, documento US 4.560.655), medios de transferrina-EGF (Hasegawa, 1982, documento US 4.615.977; Chessebeuf, 1984, documento US 4.786.599) y otras permutaciones de medios (véase Inlow, documento US 6.048.728; Drapeau, documento US 7.294.484; Mather, documento US 5.122.469; Furukawa, documento US 5.976.833; Chen, documento US 6.180.401; Chen, documento US 5.856.179; Etcheverry, documento US 5.705.364; Etcheverry, documento US 7.666.416; Ryll, documento US 6.528.286; Singh, documento US 6.924.124; Luan, documento US 7.429.491; y similares).

55 En una realización particular, los medios están definidos químicamente y contienen, además de la combinación tanto de ornitina como de putrescina: CaCl₂ 2H₂O; tampón de HEPES, KCl; MgSO₄; NaCl; Na₂HPO₄ u otras sales de fosfato; piruvato; L-alanina; HCl de L-arginina; H₂O de L-asparagina; ácido L-aspartico; HCl H₂O de L-cisteína; ácido L-glutámico; glicina; HCl H₂O de L-histidina; L-isoleucina; L-leucina; HCl de L-lisina; L-metionina; HCl de L-ornitina; L-fenilalanina; L-prolina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; 2Na 2 H₂O de L-tirosina; L-valina; D-biotina; cloruro de colina; ácido fólico; mio-inositol; niacinamida; HCl de piridoxina; ácido D-pantoténico; riboflavina; HCl de tiamina; vitamina B12; ácido *p*-aminobenzoico; HCl de etanolamina; Pluronic F68; fosfato de DL- α -tocoferol; ácido linoleico; Na₂SeO₃; ácido tióctico; y glucosa; y, opcionalmente, adenosina; guanosina; citidina; uridina; timidina; e hipoxantina 2Na.

65 En una realización, la osmolaridad de partida de los medios de la invención es de 200-500, 250-400, 275-350 o de aproximadamente 300 mOsm. Durante el crecimiento de las células en el medio de la invención y, en particular, después de cualquier alimentación de acuerdo con un protocolo de alimentación discontinua, la osmolaridad del cultivo puede aumentar hasta aproximadamente 350, 400, 450 o tanto como 500 mOsm.

En algunas realizaciones en las que la osmolaridad del medio definido es inferior a aproximadamente 300, la osmolaridad se llevó a aproximadamente 300 con la adición de una o más sales en exceso de la cantidad especificada. En una realización, la osmolaridad se aumenta hasta un nivel deseado mediante la adición de uno o más de un osmolito seleccionado entre cloruro de sodio, cloruro de potasio, una sal de magnesio, una sal de calcio, una sal de aminoácido, una sal de un ácido graso, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, un quelante que sea una sal, un azúcar (por ejemplo, galactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, fucosa, etc.) y una combinación de los mismos. En una realización, el osmolito se añade por encima y más allá de su concentración en un componente ya presente en el medio definido (por ejemplo, se añade un azúcar por encima y más allá de la concentración especificada para un componente de azúcar).

Todas y cada una de las realizaciones de los medios descritos anteriormente, así como cualquier otro medio sin suero que contenga ornitina a al menos aproximadamente 90 μM (o que contenga una combinación de ornitina a al menos aproximadamente 100 μM , más putrescina a al menos aproximadamente 200 μM) se denominarán de aquí en adelante medios complementados con ornitina ("OS"). Por el contrario, los medios que no contienen ornitina (o ninguna combinación de ornitina/putrescina) o los medios que contienen ornitina a menos de 100 μM (o los medios que contienen ornitina a menos de 100 μM y putrescina a menos de 200 μM), se denominan de aquí en adelante medios no complementados con ornitina (medios "no OS").

CULTIVO CELULAR

La presente invención proporciona un cultivo celular que comprende una estirpe celular que expresa una proteína de interés en un medio OS como se ha descrito anteriormente y como se define en las reivindicaciones. En una realización, el cultivo celular contiene insulina, que puede añadirse como ingrediente en el momento de uso a los medios, o puede incluirse en la formulación de los medios. En una realización, la estirpe celular comprende células capaces de producir una proteína bioterapéutica. Los ejemplos de estirpes celulares que se usan rutinariamente para producir proteínas bioterapéuticas incluyen, entre otras, células primarias, células BSC, células HeLa, células HepG2, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLCPK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK, células BHK-21, células CHO, células CHO-K1, células NS-1, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 3T3, células 293, células RK, células Per.C6 células de embrión de pollo. En una realización, la estirpe celular es una estirpe de células CHO, o una o más de varias variantes específicas de células CHO optimizadas para la producción de proteínas a gran escala, por ejemplo, CHO-K1.

"Cultivo celular" o "cultivo" significa el crecimiento y la propagación de células fuera de un organismo o tejido multicelular. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células de mamífero son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, "Animal cell culture: A Practical Approach", D. Rickwood, ed., Oxford University Press, Nueva York (1992). Las células de mamífero se pueden cultivar en suspensión o mientras están unidas a un sustrato sólido. Los biorreactores de lecho fluidizado, los biorreactores de fibra hueca, los botes de rodillo, los matraces de agitación o los biorreactores de tanque agitado, con o sin microvehículos, y operados de modo discontinuo, de alimentación discontinua, continuo, semicontinuo o de perfusión están disponibles para el cultivo de células de mamífero. Se pueden añadir medios de cultivo celular o medios de alimentación concentrados al cultivo de forma continua o a intervalos durante el cultivo. Por ejemplo, un cultivo puede ser alimentado una vez al día, en días alternos, cada tres días, o puede ser alimentado cuando la concentración de un componente de medio específico, que se esté controlando, esté fuera de un intervalo deseado.

