

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 907**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2011 PCT/EP2011/056509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11134921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2011 E 11716890 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2563903**

54 Título: **Medio de cultivo celular mejorado**

30 Prioridad:

26.04.2010 US 327837 P

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

24.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BUDACH, WOLFGANG, ERNST, GUSTAV;
CHASSINE, HELENE, C. y
KOESTER, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 755 907 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 mejorado

5 Campo Técnico de la Invención

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

10 La presente divulgación proporciona medios de cultivo celular con alto contenido de cloruro de colina, que permiten el cultivo de células con una alta viabilidad celular por un periodo prolongado de tiempo. Los medios de cultivo celular tal como se utilizan en un proceso de conformidad con la presente invención, además permiten obtener altas productividades de anticuerpos y/o una calidad mejorada del producto cuando se utilizan para la producción de un anticuerpo mediante la expresión recombinante de anticuerpos utilizando sistemas de cultivo de células CHO, en particular a escala industrial.

Antecedentes Técnicos de la Invención

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

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

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

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

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

45 Uno de los parámetros de proceso más importantes para controlar el proceso de producción general es el medio en el cual se cultivan las células.

Muchos medios de la técnica anterior se basan en medios que contienen proteínas con un contenido elevado de suero y otras proteínas. Por ejemplo, el documento WO 92/15670 A1 se refiere a medios y métodos que utilizan suero de ternera bovino para sustentar líneas celulares tales como líneas celulares de hibridoma.

50 El documento WO 95/12664 A1 divulga medios de crecimiento que contienen insulina o nucelina como proteínas o comprenden suero bovino fetal que se utilizan en métodos para adaptar líneas celulares de CHO a densidades celulares mayores.

55 El documento US2006/194323 A1 se refiere a cultivos celulares epiteliales de animales y describe medios que contienen proteínas con insulina y transferrina que se suplementan además con factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) para sustentar el crecimiento de las células.

60 El documento WO2009/127098 describe medios que contienen primatona como una proteína.

El documento US2009/061516 A1 se refiere a formulaciones de medios de cultivo que contienen insulina que comprenden péptidos adicionales para sustentar el cultivo de células animales.

65 El documento WO 98/08934 proporciona medios de cultivo de células de mamífero libres de suero que sustentan el cultivo in vitro de las células de mamífero en suspensión.

Los medios de cultivo celular adecuados deben proporcionar cultivos celulares con todos los nutrientes

necesarios, lo cual es especialmente difícil si no se agregan componentes de origen animal, tales como suero o proteínas, por ejemplo factores de crecimiento, a los medios.

5 Además, los cultivos de células de mamífero requieren componentes de suplemento particulares en diferentes etapas del proceso de producción de polipéptidos. Por consiguiente, los medios de cultivo celular deben proporcionar los sustratos necesarios durante a) el crecimiento y proliferación iniciales de las células huésped a bajas densidades; b) el subsiguiente cultivo de las células a altas densidades; c) el proceso real de formación del polipéptido en las células cultivadas.

10 El proceso en general para la producción de un polipéptido recombinante comprende preferiblemente una fase de expansión y una fase de producción. Durante la fase de expansión, las células huésped son cultivadas hasta una alta densidad, utilizando un medio de crecimiento con el fin de maximizar la subsiguiente producción del polipéptido más adelante. Durante la fase de producción, se lleva a cabo la formación real del polipéptido deseado, en grandes cantidades, mediante el uso de un medio de producción. Con el fin de
15 cumplir los requerimientos metabólicos específicos de las células en cada fase del proceso de producción general del polipéptido, se han diseñado diferentes composiciones de los medios para la fase de expansión y producción, respectivamente. Por ejemplo, los medios de producción a menudo contienen mayores cantidades de aminoácidos que los medios de crecimiento.

20 De conformidad con lo anterior, se han llevado a cabo considerables esfuerzos en el pasado para desarrollar medios de cultivo celular con énfasis especial en su uso para la producción a gran escala de polipéptidos. No obstante, la mejoría continua de los medios de cultivo celular todavía es una meta importante para maximizar adicionalmente la producción de polipéptidos en términos de calidad del producto y rendimientos cuantitativos.

25 Muchos componentes de los medios de cultivo celular se han investigado en el pasado, en términos de su función para la producción de polipéptidos. Los posibles objetivos son sales inorgánicas, aminoácidos, fuentes de carbono tales como la glucosa, o vitaminas.

30 Por ejemplo, se ha demostrado que la suplementación de compuestos como vitaminas, cloruro de colina o aminoácidos, puede incrementar la viabilidad y productividad de las células cultivadas bajo condiciones libres de proteína (Kim do Y *et al.*, Cytotechnology 2005, 47, 37-49).

35 El cloruro de colina es un componente estándar de los medios de cultivo celular, que sirve como precursor de fosfolípidos para las células. Después de ser incorporado y procesado por las células, este termina siendo, además de la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol, uno de los principales fosfolípidos en las membranas celulares, denominado fosfatidilcolina.

40 Los medios de cultivo celular comúnmente empleados, como el D-MEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) y el D-MEM/F-12, se han utilizado ampliamente para el crecimiento de una amplia gama de líneas de células de mamífero. Estos medios incluyen cantidades de cloruro de colina de 4 mg/L y 8,98 mg/L, respectivamente.

