

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 434**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2017 E 17160020 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3372670**

54 Título: **Medios de cultivo que comprenden dipéptidos de N-acil-X-glutamina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2019

73 Titular/es:

**EVONIK TECHNOCHEMIE GMBH (100.0%)
Gutenbergstrasse 2
69221 Dossenheim, DE**

72 Inventor/es:

**KNAUP, GÜNTER y
MERZ, FRIEDHELM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 724 434 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

Medios de cultivo que comprenden dipéptidos de N-acil-X-glutamina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos de producción biotecnológicos. Más específicamente, la presente invención se refiere a medios de cultivo mejorados para uso en procedimientos de producción biotecnológicos y a procedimientos que emplean dichos medios mejorados

Antecedentes de la invención

10 Los procedimientos biotecnológicos son ampliamente utilizados para la producción de productos biológicos. Estos procedimientos implican típicamente el cultivo de células en un medio de cultivo en condiciones permisibles para el crecimiento y la formación del producto por parte de las células cultivadas. Células útiles en la producción biotecnológica son células bacterianas, células fúngicas, células de levadura y células de origen animal o vegetal. El cultivo de células animales se ha utilizado durante mucho tiempo para la producción de productos biológicos, tales como proteínas terapéuticas, polipéptidos, péptidos u otras moléculas biológicas, tales como polisacáridos terapéuticos. En este tipo de procedimientos de cultivo celular, las células animales, normalmente modificadas genéticamente para producir un producto deseado, se cultivan en un medio de cultivo líquido, sólido o semisólido para la proliferación celular y la formación del producto. Una ventaja significativa del cultivo celular es el hecho de que las células animales y las células vegetales pueden realizar modificaciones postraduccionales del producto primario, tal como el plegado y la modificación postraduccional de un polipéptido.

20 En procedimientos de producción biotecnológica, en particular en cultivos de células animales, el control y la optimización de las condiciones del cultivo celular es crítico para la proliferación celular y la formación de productos. Un factor decisivo es la composición del medio. La concentración y la calidad del producto de cultivo celular final dependen en gran medida de la composición del medio. Los cultivos de células animales y vegetales son particularmente exigentes en términos de la composición de nutrientes y las condiciones de cultivo requeridas. Los nutrientes requeridos no solo incluyen fuentes básicas de carbono, nitrógeno y energía, tal como azúcar y amoníaco, sino también nutrientes más complejos, tales como aminoácidos esenciales y vitaminas. Por esta razón, la complementación de medios de cultivo de células animales con composiciones de nutrientes complejas, tal como el suero, se ha utilizado para proporcionar a las células animales una amplia diversidad de nutrientes. Sin embargo, los problemas de seguridad y reglamentarios, así como los problemas con la heterogeneidad de las fuentes disponibles de sueros, han llevado a la industria a esforzarse por eliminar el suero y otros medios no definidos de los procedimientos de cultivo celular industriales. Los cultivos celulares cultivados en medios exentos de suero, sin embargo, muestran a menudo deficiencias nutricionales. Por este motivo, se ha realizado un gran esfuerzo para identificar los componentes nutricionales de medios complejos, así como sus concentraciones óptimas, que se requieren para un crecimiento satisfactorio y la formación de proteínas en cultivos celulares.

35 Se sabe que el suministro de cultivos celulares con aminoácidos tiene un efecto significativo en la tasa de crecimiento y la producción. Glutamina se utiliza rutinariamente en medios de cultivo celular, ya que es una fuente importante de carbono, nitrógeno y energía para las células cultivadas. Se demostró que la cantidad de glutamina necesaria para el crecimiento óptimo de los cultivos de células animales es de 3 a 10 veces mayor que la cantidad de otros aminoácidos (Eagle et al., Science 130:432-37). Sin embargo, la glutamina como nutriente es inestable cuando se disuelve en agua a temperaturas elevadas, tales como las condiciones de esterilización por calor, porque el piroglutamato y el amoníaco se forman bajo calor (Roth et al. 1988, In Vitro Cellular & Developmental Biology 24 (7): 696-98). Por esta razón, el glutamato se utiliza a menudo en medios de cultivo celular en lugar de glutamina (Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies, 52, Sadettin et al., Eds., Taylor and Francis Group, 2006). Otros grupos han intentado evitar la formación de sustancias no deseadas, tales como piroglutamato y amoníaco, mediante la adición de dipéptidos que contienen glutamina, tales como alanil-glutamina o glicil-glutamina, al medio de cultivo celular (Roth et al. (1988), In Vitro Cellular & Developmental Biology 24(7): 696-98). Sin embargo, otros grupos han propuesto acilar dipéptidos con el fin de hacerlos más estables en condiciones de esterilización por calor. El documento US 5.534.538 describe dipéptidos de N-acilo y su uso en productos de nutrición enteral o parenteral esterilizados por calor.

50 Los documentos EP 0220379 y DE3538310 describen el uso de dipéptidos y tripéptidos que contienen glutamina en medios de cultivo celular. La glutamina se añade en forma de dipéptidos con el fin de evitar problemas derivados de la inestabilidad de la glutamina a temperaturas elevadas. Los dipéptidos que contienen glutamina se utilizan como una fuente de glutamina insensible a la temperatura.

El documento JP61271985 describe un medio de cultivo útil para células animales que incluye los dipéptidos Xxx-L-glutamina, en donde Xxx es glicina, D/L-alanina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-valina, L-leucina, L-serina, L-lisina o L-fenilalanina.

5 Si bien los medios de cultivo celular descritos en la técnica anterior proporcionan un rendimiento y propiedades satisfactorias para determinados procedimientos de cultivo celular, todavía existe la necesidad de medios de cultivo celular que fomenten la formación mejorada de productos en procedimientos de producción biotecnológica.