Las células animales, tales como las células CHO, pueden cultivarse en cultivos a pequeña escala, tal como en recipientes de 125 ml que tienen aproximadamente 25 ml de medio, recipientes de 250 ml que tienen de aproximadamente 50 a 100 ml de medios, recipientes de 500 ml que tienen de aproximadamente 100 a 200 ml de medio. Como alternativa, los cultivos pueden ser a gran escala, tales como, por ejemplo, recipientes de 1.000 ml que tienen de aproximadamente 300 a 1.000 ml de medios, recipientes de 3.000 ml que tienen de aproximadamente 500 a 3.000 ml de medios, recipientes de 8.000 ml que tienen de aproximadamente 2.000 ml a 8.000 ml de medios, y recipientes de 15.000 ml que tienen de aproximadamente 4.000 ml a 15.000 ml de medios. Los cultivos para la fabricación pueden contener 10.000 l de medios o más. Los cultivos celulares a gran escala, tales como la fabricación clínica de productos terapéuticos proteicos, normalmente se mantienen durante días, o incluso semanas, mientras que las células producen la/s proteína/s deseada/s. Durante este tiempo, el cultivo se puede complementar con un medio de alimentación concentrado que contenga componentes, tales como nutrientes y aminoácidos, que se consumen en el transcurso del cultivo. El medio de alimentación concentrado puede basarse en cualquier formulación de medios de cultivo celular. Dicho medio de alimentación concentrado puede contener la mayoría de los componentes del medio de cultivo celular a, por ejemplo, aproximadamente x5, x6, x7, x8, x9, x10, x12, x14, x16, x20, x30, x50, x100, x200, x400, x600, x800, o incluso aproximadamente x1.000 de su cantidad útil normal. Los medios de alimentación concentrados se suelen usar en procesos de cultivo discontinuos alimentados.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular se complementa con "adiciones en el momento de uso", también conocidas como adiciones, ingredientes del momento de uso o productos químicos del momento de uso, en el transcurso del crecimiento celular o de la producción de proteínas. Las adiciones en el momento de uso incluyen uno o más de un factor de crecimiento u otras proteínas, un tampón, una fuente de energía, una sal, un aminoácido,

un metal y un quelante. Otras proteínas incluyen transferrina y albúmina. Los factores de crecimiento, que incluyen citocinas y quimiocinas, se conocen, en general, en la técnica, y se sabe que estimulan el crecimiento celular o, en algunos casos, la diferenciación celular. Un factor de crecimiento suele ser una proteína (por ejemplo, insulina), un péptido pequeño o una hormona esteroidea, tal como estrógeno, DHEA, testosterona y similares. En algunos casos, un factor de crecimiento puede ser un producto químico no natural que potencie la proliferación celular o la producción de proteínas, tales como, por ejemplo, tetrahidrofolato (THF), metotrexato y similares. Los ejemplos no limitantes de factores de crecimiento de proteínas y péptidos incluyen angiopoyetinas, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado de estirpe celular glial (GDNF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de las colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF), insulina, factor de crecimiento insulínico (IGF), factor estimulante de la migración, miostatina (GDF-8), factor de crecimiento nervioso (NGF) y otras neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), agonistas de la vía de señalización wnt, factor de crecimiento placentario (PIGF), somatotropina bovina fetal (FBS), interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 y similares. En una realización, el medio de cultivo celular se complementa con la adición en el momento de uso del factor de crecimiento insulina. En una realización, la concentración de insulina en los medios, es decir, la cantidad de insulina en los medios de cultivo celular tras la adición, es de aproximadamente 0,1 μ M a 10 μ M. También se pueden incluir una o más adiciones en el momento de uso en la formulación de los medios de algunas realizaciones.

Los tampones son conocidos en la técnica en general. La invención no se limita a uno ni a varios tampones en particular, y cualquier experto habitual en la materia puede seleccionar un tampón o sistema tampón apropiado para su uso con una determinada estirpe celular productora de una proteína en particular. En una realización, un tampón de adición en el momento de uso es NaHCO_3 . En una realización, el tampón de adición en el momento de uso comprende NaHCO_3 . En otra realización, el tampón es HEPES.

Las fuentes de energía para su uso como una adición en el momento de uso en el cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Sin limitación, en una realización, la fuente de energía de adición en el momento de uso es glucosa. Dados los requisitos particulares y específicos de una determinada estirpe celular y la proteína que se vaya a producir, en una realización, la glucosa se puede añadir a una concentración de aproximadamente 1 a 20 mM en el medio. En algunos casos, la glucosa se puede añadir a niveles altos de hasta 10 g/l.

Los quelantes son asimismo bien conocidos en la técnica de cultivo celular y producción de proteínas. El EDTA tetrasódico deshidratado y el citrato son dos quelantes comunes usados en la técnica, aunque, en la práctica de la presente invención, se pueden emplear otros quelantes. En una realización, un quelante de adición en el momento de uso es EDTA tetrasódico dihidratado. En una realización, un quelante de adición en el momento de uso es citrato, tal como $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.