La presente invención

En el contexto de la presente invención, se encontró que los siguientes medios de cultivo celular aumentan la productividad de los procedimientos de producción biotecnológicos:

10 Medios de cultivo celular que comprenden L-glutamina de un conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q y L-glutamina de un conjunto de otras fuentes de glutamina Qsource en una relación molar definida $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$;

en donde X se define como un L-aminoácido;

en donde Q se define como L-glutamina unida a través de un enlace amida a L-aminoácido X;

15 en donde Acil se define como un resto acilo C₁-C₇ unido a través de un enlace amida al extremo amino del L-aminoácido X;

en donde R se define para estar en el intervalo de 0,03 a 20;

en donde n(Acil-X-Q) es la cantidad total de sustancia de L-glutamina contenida en el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q en los medios de cultivo; y

20 en donde n(Qsource) es la cantidad total de sustancia de L-glutamina contenida en el conjunto de otras fuentes de glutamina Qsource en los medios de cultivo,

en donde los constituyentes del conjunto de otras fuentes de L-glutamina (Qsource) se seleccionan de lo siguiente: L-glutamina libre, dipéptidos Y-Q o mezclas de los mismos, en donde Y se define como uno de los 20 L-aminoácidos genéticamente codificados, en donde Q se define como L-glutamina unida a través de un enlace amida a L-aminoácido Y, en donde el enlace amida que conecta Y y Q en el dipéptido Y-Q es un enlace amida de la cadena principal regular que implica el extremo carboxi del aminoácido Y y el extremo amino de glutamina Q.

25

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a medios de cultivo arriba descritos. La presente invención se refiere, además, al uso de tales medios de cultivo celular para cultivar células, así como a procedimientos para la fabricación de productos de cultivo celular, que comprenden la etapa: poner en contacto células con un medio de cultivo celular tal como se describe en esta memoria.

30

Descripción detallada de la invención

Un "medio de cultivo", de acuerdo con la invención, debe entenderse como un medio líquido o sólido que contiene nutrientes, siendo el medio adecuado para nutrir y soportar la vida y/o la formación de productos de células en el cultivo. Las células cultivadas, de acuerdo con la invención, pueden ser células bacterianas, células de levadura,

35 células fúngicas, células animales, tales como células de mamíferos o células de insectos, y/o células vegetales, p. ej., algas. Típicamente, un medio de cultivo proporciona aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, al menos una fuente de energía, lípidos y oligoelementos, todos ellos requeridos por la célula para mantener la vida, el crecimiento y/o la formación del producto. El medio de cultivo también puede contener componentes que potencian el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluidas las hormonas y los factores de crecimiento. El medio de cultivo tiene preferiblemente un pH y una concentración de sal que mantiene la vida, el crecimiento y/o la formación de productos de las células. Un medio de cultivo, de acuerdo con la invención, comprende preferiblemente todos los nutrientes necesarios para mantener la vida y la proliferación del cultivo celular. Medios de cultivo preferidos son medios definidos.

40

Un "medio definido químicamente", de acuerdo con la invención, es un medio que no contiene extractos celulares, hidrolizados celulares o hidrolizados de proteínas. Los medios químicamente definidos no comprenden componentes de composición desconocida. Tal como se entiende comúnmente por el experto en la materia, medios químicamente definidos están habitualmente libres de componentes derivados de animales. Todos los componentes de un medio químicamente definido tienen una estructura química conocida. Medios de cultivo distintos de los medios de cultivo definidos pueden denominarse medios de cultivo "complejos".

45

Un "medio de cultivo celular" se entenderá como un medio de cultivo adecuado para mantener la vida, la proliferación y/o la formación de productos de células animales y/o células vegetales.

50

Un "nutriente", de acuerdo con la presente invención, es un compuesto o sustancia químico que las células necesitan para vivir y crecer. El nutriente es tomado preferiblemente por la célula del entorno. Los nutrientes pueden

- 5 ser "nutrientes orgánicos" y "nutrientes inorgánicos". Los nutrientes orgánicos incluyen hidratos de carbono, grasas, proteínas (o sus bloques de formación, p. ej., aminoácidos) y vitaminas. Los nutrientes inorgánicos son compuestos inorgánicos tales como, por ejemplo, minerales dietéticos y oligoelementos. Los "nutrientes esenciales" son nutrientes que la célula no puede sintetizar por sí misma y que, por lo tanto, deben ser proporcionados a la célula por el medio de cultivo.
- Un "producto de cultivo celular", de acuerdo con la invención, debe entenderse como cualquier compuesto biológico útil producido por células en cultivo celular. Productos de cultivo celular preferidos de la invención son proteínas terapéuticas, proteínas de diagnóstico, polisacáridos terapéuticos, tales como heparina, anticuerpos, p. ej., anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento, interleuquina, hormonas peptídicas y enzimas.
- 10 Un "aminoácido libre", de acuerdo con la invención, se entiende como un aminoácido que tiene su grupo amino y su grupo funcional (alfa-)carboxílico en forma libre, es decir, no se une covalentemente a otras moléculas, p. ej., un aminoácido que no forma un enlace peptídico. Aminoácidos libres también pueden estar presentes como sales o en forma de hidrato. Cuando se hace referencia a un aminoácido como parte de o en un péptido, se entenderá que se refiere a esa parte de la estructura peptídica respectiva derivada del aminoácido respectivo.
- 15 Un "factor de crecimiento", de acuerdo con la invención, debe entenderse como una sustancia que se produce de forma natural, capaz de estimular el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación celular. Factores de crecimiento preferidos están en forma de proteína u hormona esteroide. De acuerdo con una realización de la invención, la expresión "factor de crecimiento" se interpretará como relativa a un factor de crecimiento seleccionado de la lista que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés), incluido el FGF ácido y el FGF básico, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina. (IGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento epitelial (EGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento transformante (TGF, por sus siglas en inglés), que incluye TGFalfa y TGFbeta, citoquina, tal como las interleuquinas 1, 2, 6, factor estimulante de granulocitos y factor inhibidor de leucocitos (LIF, por sus siglas en inglés).
- 20
- 25 Un "péptido", de acuerdo con la invención, debe entenderse como un compuesto peptídico que consiste en 2 a 20 aminoácidos.
La expresión "N-acilado", con referencia a un aminoácido, debe entenderse que significa que el aminoácido N-acilado se modifica mediante la adición de un grupo acilo al grupo alfa-amino del aminoácido.
- 30 Se entenderá que una "forma estéril" de una composición de nutrientes, medio de cultivo, medio de cultivo celular o similar define la ausencia de cualquier materia viva en dicha composición, medio de cultivo, medio de cultivo celular o similar.
- Un "medio de cultivo sólido", en el contexto de la presente invención, debe entenderse como cualquier medio de cultivo no líquido o no gaseoso. Medios de cultivo sólidos preferidos de la invención son medios de cultivo de tipo gel, tales como agar-agar, carragenano o gelatina.
- 35 Se entiende que "transferencia de células" (también conocido como subcultivo o división de células), en el contexto de la presente invención, significa la transferencia de un pequeño número de células a un nuevo recipiente de cultivo. Las células pueden cultivarse durante más tiempo si se dividen regularmente, ya que evita la senescencia asociada con la alta densidad celular prolongada. Los cultivos en suspensión son transferidos fácilmente con una pequeña cantidad de cultivo que contiene unas pocas células diluidas en un mayor volumen de medio reciente.
- 40 La presente invención se refiere a medios de cultivo celular que comprenden L-glutamina de un conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q y L-glutamina de un conjunto de otras fuentes de glutamina Qsource en una relación molar definida $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$; en donde X se define como un L-aminoácido; en donde Q se define como L-glutamina unida a través de un enlace amida a L-aminoácido X;
- 45 en donde Acil se define como un resto acilo C₁-C₇ unido a través de un enlace amida al extremo amino del L-aminoácido X; en donde R se define para estar en el intervalo de 0,03 a 20; en donde n(Acil-X-Q) es la cantidad total de sustancia de L-glutamina contenida en el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q en los medios de cultivo; y
- 50 en donde n(Qsource) es la cantidad total de sustancia de L-glutamina contenida en el conjunto de otras fuentes de glutamina Qsource en los medios de cultivo, en donde los constituyentes del conjunto de otras fuentes de L-glutamina (Qsource) se seleccionan de lo siguiente: L-glutamina libre, dipéptidos Y-Q o mezclas de los mismos, en donde Y se define como uno de los 20 L-aminoácidos genéticamente codificados, en donde Q se define como L-glutamina unida a través de un enlace amida a L-

aminoácido Y, en donde el enlace amida que conecta Y y Q en el dipéptido Y-Q es un enlace amida de la cadena principal regular que implica el extremo carboxi del aminoácido Y y el extremo amino de glutamina Q.

- 5 Los autores de la presente invención encontraron que medios de cultivo celular de este tipo tienen propiedades superiores a los medios de cultivo celular de la técnica anterior. Se encontró por parte de los autores de la presente invención que proporcionar fuentes de L-glutamina en la relación como se especifica resulta en el aumento de la productividad de los cultivos celulares.

De acuerdo con la presente invención, el L-aminoácido X en el dipéptido N-acilado Acil-X-Q puede ser cualquier L-aminoácido natural, es decir, cualquiera de los 20 L-aminoácidos genéticamente codificados, es decir, X se selecciona de entre los siguientes:

Alanina	(Ala / A)
Arginina	(Arg / R)
Asparagina	(Asn / N)
Ácido aspártico	(Asp / D)
Cisteína	(Cys / C)
Ácido glutámico	(Glu / E)
Glutamina	(Gln / Q)
Glicina	(Gly / G)
Histidina	(His / H)
Isoleucina	(Ile / I)
Leucina	(Leu / L)
Lisina	(Lys / K)
Metionina	(Met / M)
Fenilalanina	(Phe / F)
Prolina	(Pro / P)
Serina	(Ser / S)
Treonina	(Thr / T)
Triptófano	(Trp / W)
Tirosina	(Tyr / Y)
Valina	(Val / V).

- 10 En una realización preferida de la presente invención, X se selecciona de los 20 L-aminoácidos genéticamente codificados con la excepción de glutamina.

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, X se selecciona de: Ala, Gly, Asn. En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, X es Ala.

- 15 De acuerdo con la presente invención, el enlace amida que conecta X y Q en el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es un enlace amida de la cadena principal regular que implica el extremo carboxi del aminoácido X y el extremo amino de la glutamina Q.

De acuerdo con la presente invención, el resto acilo C₁-C₇ de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se define como grupo acilo R^A-C(O)-, en donde R^A es alquilo C₁-C₆ o cicloalquilo C₃-C₆, lineal o ramificado.

- 20 Grupos alquilo C₁-C₆ de cadena lineal o ramificada útiles incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, isopropilo, sec.-butilo, terc.-butilo, neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, entre otros.

Grupos cicloalquilo C₃-C₆ útiles incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo.

- 25 Preferiblemente, el resto acilo C₁-C₇ de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q es un grupo acetilo, es decir, preferiblemente, R^A es metilo.

De acuerdo con la presente invención, el grupo acilo de los dipéptidos N-acilados, Acil-X-Q, está unido a través de un enlace amida al extremo amino del L-aminoácido X.

5 Preferiblemente, el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q en medios de cultivo de la presente invención se selecciona de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q o mezclas de los mismos. Muy preferiblemente, el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q en medios de cultivo de la presente invención contiene solo acetil-A-Q.

Todas las sustancias que contienen L-glutamina en los medios de cultivo de la presente invención pueden asignarse a uno cualquiera de los dos conjuntos de sustancias diferentes:

(i) dipéptidos N-acilados Acil-X-Q, con Acil y X tal como se definen en la realización respectiva;

(ii) un conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource.

10 Por consiguiente, todas las sustancias en el conjunto de sustancias que contienen L-glutamina contenidas en los medios de cultivo de la presente invención que no cumplen con la definición de dipéptidos N-acilados, Acil-X-Q, con Acil y X tal como se definen en la realización respectiva, constituyen el conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource.