En una realización, el cultivo celular puede ser complementado con uno o más aminoácidos mediante adición en el momento de uso, tales como, por ejemplo, glutamina. En una realización, los medios de cultivo celular se complementan con la adición de glutamina en el momento de uso a una concentración final de aproximadamente 1 mM a 13 mM.

Otras adiciones en el momento de uso incluyen una o más de diversas sales metálicas, tales como sales de hierro, níquel, cinc y cobre. En una realización, el medio de cultivo celular se complementa con uno o más de entre sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloro férrico; y sulfato de níquel.

En una realización, el medio de cultivo celular se complementa con una cualquiera o más, o todas, las siguientes adiciones en el momento de uso: NaHCO_3 a aproximadamente 29,8 mM, glutamina aproximadamente 2 mM, insulina aproximadamente 0,86 μ M, glucosa aproximadamente 11,1 mM, sulfato de cinc aproximadamente 6,54 μ M, sulfato de cobre aproximadamente 0,168 μ M, cloruro férrico aproximadamente 75 μ M, sulfato de níquel aproximadamente 0,639 μ M, EDTA aproximadamente 85 μ M y citrato aproximadamente 50 μ M.

En una realización, el medio se complementa a intervalos durante el cultivo celular de acuerdo con un procedimiento de alimentación discontinua. El cultivo de alimentación discontinua se conoce en general en la técnica, y se emplea para optimizar la producción de proteína (véase Y. M. Huang *et al.*, *Biotechnol Prog.* Sep-Oct de 2010; 26(5): 1400-10).

La viabilidad celular, la densidad de células viables y la duplicación celular se mejoran con relación a las células cultivadas en cultivo sin ornitina o putrescina. Con respecto a la viabilidad celular, las células cultivadas en medio OS muestran una viabilidad que es al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 %, al menos un 100 % o al menos 3 veces superior a la

viabilidad de células similares o idénticas cultivadas en medios no OS.

- 5 En algunas realizaciones, la velocidad de duplicación de células de mamífero viables en los medios OS es al menos un 5 %, al menos un 6 %, al menos un 7 %, al menos un 8 %, al menos un 9 %, al menos un 10 %, al menos un 11 %, al menos un 12 %, al menos un 13 %, al menos un 14 %, al menos un 15 %, al menos un 16 %, al menos un 17 %, al menos un 18 %, al menos un 19 %, al menos un 20 %, al menos un 21 %, al menos un 22 %, al menos un 23 %, al menos un 24 %, al menos un 25 %, al menos un 26 %, al menos un 27 %, al menos un 28 %, al menos un 29 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 100 % o al menos 3
- 10 veces superior a la velocidad de duplicación de células de mamífero cultivadas en medios no OS. En algunas realizaciones, la velocidad de duplicación de células de mamífero viables en los medios OS es aproximadamente un 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 % superior a la velocidad de duplicación de células de mamífero de medios no OS.
- 15 En algunas realizaciones, el tiempo de duplicación de células de mamífero en ciclo activo es inferior a 30 horas, inferior a 29 horas, inferior a 28 horas, inferior a 27 horas, inferior a 26 horas, inferior a 25 horas, inferior a 24 horas, inferior a 23 horas, inferior a 22 horas, inferior a 21 horas, inferior a 20 horas, inferior a 19 horas o inferior a 18 horas en medios OS. En algunas realizaciones, el tiempo de duplicación de células de mamífero que crecen activamente es inferior a 28 horas en medios OS. En algunas realizaciones, el tiempo de duplicación de las células de mamífero
- 20 es de aproximadamente 27 ± 1 horas, aproximadamente 26 ± 1 horas, aproximadamente 25 ± 1 horas, aproximadamente 24 ± 1 horas, aproximadamente 23 ± 1 horas, aproximadamente 22 ± 1 horas o aproximadamente 21 ± 1 horas en medios OS. En algunas realizaciones, el tiempo de duplicación de células de mamífero en ciclo activo es de aproximadamente 24 ± 1 horas en medios OS. En algunas realizaciones, el tiempo de duplicación de células que se dividen de forma activa en los medios OS es al menos un 15 %, al menos un 16 %, al menos un
- 25 17 %, al menos un 18 %, al menos un 19 %, al menos un 20 % o al menos un 25 % inferior al tiempo de duplicación de células en ciclo activo cultivadas en medios no OS.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