15 Constituyentes típicos del conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource son proteínas y péptidos (diferentes de Acil-X-Q, con Acil y X tal como se definen en la realización respectiva), así como la propia L-glutamina libre. En realizaciones preferidas de la presente invención, los constituyentes del conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource se seleccionan de entre los siguientes: L-glutamina libre, dipéptidos Y-Q, en donde Y es alanina o mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, el único constituyente del conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource es dipéptido Y-Q, en donde Y es alanina.

20 De acuerdo con la presente invención, la relación molar $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$ se selecciona preferiblemente de los siguientes intervalos: 0,03 a 20; $R = 0,04$ a 15,67; $R = 0,05$ a 10; $R = 0,05$ a 5. En realizaciones preferidas de la presente invención, R se selecciona del intervalo $R = 0,04$ a 15,67.

25 El medio de cultivo de la invención puede estar en forma líquida, en forma de un gel, p. ej., un medio que contiene agar-agar, carragenano o gelatina, o puede ser un polvo, un granulado, un gránulo o en forma de tableta. En una realización preferida, el medio de cultivo está en forma líquida.

Preferiblemente, el medio de cultivo está en forma estéril.

30 En realizaciones preferidas, los medios de cultivo de la invención son medios químicamente definidos, o medios sin suero. En realizaciones preferidas adicionales, los medios de cultivo de la invención son medios químicamente definidos. Para obtener dichos medios, por ejemplo, dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se pueden complementar en el medio CHOMACS CD de Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Alemania), en el medio PowerCHO-2 CD disponible de LONZA (Basilea, Suiza), el medio Acti-CHO P de PAA (PAA Laboratories, Pasching, Austria), el medio Ex-Cell CD CHO disponible en SAFC, el medio SFM4CHO y el medio CDM4CHO de ThermoFisher (Waltham, EE.UU.), medio DMEM (Life Technologies Corp., Carlsbad, EE.UU.), proporcionando así relaciones estequiométricas adecuadas de fuentes de L-glutamina, según lo especificado por la invención. La presente invención, sin embargo, no se limita a la complementación de los medios anteriores.

35 En una realización de la invención, el medio de cultivo no contiene un factor de crecimiento. En algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo no contiene lípido alguno.

40 En otras realizaciones preferidas, los medios de cultivo de la invención son concentrados de medios líquidos en forma concentrada 2 veces, 3 veces, 3,33 veces, 4 veces, 5 veces o 10 veces concentrada (volumen/volumen), con respecto a la concentración de dichos medios en uso. Esto permite la preparación de medios de cultivo "listos para usar" por simple dilución de los medios concentrados con el volumen respectivo de agua estéril. Formas concentradas de este tipo de los medios de la invención también se pueden utilizar mediante la adición de los mismos a un cultivo, p. ej., en un procedimiento de cultivo alimentado de forma discontinua.

45 Los medios de cultivo de la presente invención contienen preferiblemente todos los nutrientes requeridos para el crecimiento sostenido y la formación del producto. Recetas para preparar medios de cultivo, en particular medios de cultivo celular, son bien conocidas por los expertos en la materia (véase, p. ej., Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Öztürk y Wei-Shou Hu eds. Taylor and Francis Group 2006). Diversos medios de cultivo están disponibles comercialmente de diversas fuentes.

50 Los medios de cultivo de la invención incluyen preferiblemente una fuente de hidratos de carbono. El principal hidrato de carbono utilizado en los medios de cultivo celular es la glucosa, que se complementa de forma rutinaria

entre 5 y 25 nM. Además, se puede utilizar cualquier hexosa, tal como galactosa, fructosa o manosa, o una combinación.

5 Típicamente, los medios de cultivo también incluyen al menos los aminoácidos esenciales (es decir, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Tyr, Val), así como determinados aminoácidos no esenciales. Un aminoácido no esencial generalmente se incluye en el medio de cultivo celular si la línea celular no es capaz de sintetizar el aminoácido o si la línea celular no puede producir cantidades suficientes del aminoácido para mantener el crecimiento máximo.

10 Los medios de cultivo de la invención comprenden preferiblemente sales. Las sales se añaden al medio de cultivo celular para mantener las condiciones isotónicas y prevenir los desequilibrios osmóticos. La osmolalidad de un medio de cultivo de la invención es de aproximadamente 300 mOsm/kg, aunque muchas líneas celulares pueden tolerar una variación de aproximadamente el 10 por ciento de este valor o superior. La osmolalidad de algunos cultivos de células de insectos tiende a ser superior a 300 mOsm/kg, y esto puede ser 0,5 por ciento, 1 por ciento, 2 a 5 por ciento, 5-10 por ciento, 10-15 por ciento, 15-20 por ciento, 20-25 por ciento, 25-30 por ciento superior a 300 mOsm/kg. Las sales más comúnmente utilizadas en el medio de cultivo celular incluyen Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , y HCO_3^- (p. ej., CaCl_2 , KCl , NaCl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4).

15 Otros elementos inorgánicos pueden estar presentes en el medio de cultivo. Incluyen Mn, Cu, Zn, Mo, Va, Se, Fe, Ca, Mg, Si y Ni. Muchos de estos elementos están implicados en la actividad enzimática. Pueden proporcionarse en forma de sales, tales como CaCl_2 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, MgCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , NaCl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 e iones de los oligoelementos, tales como selenio, vanadio y zinc. Estas sales inorgánicas y oligoelementos pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo de Sigma (Saint Louis, Missouri).

20 Los medios de cultivo de la invención comprenden preferiblemente vitaminas. Las vitaminas son utilizadas típicamente por las células como cofactores. Los requisitos de vitaminas de cada una de las líneas celulares varían mucho, aunque generalmente se necesitan vitaminas extras si el medio de cultivo celular contiene poco o nada de suero o si las células se cultivan a una densidad alta. Vitaminas a modo de ejemplo presentes preferiblemente en medios de cultivo de la invención incluyen biotina, cloruro de colina, ácido fólico, i-inositol, nicotinamida, D-Ca⁺⁺-pantotenato, piridoxal, riboflavina, tiamina, piridoxina, niacinamida, A, B6, B12, C, D3, E, K y ácido p-aminobenzoico (PABA).

30 Medios de cultivo complejos de acuerdo con la invención también pueden comprender suero. El suero es el sobrenadante de la sangre coagulada. Componentes del suero incluyen factores de unión, micronutrientes (p. ej., oligoelementos), factores de crecimiento (p. ej., hormonas, proteasas) y elementos de protección (p. ej., antitoxinas, antioxidantes, antiproteasas). El suero está disponible de una diversidad de fuentes animales, incluyendo suero humano, bovino o equino. Cuando se incluye en el medio de cultivo celular de acuerdo con la invención, el suero se añade típicamente a una concentración de 5-10% (vol.). Medios de cultivo celular preferidos están libres de suero.

35 Para fomentar el crecimiento celular en ausencia de suero o en medios reducidos en suero, se pueden añadir uno o más de los siguientes polipéptidos a un medio de cultivo celular de la invención: por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), incluido FGF de carácter ácido y FGF de carácter básico, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante (TGF), incluyendo TGF α y TGF β , cualquier citoquina, tales como las interleuquinas 1, 2, 6, factor estimulante de granulocitos, factor inhibidor de leucocitos (LIF), etc. Sin embargo, el medio de cultivo de la invención también puede no incluir a los factores de crecimiento arriba enumerados.

En otras realizaciones, el medio de cultivo celular no comprende polipéptidos (es decir, péptidos con más de 20 aminoácidos).

45 También se pueden añadir uno o más lípidos a un medio de cultivo celular de la invención, tal como ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido polenoico y/o ácidos grasos de 12, 14, 16, 18, 20 o 24 átomos de carbono, siendo cada uno de los átomos de carbono ramificado o no ramificado), fosfolípidos, lecitina (fosfatidilcolina) y colesterol. Uno o más de estos lípidos pueden incluirse como complementos en medios libres de suero. El ácido fosfatídico y el ácido lisofosfatídico estimulan el crecimiento de determinadas células dependientes del anclaje, tales como MDCK, epitelio de ratón y otras líneas celulares renales, mientras que fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol estimulan el crecimiento de fibroblastos humanos en medios libres de suero. También se ha demostrado que etanolamina y colesterol fomentan el crecimiento de determinadas líneas celulares. En una determinada realización, el medio de cultivo celular no contiene un lípido.

Una o más proteínas transportadoras, tales como albúmina de suero bovino (BSA) o transferrina, también se pueden añadir al medio de cultivo celular. Las proteínas transportadoras pueden ayudar en el transporte de determinados

nutrientes u oligoelementos. BSA se utiliza típicamente como un soporte de lípidos, tales como los ácidos linoleico y oleico, que son insolubles en solución acuosa. Además, BSA también puede servir como soporte de determinados metales, tales como Fe, Cu y Ni. En formulaciones libres de proteínas, se pueden utilizar sustitutos de BSA no derivados de animales, tales como ciclodextrina, como soportes de lípidos.

5 Una o más proteínas de unión, tales como fibronectina, laminina y pronectina, también se pueden añadir a un medio de cultivo celular para ayudar a fomentar la unión de las células dependientes del anclaje a un sustrato.

10 El medio de cultivo celular puede incluir opcionalmente uno o más agentes tampón. Agentes tampón adecuados incluyen, pero no se limitan a, N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfónico] (HEPES), MOPS, MES, fosfato, bicarbonato y otros agentes tampón adecuados para uso en aplicaciones de cultivo celular. Un agente tampón adecuado es aquel que proporciona capacidad de tamponamiento sin una citotoxicidad sustancial para las células cultivadas. La selección de agentes tampón adecuados está dentro del ámbito de la experiencia ordinaria en la técnica del cultivo celular.

Se pueden añadir compuestos polianiónicos o policatiónicos al medio de cultivo para evitar que las células se agrupen y fomenten el crecimiento de las células en suspensión.

15 En realizaciones preferidas, la concentración total de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presentes en medios de cultivo líquidos de acuerdo con la invención está en el intervalo de 0,01 g/l a 20 g/l, o de 0,1 g/l a 10 g/l, o de 0,5 g/l a 5 g/l. En otras realizaciones preferidas, la concentración total de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presente en medios de cultivo líquidos de acuerdo con la invención es superior a 0,01 mM, 0,02 mM, 0,04 mM, 0,08 mM, 0,2 mM, 0,4 mM o 1 mM. También se prefieren medios de cultivo líquidos en los que la concentración total de dipéptidos N-acilados
20 Acil-X-Q presente sea inferior a 50 mM, 20 mM, 10 mM, 5 mM o 2 mM. Preferiblemente, la concentración total de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presente en medios de cultivo líquidos de acuerdo con la invención está en el intervalo de 0,01 mM a 40 mM, o de 0,1 mM a 20 mM, o de 0,1 mM a 10 mM, o de 0,5 mM a 10 mM, o de 1 mM a 10 mM, o de 1 mM a 8 mM, o de 1 mM a 6 mM. En una realización muy preferida, la concentración total de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presentes en medios de cultivo líquidos de acuerdo con la invención es de 1 mM a 8 mM, Acil es como un grupo acetilo y X es Alanina. Las concentraciones anteriores se dan como concentraciones en el medio no concentrado, es decir, la concentración presente en el cultivo real. Los medios concentrados pueden incluir concentraciones X veces más altas.