- 30 Además de los medios OS definidos químicamente y los métodos de cultivo de células en medios OS, la presente invención proporciona métodos de producción de una proteína, tal como un anticuerpo terapéuticamente eficaz u otra sustancia farmacológica biofarmacéutica, en una célula cultivada en medios OS y como se define en las reivindicaciones.
- 35 En algunas realizaciones, la velocidad de producción de proteína por células de mamífero cultivadas en medios OS es al menos un 5 %, 10 %, 15 % o 20 % superior a la velocidad de producción de la proteína por una célula de mamífero idéntica cultivada en medios no OS. En algunas realizaciones, la velocidad de producción de proteína en células cultivadas en medio OS es de al menos 1 pg/célula/día ("PCD"), al menos 2 PCD, al menos 3 PCD, al menos 4 PCD, al menos 5 PCD, al menos 6 PCD, al menos 7 PCD, al menos 8 PCD, al menos 9 PCD, al menos 10 PCD, al
- 40 menos 15 PCD, al menos 20 PCD, al menos 25 PCD, al menos 30 PCD, al menos 35 PCD, al menos 40 PCD, al menos 45 PCD, al menos 50 PCD, al menos 75 PCD o al menos 100 PCD.
- 45 En algunas realizaciones, el rendimiento de la producción o título de proteína, que se puede expresar en gramos de producto de proteína por litro de medio de cultivo, de las células cultivadas en medios OS es de al menos 100 mg/l, al menos 1 g/l, al menos 1,2 g/l, al menos 1,4 g/l, al menos 1,6 g/l, al menos 1,8 g/l, al menos 2 g/l, al menos 2,5 g/l, al menos 3 g/l, al menos 3,5 g/l, al menos 4 g/l, al menos 4,5 g/l, al menos 5 g/l, al menos 5,5 g/l, al menos 6 g/l, al menos 6,5 g/l, al menos 7 g/l, al menos 7,5 g/l, al menos 8 g/l, al menos 8,5 g/l, al menos 9 g/l, al menos 9,5 g/l, al menos 10 g/l o al menos 20 g/l.
- 50 En algunas realizaciones, el producto proteico (la proteína de interés) es un anticuerpo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno, un anticuerpo monocatenario, un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo, un fragmento Fab o un fragmento $F(ab')_2$, un anticuerpo IgD, un anticuerpo IgE, un anticuerpo IgM, un anticuerpo IgG, un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 o un anticuerpo
- 55 IgG4. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4.
- 60 En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína recombinante que contiene una fracción Fc y otro dominio, (por ejemplo, una proteína de fusión Fc). En algunas realizaciones, una proteína de fusión Fc es una proteína de fusión de receptor y Fc, "Las proteínas de fusión del receptor y Fc" comprenden uno o más dominios extracelulares de un receptor acoplado a una fracción Fc. En algunas realizaciones, la fracción Fc comprende una región bisagra seguida de un dominio CH2 y CH3 de una IgG. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de receptor y Fc contiene dos o más cadenas de receptor distintas que se unen bien a un solo ligando o a múltiples
- 65 ligandos. Por ejemplo, una proteína de fusión Fc es una TRAP, tal como, por ejemplo, una IL-1 TRAP (por ejemplo, rilonacept, que contiene la región de unión al ligando IL-1RAcP fusionada a la región extracelular de IL-1R1 fusionada a Fc de hlgG1; véase la patente de EE.UU. n.º 6.927.004, o una VEGF TRAP (por ejemplo, aflibercept, que contiene

el dominio de Ig 2 del receptor Flt1 de VEGF fusionado al dominio de Ig 3 del receptor Flk1 de VEGF fusionado a Fc de hlgG1; Véanse las patentes de EE.UU. n.º 7.087.411 y 7.279.159).

La presente invención no se limita a ningún tipo particular de célula para la producción de proteínas. Los ejemplos de tipos de células adecuados para la producción de proteínas incluyen células de mamífero, células de insecto, células aviarias, células bacterianas y células de levadura. Las células pueden ser células madre o células recombinantes transformadas con un vector para la expresión génica recombinante, o células transfectadas con un virus para producir productos víricos. Las células pueden contener una construcción de polinucleótido heterólogo recombinante codificante de una proteína de interés. Esa construcción puede ser un episoma o puede ser un elemento que esté físicamente integrado en el genoma de la célula. Las células también pueden producir una proteína de interés sin tener esa proteína codificada en una construcción polipeptídica heteróloga. En otras palabras, la célula puede codificar de forma natural la proteína de interés, tal como un linfocito B productor de un anticuerpo. Las células también pueden ser células primarias, tales como células embrionarias de pollo o estirpes celulares primarias. Los ejemplos de células útiles incluyen células BSC, células LLC-MK, células CV-1, células COS, células VERO, células MDBK, células MDCK, células CRFK, células RAF, células RK, células TCMK-1, células LLCPK, células PK15, células LLC-RK, células MDOK, células BHK-21, células embrionarias de pollo, células NS-1, células MRC-5, células WI-38, células BHK, células 293, células RK, células Per.C6 y células CHO. En diversas realizaciones, la estirpe celular es un derivado de células CHO, tal como las estirpes mutantes CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO o CHO lec.

En una realización, la célula, que es una célula CHO, expresa ectópicamente una proteína. En una realización, la proteína comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina, tal como la región CH1, CH2 o CH3. En una realización, la proteína comprende una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina humana o de roedor. En una realización, la proteína comprende una región de CH1, CH2 y CH3 de inmunoglobulina humana o de roedor. En una realización, la proteína comprende una región de bisagra y una región CH1, CH2 y CH3. En una realización específica, la proteína comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización específica, la proteína comprende un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización específica, la proteína comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina y un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización específica, la proteína es un anticuerpo, tal como un anticuerpo humano, un anticuerpo de roedor o un anticuerpo quimérico humano/de roedor (por ejemplo, humano/de ratón, humano/de rata o humano/de hámster).