30 El medio de cultivo de la presente invención puede estar en una forma concentrada. Puede estar, p. ej., en forma concentrada 2 veces, 3 veces, 3,33 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces concentrada (con relación a una concentración que soporta el crecimiento y la formación de producto de las células). Medios de cultivo concentrados de este tipo son útiles para preparar el medio de cultivo para su uso por dilución del medio de cultivo concentrado con un disolvente acuoso, tal como agua. Dichos medios de cultivo concentrados se pueden utilizar en cultivos discontinuos, pero también se utilizan ventajosamente en cultivos discontinuos o continuos, en los que se añade una composición de nutrientes concentrados a un cultivo continuo de células, p. ej., para reponer los
35 nutrientes consumidos por las células durante el cultivo.

La presente invención también se refiere al uso de un medio de cultivo de la invención para cultivar células. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un medio de cultivo de la invención para producir un producto de cultivo celular.

40 Una realización preferida de la invención se refiere al uso de un medio de cultivo de acuerdo con la invención para cultivar células animales o células vegetales, lo más preferiblemente células de mamíferos. En realizaciones específicas, las células a cultivar son células CHO, células COS, células VERO, células BHK, células HEK, células HELA, células AE-1, células de insectos, células de fibroblastos, células musculares, células nerviosas, células madre, células de la piel, células endoteliales y células de hibridoma. Células preferidas de la invención son células CHO y células de hibridoma. Las células más preferidas de la invención son células CHO. Células CHO
45 particularmente preferidas de la invención son células CHO DG44 y CHO DP12.

También se incluye en el alcance de la presente invención un método para cultivar células, comprendiendo dicho método poner en contacto dichas células con un medio de cultivo celular de acuerdo con la invención. En una realización de la invención, el método para cultivar células comprende poner en contacto la célula con un medio de cultivo basal en condiciones que soportan el cultivo de la célula y complementar el medio de cultivo de células
50 basales con un medio concentrado de acuerdo con la presente invención. En realizaciones preferidas, el medio de cultivo basal se complementa con la alimentación concentrada o medio en más de un día.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir un medio de cultivo de acuerdo con la invención. Métodos para producir un medio de cultivo de acuerdo con la invención comprenden al menos una etapa de añadir

al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q de la invención al medio de cultivo. Del mismo modo, un aspecto se refiere al uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q de la invención para producir un medio de cultivo celular.

5 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para modificar un medio de cultivo, en el que dicha modificación de dicho medio de cultivo comprende la adición de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q de la invención a dicho medio de cultivo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir un medio de cultivo líquido, comprendiendo dicho método proporcionar un medio sólido de acuerdo con la invención, p. ej., en forma de un polvo seco, o en forma de gránulos, o en forma de nódulos, o en forma de tabletas; y disolver dicho medio de cultivo sólido en un medio acuoso, tal como agua.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q de acuerdo con la invención para cultivar células. Otro aspecto se refiere al uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para cultivo celular.

15 La invención también se refiere a métodos para fabricar un producto de cultivo celular, que comprende las etapas de (i) proporcionar una célula capaz de producir dicho producto de cultivo celular; (ii) poner en contacto dicha célula con un medio de cultivo de la invención; y (iii) obtener dicho producto de cultivo celular de dicho medio de cultivo o de dicha célula. Del mismo modo, la presente divulgación se refiere al uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para fabricar un producto de cultivo celular.

20 En métodos preferidos, el producto de cultivo celular es una proteína terapéutica, una proteína de diagnóstico, un polisacárido tal como heparina, un anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un factor de crecimiento, una interleuquina, virus, partículas similares a virus o una enzima.

El cultivo de células, de acuerdo con la invención, puede realizarse en cultivo discontinuo, en cultivo alimentado por tandas o en cultivo continuo.

25 En un método preferido para cultivar células, o el uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-A-Q está presente a una concentración de 1 a 8 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-A-Q está presente a una concentración de 1 a 8 mM, y la célula es una célula de hibridoma. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-A-Q está presente en una concentración de 1 a 8 mM, y la célula es una célula de mamífero. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-A-Q está presente a una concentración de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-A-Q está presente a una concentración de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula de mamífero.

30 En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-AQ está presente a una concentración de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es acetil-AQ, acetil-AQ está presente a una concentración de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula CHO o una célula de hibridoma. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acetil-A-Q, Acetil-AQ está presente en una concentración de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula de mamífero. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 1 a 8 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente en una concentración de 1 a 8 mM, y la célula es una célula de mamífero. En otro método preferido para cultivar

células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula CHO o una célula de hibridoma. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula de mamífero. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula CHO o una célula de hibridoma. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, el dipéptido N-acilado Acil-X-Q es Acil-A-Q, Acil-A-Q está presente a una concentración de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula de mamífero.

En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados, Acil-X-Q presente en una concentración total de 1 a 8 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados, Acil-X-Q presente en una concentración total de 1 a 8 mM, y la célula es una célula CHO o una célula de hibridoma. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados, Acil-X-Q presente en una concentración total de 1 a 8 mM, y la célula es una célula de mamífero. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presentes a una concentración total de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presentes a una concentración total de 0,5 a 10 mM, y la célula es una célula de mamífero. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados, Acil-X-Q presente en una concentración total de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula CHO. En otro método preferido para cultivar células, o uso de al menos un dipéptido N-acilado Acil-X-Q para el cultivo de células, de acuerdo con la invención, los dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se seleccionan de Acil-A-Q, Acil-G-Q o mezclas de los mismos, con dipéptidos N-acilados Acil-X-Q presentes a una concentración total de 0,1 a 20 mM, y la célula es una célula de mamífero.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q, el conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource y la relación molar $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$ se definen como se indica a continuación; en dichas realizaciones preferidas, los medios de cultivo celular son medios químicamente definidos y dipéptidos N-acilados Acil-X-Q están presentes en una concentración total de 1 mM a 8 mM; en usos de y procedimientos preferidos para la fabricación de productos de cultivo celular, las células CHO se ponen en contacto con dichos medios de cultivo celular preferidos:

	Acil-X-Q	Qsource	R
1	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	Q libre y/o A-Q	0,03 a 20

ES 2 724 434 T3

	Acil-X-Q	Qsource	R
2	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	Q libre y/o A-Q	0,04 a 15,67
3	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	Q libre y/o A-Q	0,05 a 10
4	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	Q libre	0,03 a 20
5	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	Q libre	0,04 a 15,67
6	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	Q libre	0,05 a 10
7	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	A-Q	0,03 a 20
8	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	A-Q	0,04 a 15,67
9	uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q	A-Q	0,05 a 10
10	acetil-A-Q	Q libre y/o A-Q	0,03 a 20
11	acetil-A-Q	Q libre y/o A-Q	0,04 a 15,67
12	acetil-A-Q	Q libre y/o A-Q	0,05 a 10
13	acetil-A-Q	Q libre	0,03 a 20
14	acetil-A-Q	Q libre	0,04 a 15,67
15	acetil-A-Q	Q libre	0,05 a 10
16	acetil-A-Q	A-Q	0,03 a 20
17	acetil-A-Q	A-Q	0,04 a 15,67
18	acetil-A-Q	A-Q	0,05 a 10
19	acetil-G-Q	Q libre y/o A-Q	0,03 a 20
20	acetil-G-Q	Q libre y/o A-Q	0,04 a 15,67
21	acetil-G-Q	Q libre y/o A-Q	0,05 a 10
22	acetil-G-Q	Q libre	0,03 a 20
23	acetil-G-Q	Q libre	0,04 a 15,67
24	acetil-G-Q	Q libre	0,05 a 10
25	acetil-G-Q	A-Q	0,03 a 20
26	acetil-G-Q	A-Q	0,04 a 15,67
27	acetil-G-Q	A-Q	0,05 a 10
28	acetil-N-Q	Q libre y/o A-Q	0,03 a 20
29	acetil-N-Q	Q libre y/o A-Q	0,04 a 15,67
30	acetil-N-Q	Q libre y/o A-Q	0,05 a 10
31	acetil-N-Q	Q libre	0,03 a 20
32	acetil-N-Q	Q libre	0,04 a 15,67
33	acetil-N-Q	Q libre	0,05 a 10
34	acetil-N-Q	A-Q	0,03 a 20
35	acetil-N-Q	A-Q	0,04 a 15,67
36	acetil-N-Q	A-Q	0,05 a 10

Ejemplos

Ejemplo 1: Mezcla de acetil-A-Q con diferentes fuentes de glutamina en el cultivo por tandas. Acetil-A-Q se mezcló con glutamina libre o A-Q en relaciones molares entre 0 y 100%. Las mezclas se añadieron a un medio libre de glutamina (PowerCHO-2 CD, Lonza AG, Visp, Suiza) para obtener una concentración total de glutamina de 8 mM en el medio final. El crecimiento y la productividad se midieron utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) (Subclone DG44; Life Technologies Cooperation, Carlsbad, EE.UU.). El cultivo se continuó hasta el punto en el que la viabilidad del cultivo cayó por debajo del 80%. Se utilizaron datos del tercer paso. Los resultados para mezclar acetil-A-Q con glutamina libre (Q) se resumen en la Tabla 1. Toda la información relacionada con el título se da con relación al título de 100% de glutamina libre. Por consiguiente, la productividad relativa específica de la célula se obtuvo dividiendo primero el título relativo por la densidad celular viable integrada (IVCD), luego dividiendo este número por la relación título/IVCD para glutamina libre al 100%. La productividad relativa en función del tiempo se obtuvo dividiendo el título relativo por la duración del cultivo hasta el muestreo, luego dividiendo este número por la relación de tiempo de cultivo/título para la glutamina libre.

Tabla 1:

	100% acetil-A-Q	75% acetil-A-Q, 25% Q	50% acetil-A-Q, 50% Q	25% acetil-A-Q, 75% Q	100% Q, referencia
Densidad celular viable integrada (IVCD)	10,1	41,3	42,7	32,2	32,0
Tiempo cultivo hasta 80% de viabilidad	17,9	12,9	13,9	11,9	12,9
Título relativo	1,37	1,16	1,10	1,10	1,00
Productividad relativa específica de la célula	434%	89%	82%	109%	100%
Productividad relativa relacionada con el tiempo	99%	116%	102%	119%	100%

Utilizando 100% de acetil-AQ se proporcionan los mejores valores para el título relativo y la productividad específica de la célula, pero la densidad celular sub-crítica puede hacer que el cultivo sea menos robusto. Sorprendentemente, la adición de glutamina libre aumenta la productividad relativa relacionada con el tiempo. La mejor combinación de título relativo y productividad relacionada con el tiempo se encontró con un 75% de acetil-A-Q y un 25% de glutamina libre.

En un segundo conjunto de experimentos dentro de la misma campaña experimental, acetil-A-Q se mezcló con A-Q y se testó en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. El 100% de puntos para acetil-A-Q, así como la referencia de glutamina libre son idénticos al primer ejemplo.

Tabla 2:

	100% acetil-A-Q	75% acetil-A-Q, 25% AQ	50% acetil-A-Q, 50% AQ	25% acetil-A-Q, 75% AQ	100% AQ	100% Q, referencia
Densidad celular viable integrada (IVCD)	10,1	31,8	38,7	38,7	47,1	32,0
Tiempo cultivo hasta 80% de viabilidad	17,9	13,9	12,9	12,9	13,9	12,9
Título relativo	1,37	1,46	1,25	1,12	1,10	1,00
Productividad relativa específica de la célula	434%	147%	103%	93%	75%	100%
Productividad relativa relacionada con el tiempo	99%	136%	125%	112%	102%	100%

Sorprendentemente, el complemento hecho combinando 75% de acetil-A-Q con 25% de A-Q condujo a la mejor combinación de productividades específicas de la célula y específicas del tiempo, así como también al título relativo. También es superior a la combinación de acetil-A-Q y glutamina libre. El patrón actual de la industria, una complementación con 100% de A-Q, se comporta a un nivel más bajo en todas las categorías relevantes.