Una fase de producción puede realizarse a cualquier escala del cultivo, desde matraces individuales y matraces de agitación o bolsas de onda, a biorreactores de un litro y a biorreactores industriales a gran escala. Se puede realizar un proceso a gran escala en un volumen de aproximadamente 100 litros a 20.000 litros o más. Se pueden usar uno o más de varios medios para controlar la producción de proteína, tal como el cambio de temperatura o la inducción química. Una fase de crecimiento se puede producir a una temperatura más alta que una fase de producción. Por ejemplo, una fase de crecimiento puede producirse a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a 38 °C, y una fase de producción puede producirse a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a 37 °C, opcionalmente, de aproximadamente 30 °C a 36 °C o de aproximadamente 30 °C a 34 °C. Además, se pueden añadir inductores químicos de la producción de proteínas, tales como cafeína, butirato, tamoxifeno, estrógeno, tetraciclina, doxiciclina y hexametileno-bisacetamida (HMBA), simultáneamente, antes o después de un cambio de temperatura. Si se añaden inductores después de un cambio de temperatura, se pueden añadir de una hora a cinco días después del cambio de temperatura, tal como de uno a dos días después del cambio de temperatura. Los cultivos de células de producción pueden realizarse como un sistema de cultivo de alimentación continua, como en un quimiostato (véase C. Altamirano *et al.*, *Biotechnol Prog.* nov-dic de 2001; 17(6): 1032-41), o de acuerdo con un proceso de alimentación discontinua (Huang, 2010).

La invención es útil para mejorar la producción de proteínas a través de los procesos de cultivo celular. Las estirpes celulares usadas en la invención pueden modificarse genéticamente para expresar un polipéptido de interés comercial o científico. La ingeniería genética de la estirpe celular implica transfectar, transformar o transducir las células con una molécula de polinucleótido recombinante, o modificarla de otra manera (por ejemplo, mediante recombinación homóloga y activación génica, o fusión de una célula recombinante con una célula no recombinante) para hacer que la célula hospedadora exprese un polipéptido recombinante deseado. Los métodos y vectores para diseñar genéticamente células o estirpes celulares para que expresen un polipéptido de interés son bien conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, diversas técnicas se ilustran en "Current Protocols in Molecular Biology". Ausubel *et al.*, ed. (Wiley & Sons, Nueva York, 1988, y actualizaciones trimestrales); Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., "Large Scale Mammalian Cell Culture", 1990, pág. 15-69. Hay una amplia variedad de estirpes celulares adecuadas para el crecimiento en cultivo disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA) y en proveedores comerciales. Los ejemplos de estirpes celulares comúnmente usadas en la industria incluyen VERO, BHK, HeLa, CVI (incluyendo Cos), MDCK, 293, 3T3, estirpes celulares de mieloma (por ejemplo, NSO, NSI), PC12, células WI38 y células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO se usan ampliamente para la producción de proteínas recombinantes complejas, tales como citocinas, factores de coagulación y anticuerpos (Brasel *et al.* (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman *et al.* (1988), *J.Biol Chem* 263:6352-6362; McKinnon *et al.* (1991), *J Mol Endocrinol* 6:231-239; Wood *et al.* (1990), *J Immunol.* 145:3011-3016). Las estirpes celulares mutantes deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR)

(Urlaub *et al.* (1980), *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 77: 4216-4220), DXBI 1 y DG-44, son estirpes de células hospedadoras deseables CHO, porque el sistema de expresión génica seleccionable y amplificable eficiente en DHFR permite la expresión de proteínas recombinantes de alto nivel en estas células (Kaufman R. J. (1990), *Meth Enzymol* 185:537-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o en suspensión, y presentan una estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y las proteínas expresadas de forma recombinante por las mismas se han caracterizado ampliamente y han sido aprobadas para su uso en la fabricación clínica y comercial por agencias reguladoras. En algunas realizaciones, las estirpes celulares CHO son estirpes celulares como las descritas en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2010/0304436 A1, 2009/0162901 A1 y 2009/0137416 A1, y las patentes de EE.UU. n.º 7.455.988 B2, 7.435.553 B2 y 7.105.348 B2.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que pretenden ser ilustraciones de aspectos o realizaciones individuales de la invención según lo definido en las reivindicaciones.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la adición de ornitina o de una combinación de ornitina y putrescina a medios de cultivo celular sin suero produce un aumento del crecimiento celular, de la viabilidad celular y de la producción de polipéptido a partir de una estirpe celular animal diseñada de forma recombinante (o célula natural) que exprese una proteína de interés, potenciando de este modo la solidez del cultivo, mejorando el rendimiento del polipéptido de interés.

Ejemplo 1: Mejora de la densidad del cultivo celular viable

Se inoculó un matraz de agitación de 250 ml de un cultivo de siembra de una estirpe celular productora de anticuerpo recombinante derivada de CHO K1. Las células inoculadas se cultivaron a 36,5 °C durante siete días y se alimentaron con glucosa los días tres y cinco. Se cultivaron células en cada uno de dos medios separados químicamente definidos (sin hidrolizados y sin suero). El primer medio contenía aminoácidos aproximadamente 75 mM (Medio 1), el segundo medio contenía aminoácidos aproximadamente 40 mM (Medio 2), y ambas formulaciones contenían putrescina a no más de 2,5 µM (0,4 mg/l). Se generó otro grupo de condiciones de medio añadiendo hidrolizado de soja a una concentración de 7,5 g/l al Medio 2. A cada uno de los tres medios de control, se añadieron ornitina aproximadamente 593 µM (en forma de HCl de L-ornitina a 100 mg/l) o una combinación de ornitina aproximadamente 593 µM (en forma de HCl de L-ornitina a 100 mg/l) y putrescina aproximadamente 714 µM (en forma de 2HCl de putrescina a 115 mg/l). Se extrajeron alícuotas de 3 ml de cultivo los días 3, 5 y 7, y se realizaron los recuentos de células viables usando exclusión con azul de tripano en un instrumento BioProfile FLEX™ (Nova Biomedical). El día cero, todos los cultivos contenían 0,8 x 10⁶ células viables por ml. Para un medio dado (Medio 1, Medio 2 o Medio 2 + Soja), los recuentos de células viables durante un período de siete días revelaron que las células CHO crecidas en medios suplementados con ornitina u ornitina más putrescina tenían mayores densidades de células viables. El efecto fue especialmente destacado en los medios sin hidrolizado (es decir, aumento de 2 veces a 4 veces o más en la densidad de células viables) durante el período de siete días. El Medio 2 OS sin hidrolizados fue comparable al Medio 2 no OS que contenía soja, lo que indica que el beneficio en el crecimiento celular del hidrolizado de soja puede replicarse mediante el reemplazo de la ornitina. También se observó una mayor densidad celular al añadir ornitina u ornitina y putrescina al Medio 2 + soja. Los resultados se presentan en la tabla 1.