5 **Ejemplo 2:** Mezcla de acetil-A-Q con diferentes fuentes de glutamina en el cultivo alimentado por tandas

Se añadieron glutamina libre, A-Q o Acetil-A-Q a un medio libre de glutamina (PowerCHO-2 CD, Lonza AG, Visp, Suiza) para obtener una concentración total de glutamina de 8 mM en el medio final. Además, estas sustancias, así como una mezcla del 75% de acetil-A-Q y A-Q se añadieron a una formulación libre de glutamina de un complemento de alimento comercial (CHOMACS Feed Supplement, Miltenyi Biotech, Alemania) para proporcionar una concentración de glutamina de 5,5 g/L. El crecimiento y la productividad se midieron utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) (Subclone DG44; Life Technologies Cooperation, Carlsbad, EE.UU.). Los resultados se resumen en la Tabla 3. Toda la información relacionada con el título se da con relación al título obtenido al añadir glutamina libre a medio basal y alimentación. Por consiguiente, la productividad relativa específica de la célula se obtuvo dividiendo primero el título relativo por la densidad celular viable integrada (IVCD), dividiendo luego este número por la relación título/IVCD para glutamina libre al 100%. La productividad relativa en función del tiempo se obtuvo dividiendo el título relativo por la duración del cultivo hasta el muestreo, dividiendo luego este número por la relación de título/tiempo de cultivo para la glutamina libre.

Tabla 3:

	Q/Q	Q/A-Q	Q/acetil-A-Q	A-Q/A-Q	A-Q/acetil-A-Q	A-Q/mezcla 6:2 de acetil-A-Q y A-Q	Acetil A-Q/acetil-A-Q
Densidad celular viable integrada (IVCD)	61,0	63,0	59,5	54,4	46,3	51,8	8,2
Tiempo cultivo hasta 80% de viabilidad	14,0	14,0	15,0	17,0	17,0	17,0	15,0
Título relativo	1,0	1,1	1,2	1,1	1,2	1,2	0,2
Productividad relativa específica de la célula	100%	107%	126%	129%	153%	141%	145%
Productividad relativa relacionada con el tiempo	100%	111%	115%	95%	96%	99%	18%

20 Sorprendentemente, se encontraron las mismas tendencias para una operación de alimentación por tandas. El cultivo solo con acetil-A-Q condujo a productividades específicas de células muy altas, pero con una densidad celular muy baja. En este conjunto específico de experimentos, condujo incluso a niveles de titulación muy bajos. Estos experimentos también demostraron que la combinación previamente seleccionada de acetil-A-Q y A-Q en una relación de 75%/25% también se puede utilizar con éxito como fuente de glutamina para un complemento alimenticio. En resumen, la combinación de una fuente de glutamina como Q o A-Q en el medio basal con acetil-A-Q en la alimentación siempre se comportó mejor que una combinación de Q o A-Q en la alimentación. La combinación de A-Q en el medio basal con una mezcla de acetil-A-Q y A-Q en la alimentación condujo a la mejor combinación de comportamiento en general.

REIVINDICACIONES

1. Medios de cultivo celular que comprenden L-glutamina de un conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q y L-glutamina de un conjunto de otras fuentes de glutamina Qsource en una relación molar definida $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$;
- 5 en donde X se define como un L-aminoácido;
 en donde Q se define como L-glutamina unida a través de un enlace amida a L-aminoácido X;
 en donde Acil se define como un resto acilo C₁-C₇ unido a través de un enlace amida al extremo amino del L-aminoácido X;
 en donde R se define para estar en el intervalo de 0,03 a 20;
- 10 en donde n(Acil-X-Q) es la cantidad total de sustancia de L-glutamina contenida en el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q en los medios de cultivo; y
 en donde n(Qsource) es la cantidad total de sustancia de L-glutamina contenida en el conjunto de otras fuentes de glutamina Qsource en los medios de cultivo,
 en donde los constituyentes del conjunto de otras fuentes de L-glutamina (Qsource) se seleccionan de lo siguiente:
- 15 L-glutamina libre, dipéptidos Y-Q o mezclas de los mismos, en donde Y se define como uno de los 20 L-aminoácidos genéticamente codificados, en donde Q se define como L-glutamina unida a través de un enlace amida a L-aminoácido Y, en donde el enlace amida que conecta Y y Q en el dipéptido Y-Q es un enlace amida de la cadena principal regular que implica el extremo carboxi del aminoácido Y y el extremo amino de glutamina Q.
2. Medios de cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los medios de cultivo celular están libres de suero.
- 20 3. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde los medios de cultivo celular están químicamente definidos.
4. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el único constituyente del conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource es dipéptido Y-Q, en donde Y es alanina.
- 25 5. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el único constituyente del conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource está libre de L-glutamina.
6. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la concentración total de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q está en el intervalo de 1 mM a 8 mM.
- 30 7. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la relación molar $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$ está definida en el intervalo de 0,04 a 15,67.
8. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se define como sigue: uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q, acetil-N-Q.
9. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se define como sigue: uno o más de acetil-A-Q, acetil-G-Q.
- 35 10. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se define como sigue: acetil-A-Q.
11. Medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los medios de cultivo celular están químicamente definidos;
 en donde el único constituyente del conjunto de otras fuentes de L-glutamina Qsource es dipéptido Y-Q, en donde Y es alanina;
- 40 en donde la relación molar $R = n(\text{Acil-X-Q}) / n(\text{Qsource})$ está definida para estar en el intervalo de 0,04 a 15,67;
 en donde el conjunto de dipéptidos N-acilados Acil-X-Q se define como sigue: Acetil-A-Q;
 y en donde la concentración de acetil-A-Q está en el intervalo de 1 mM a 8 mM.
- 45 12. Uso de los medios de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para cultivar células.
13. Procedimientos para la fabricación de un producto de cultivo celular, que comprenden la etapa: poner en contacto células con un medio de cultivo celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que las células contactadas con el medio de cultivo celular son células CHO.