TABLA 1: DENSIDAD MEDIA DE CÉLULAS VIABLES DEL CULTIVO (10⁶ CÉLULAS POR MILILITRO) Y AUMENTO CON RESPECTO AL MOMENTO BASAL*

Complemento:	Tiempo	Sin complementos	Ornitina	Ornitina + putrescina
Medio 1	3 días	2,4 / x1	6,1 / x2,5	5,0 / x2,1
	5 días	3,4 / x1	12,6 / x3,7	12,4 / x3,6
	7 días	3,6 / x1	7,0 / x1,9	6,8 / x1,9
Medio 2	3 días	1,7 / x1	5,1 / x3,0	5,2 / x3,1
	5 días	2,0 / x1	7,6 / x3,8	8,0 / x4,0
	7 días	1,6 / x1	5,9 / x3,7	5,8 / x3,6
Medio 2 + hidrolizado de soja	3 días	5,2 / x1	5,4 / x1	4,7 / x0,9
	5 días	7,7 / x1	9,3 / x1,2	9,3 / x1,2
	7 días	ND	9,6 / ND	9,1 / ND

*El momento basal es medios sin complementar para una formulación de medio dada en un día dado.

También se examinó el efecto de diversas cantidades de HCl de ornitina (es decir, 50 mg/l, 100 mg/l y 150 mg/l) sobre la densidad de células viables en el Medio 3, que contiene aminoácidos aproximadamente 75 mM y HCl de putrescina a 0,4 mg/l ("Medio 3"). Se usó un solo cultivo de tren de siembra de una estirpe celular productora de anticuerpos recombinante derivada de CHO K1 para inocular biorreactores TubeSpin® (TPP) de 50 ml a 0,4 x 10⁶ células/ml a un volumen de trabajo de 15 ml. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C durante tres días.

Se extrajeron alícuotas de 3 ml de cultivo el día 3, y se realizaron los recuentos de células viables usando exclusión con azul de tripano en un instrumento BioProfile FLEX™ (Nova Biomedical). Los tres niveles de ornitina mejoraron la densidad celular como media (N = 3) en algo más del doble. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

5 TABLA 2: DENSIDAD DE CÉLULAS VIABLES DEL CULTIVO (10⁶ CÉLULAS POR MILILITRO) Y AUMENTO CON RESPECTO AL MOMENTO BASAL*

	Control	HCl de L-ornitina		
Concentración (mg/l)	0	50	100	150
Densidad de células viables (10 ⁶ células/ml)	1,3	3,2	3,1	3,1
Aumento frente al control	x1	x2,5	x2,4	x2,4
*El momento basal es el Medio 3 sin complementos.				

Ejemplo 2: Mejora del tiempo de duplicación del cultivo celular

10 Se determinó el tiempo de duplicación de una estirpe celular productora de anticuerpos recombinante derivada de células CHO K1 en fase de crecimiento logarítmico en diversas condiciones de medios de cultivo celular. Se pasaron cultivos de tren de siembra a 36,5 °C en matraces de agitación de 250 ml durante un período de 14 días en cada uno de tres medios separados: Medio 1, Medio 2 y Medio 2 que contenía hidrolizado de soja (Medio 2 + Soja). Se retiraron alícuotas de 1 ml de cada condición en el día 0 y en el momento de la pasada del tren de siembra (cada 2 o 15 3 días), y se realizaron los recuentos de las células viables usando exclusión con azul tripano en un instrumento CDV™ (Nova Biomedical). El Medio 1 se ensayó sin complementos o complementado con HCl de ornitina a 100 mg/l o tanto 2HCl de putrescina a 115 mg/l como HCl de ornitina a 100 mg/l. El Medio 2 con poco 2HCl de putrescina (0,4 mg/l) se ensayó sin complementos o complementado con HCl de ornitina a 100 mg/l o tanto con 2HCl de putrescina a 115 mg/l como con HCl de ornitina a 100 mg/l. Los resultados se presentan en las Tablas 3 y 4. Se requirió la administración de complemento de ornitina, con o sin putrescina, al Medio 1 para lograr un crecimiento significativo. La administración del complemento de ornitina o de ornitina + putrescina al Medio 2 sin hidrolizados disminuyó el tiempo de duplicación celular en de aproximadamente un 25 % a un 30 %. Los tiempos de duplicación también se redujeron en menor medida con la adición de ornitina u ornitina + putrescina al Medio 2 que contenía hidrolizados.

25 TABLA 3: TIEMPO DE DUPLICACIÓN CELULAR (HORAS) Y PORCENTAJE APROXIMADO DE REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN CON RESPECTO AL MOMENTO BASAL* EN EL MEDIO 1

Complemento	Medio 1	
*Ninguno	75	
Ornitina	23	69 %
Putrescina + ornitina	21	72 %
*El momento basal es el Medio 1 sin complementos.		

30 TABLA 4: TIEMPO DE DUPLICACIÓN CELULAR (HORAS) Y PORCENTAJE APROXIMADO DE REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN CON RESPECTO AL MOMENTO BASAL* EN EL MEDIO 2

Complemento	Medio 2		Medio 2 + soja	
*Sin complementos	27		22,5	
Ornitina	21	22 %	20,5	8,9 %
Putrescina + ornitina	19,5	28 %	21	6,7 %
*El momento basal es el Medio 2 sin complementos.				

Ejemplo 3: Mejora de los títulos de anticuerpos

35 Habiéndose establecido que la inclusión de ornitina u ornitina + putrescina mejora la proliferación celular y la densidad de las células viables en cultivo, se investigó además el efecto de esas condiciones en los títulos de producción de proteínas recombinantes. Se examinó la expresión y secreción de IgG recombinante por una estirpe celular derivada de CHO-K1. En este experimento, el título medio de anticuerpos se determinó el día siete en cultivo en diversos formatos de medios. Al igual que en el caso anterior, Se ensayaron el Medio 1 con bajo contenido de putrescina (2HCl de putrescina a 0,4 mg/l), con ornitina (HCl de ornitina a 100 mg/l, y tanto con ornitina como con 40 putrescina (HCl de ornitina a 100 mg/l/2HCl de putrescina a 115 mg/l). También se ensayaron el Medio 2 y el Medio 2 + soja con bajo contenido de putrescina (2HCl de putrescina a 0,4 mg/l) con ornitina (HCl de ornitina a 100 mg/l), y tanto con ornitina como con putrescina (HCl de ornitina a 100 mg/l/2HCl de putrescina a 115 mg/l). En todos los casos, la inclusión de ornitina u ornitina y putrescina a un nivel superior a 0,4 mg/l produjo un título de proteína significativamente mayor, es decir, títulos de al menos aproximadamente el doble. Los resultados se presentan en la 45 Tabla 5.

TABLA 5: TÍTULOS MEDIOS DE ANTICUERPOS DE SIETE DÍAS Y AUMENTO APROXIMADO (X) EN EL TÍTULO CON RESPECTO AL MOMENTO BASAL*

Complemento	Medio 1		Medio 2		Medio 2 + soja	
Sin complementos*	0,31 g/l	x1	0,29 g/l	x1	0,54 g/l	x1
Ornitina	0,94 g/l	x3,0	0,65 g/l	x2,2	0,98 g/l	x1,8
Putrescina + ornitina	0,95 g/l	x3,1	0,64 g/l	x2,2	1,07 g/l	x2

*El momento basal se establece en el título para los medios sin complementos de cada tipo.

5 También se examinó el efecto de diversas cantidades de HCl de ornitina (es decir, 50 mg/l, 100 mg/l y 150 mg/l) en el Medio 3 sobre la producción de anticuerpos. Se usó un solo cultivo de tren de siembra de una estirpe celular productora de anticuerpos recombinante derivada de CHO K1 para sembrar biorreactores TubeSpin® (TPP) de 50 ml a $0,4 \times 10^6$ células/ml a un volumen de trabajo de 15 ml. Las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C durante tres días. Los tres niveles de complementos de ornitina mejoraron el título de anticuerpos como media (N = 3) en algo más del 50 %. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

10

TABLA 6: TÍTULOS DE ANTICUERPOS (GRAMOS POR LITRO) Y AUMENTO EN EL TÍTULO FRENTE AL MOMENTO BASAL*

	Control	HCl de ornitina		
Concentración de complemento (mg/l)	0	50	100	150
Título de anticuerpos (g/l)	79	120	127	124
Aumento frente al control	x1	x1,5	x1,6	x1,6

*El momento basal es el Medio 3 sin complementos.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular, que es sin suero, que comprende ornitina $\geq 0,09 \text{ mM} \pm 0,014 \text{ mM}$ y putrescina $\geq 0,20 \pm 0,03 \text{ mM}$.
- 5 2. El medio de cultivo celular de la reivindicación 1 que comprende ornitina $0,3 \pm 0,05 \text{ mM}$ a $0,9 \pm 0,14 \text{ mM}$.
3. El medio de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende:
- 10 (a) ornitina a $0,6 \pm 0,09 \text{ mM}$; y/o
(b) putrescina a $0,714 \pm 0,11 \text{ mM}$.
4. El medio de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- 15 (a) el medio es sin hidrolizados o está químicamente definido;
(b) el medio comprende $\geq 40 \pm 6 \text{ mM}$ de una mezcla de aminoácidos o sales de los mismos, preferentemente, en el que la mezcla de aminoácidos consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;
- 20 (c) el medio comprende uno o más ácidos grasos, preferentemente, en el que el uno o más ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en ácido linoleico, ácido linolénico, ácido tióctico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido láurico, ácido behénico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido hexanoico, ácido lignocérico, ácido mirístico y ácido octanoico;
- 25 (d) el medio comprende una mezcla de nucleósidos, preferentemente, en el que la mezcla de nucleósidos comprende uno o más de adenosina, guanosina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina;
- (e) el medio comprende adenosina, guanosina, citidina, uridina, timidina e hipoxantina;
- (f) el medio comprende uno o más cationes divalentes, preferentemente, en el que el catión divalente es magnesio, calcio o ambos; y/o
- 30 (g) el medio de cultivo comprende Ca^{2+} y Mg^{2+} .
5. Un método para cultivar células, que comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y (b) propagar o mantener una célula en el medio de cultivo celular para formar un cultivo celular.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que:
- (a) la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula de mamífero, célula aviar, célula de insecto, célula bacteriana y célula de levadura, preferentemente, en el que la célula es una célula CHO; y/o
- 40 (b) la célula expresa una proteína de interés.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la célula expresa una proteína de interés, en el que:
- (a) la proteína de interés es una proteína de unión a antígeno;
- (b) la proteína de interés comprende un dominio Fc; y/o
- 45 (c) la proteína de interés es una proteína de fusión de receptor-Fc, preferentemente, en el que la proteína de fusión de receptor-Fc es una proteína Trap.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la proteína de interés es una proteína de fusión de receptor-Fc que es una proteína Trap, en el que la proteína Trap es un antagonista de IL-1 o un antagonista de VEGF.
- 50 9. El método de la reivindicación 6, en el que la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, preferentemente, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo humano recombinante o fragmento del mismo.
- 55 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que:
- (a) las células tienen un tiempo medio de duplicación de ≤ 30 horas;
- (b) las células tienen un tiempo medio de duplicación de ≤ 24 horas;
- 60 (c) las células tienen un tiempo medio de duplicación que es al menos un tercio del de las células cultivadas en un medio de cultivo celular que contiene ornitina $< 0,3 \pm 0,045 \text{ mM}$ y putrescina $< 0,2 \pm 0,03 \text{ mM}$;
- (d) el cultivo celular es capaz de alcanzar una densidad de recuento de células viables que es al menos un 15 % superior a la de un cultivo celular similar en un medio que contiene ornitina $< 0,09 \pm 0,014 \text{ mM}$ y putrescina $< 0,2 \pm 0,03 \text{ mM}$;
- 65 (e) el cultivo celular es capaz de alcanzar una densidad de recuento de células viables que es al menos 3 veces superior a la de un cultivo celular similar en un medio de cultivo celular similar que contiene ornitina $< 0,09 \pm 0,014 \text{ mM}$ y putrescina $< 0,2 \pm 0,03 \text{ mM}$; y/o

- (f) el método que comprende la etapa de añadir una o más adiciones en el momento de uso al medio de cultivo celular, preferentemente, en el que las adiciones en el momento de uso comprenden una de más de NaHCO₃, glutamina, insulina, glucosa, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, NiSO₄, EDTA de Na₄ y citrato de Na₃ y/o cada uno de NaHCO₃, glutamina, insulina, glucosa, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, NiSO₄, EDTA de Na₄ y citrato de Na₃ se añaden al medio como adiciones en el momento de uso.
- 5
11. Un método de producción de una proteína que comprende las etapas de:
- (a) introducir, en una célula, un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína de interés;
- 10 (b) seleccionar una célula que porte el ácido nucleico;
- (c) cultivar la célula seleccionada en un medio de cultivo celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10; y
- 15 (d) expresar la proteína de interés en la célula, de modo que la proteína de interés se secrete en el medio.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la célula es una célula CHO, célula 293 o célula BHK.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que:
- 20 (a) la proteína de interés es una proteína de unión a antígeno;
- (b) la proteína de interés comprende un dominio Fc; y/o
- (c) la proteína de interés se selecciona del grupo que consiste en proteína de fusión de receptor-Fc (TRAP), proteína de fusión de TCR-Fc soluble, anticuerpo, proteína de fusión Fc y proteína ScFv.
- 25 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que:
- (a) la proteína de interés se produce a un título medio de 7 días que es al menos un 7 % superior al título medio de 7 días producido por una célula similar en un medio de cultivo celular que contiene ornitina a menos de 0,09 ± 0,014 mM y putrescina a menos de 0,2 ± 0,03 mM;
- 30 (b) la proteína de interés se produce a un título medio de 7 días que es al menos un 14 % superior al título medio de 7 días producido por una célula similar en un medio de cultivo celular que contiene ornitina a menos de 0,09 ± 0,014 mM y putrescina a menos de 0,2 ± 0,03 mM;
- (c) la proteína de interés se produce a un título medio de 7 días que es al menos un 80 % superior al título medio de 7 días producido por una célula similar en un medio de cultivo celular que contiene ornitina a menos de 0,09 ± 0,014 mM y putrescina a menos de 0,2 ± 0,03 mM;
- 35 (d) la proteína de interés se produce a un título medio de 7 días que es al menos 2 veces superior al título medio de 7 días producido por una célula similar en un medio de cultivo celular que contiene ornitina a menos de 0,09 ± 0,014 mM y putrescina a menos de 0,2 ± 0,03 mM; y/o
- (e) la proteína de interés se produce a un título medio de 7 días que es al menos 3 veces superior al título medio de 7 días producido por una célula similar en un medio de cultivo celular que contiene ornitina a menos de 0,09 ± 0,014 mM y putrescina a menos de 0,2 ± 0,03 mM.
- 40
15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la proteína de interés es un anticuerpo humano recombinante.