45 Otros medios disponibles en el comercio, tales como el medio F-12 de Ham (disponible en el comercio en BioConcept) y el medio MEM (disponible en el comercio en HyClone), también comprenden bajas cantidades de cloruro de colina, de 13,96 mg/L y 56 mg/L, respectivamente.

50 El documento US 6,180,401 describe un método mejorado para producir un polipéptido en un cultivo de células de animal. Un objetivo es incrementar la concentración del producto final. Se modificaron varios parámetros con el fin de maximizar el rendimiento del producto en la fase de producción, incluyendo la concentración de glucosa, la osmolaridad y la concentración de glutamina. El documento US 6,180,401 describe medios de cultivo celular que tienen un contenido de cloruro de colina de 50,86 mg/L.

55 El documento US 5,122,469 describe un medio de cultivo para propagar varias líneas de células de mamífero, en particular las Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) y permite el cultivo de células a altas densidades en forma de monocapas o en suspensión, adecuadas para la propagación a pequeña y gran escala de células de mamífero. Otra ventaja es un mejor rendimiento del producto. El medio es un medio de cultivo químicamente definido que contiene elevados niveles de ciertos aminoácidos. El contenido de cloruro de colina es de 50,86 mg/L.

60 Solo unos pocos medios con alto contenido de cloruro de colina se conocen en la técnica anterior. Waymouth ha descrito un medio de cultivo de células que se puede utilizar para cultivar la línea de células de tejido conectivo de fibroblastos murinos L929 (C. Waymouth, J. Natl. Cancer, Inst., 1959, 22, 1003-1017). Este medio es un medio sintético químicamente definido, libre de suero, y tiene un contenido de cloruro de colina de 250 mg/L. Este medio está disponible en el comercio con el nombre de Medio MB 752/1 de Waymouth
65 (BioConcept y Sigma-Aldrich). La aplicabilidad conocida está limitada a cultivo de órganos completos, al establecimiento de líneas de células de carcinoma a partir de efusiones pleurales, y al cultivo de células potencialmente tumorigénicas antes de su evaluación *in vivo*.

5 El documento WO 02/101019 describe dos composiciones de medio con un contenido relativamente alto de cloruro de colina, de 101,72 mg/L y 209,40 mg/L, respectivamente. Estos medios se utilizaron para estudiar el impacto de la glutamina y el glutamato para la producción de una proteína recombinante. Sin embargo, ambos medios seguían conteniendo altas cantidades de glutamina.

10 Solo se dispone de información limitada a partir de la técnica anterior por lo que respecta a la función del contenido de cloruro de colina en los medios de cultivo celular para la producción de polipéptidos. El documento US 6,048,728 describe brevemente la función del contenido de cloruro de colina en los medios de cultivo celular para la producción de productos biológicos utilizando células de hibridoma. En el caso de células que expresan anticuerpos, se observó la secreción de cantidades máximas del anticuerpo en medios que contenían un suplemento de colina mayor de 4 mg/L y preferiblemente de aproximadamente 4 a 75 mg/L, en combinación con los demás reactivos del Suplemento Primario. A estas concentraciones, se describe que la colina no es limitante y que no tiene ninguna toxicidad aparente.

15 Los medios de cultivo celular de producción, especialmente aquellos diseñados para utilizarse en la producción industrial a gran escala de polipéptidos recombinantes, requieren altas cantidades de componentes, por ejemplo aminoácidos.

20 Sin embargo, los medios de cultivo celular altamente concentrados muestran una limitada solubilidad de los componentes de los medios seleccionados. La solubilidad limitada representa una desventaja técnica debido a que los medios altamente concentrados para la producción a gran escala tienen el riesgo de precipitar componentes individuales, por ejemplo durante la fase de producción y especialmente durante el almacenamiento. Esto puede conducir a variaciones en la composición de los medios y a un deterioro de las condiciones del cultivo celular en el punto crítico de la formación del producto.

25 Como otra consecuencia, la precipitación causa la remoción efectiva de valiosos componentes del medio del proceso de producción real. Los procesos de reciclamiento adicional diseñados para resolver estos inconvenientes, técnicamente son difíciles de realizar y requieren un mayor esfuerzo en términos de recursos y tiempo. Los medios de cultivo celular menos concentrados, cuando son igualmente efectivos en la producción de polipéptidos, permitirían lograr significativas reducciones en costos en los procesos de producción a escala industrial.

30 Considerando los desafíos anteriores y las desventajas existentes, existe una necesidad continua en el campo de la biotecnología industrial de medios de cultivo mejorados que permitan producir polipéptidos recombinantes a escala industrial con rendimientos incluso mayores, es decir, con una productividad específica y general mejoradas, y una mayor calidad del producto. Los medios de cultivo celular mejorados son especialmente deseables para mejorar la productividad durante la fase de producción.

35 Un objetivo técnico específico de los procesos de producción de polipéptidos es mantener una alta viabilidad celular al final del proceso de producción con el fin de maximizar el rendimiento final del polipéptido, en particular a causa de la prolongación del tiempo de producción. Además, al reducir la agregación del polipéptido recombinante formado y la calidad del producto mejorada, particularmente en términos de modificaciones posteriores a la traducción, tales como el patrón de glucosilación, también es un objetivo técnico importante.

40 Por último, son deseables medios de producción mejorados para la producción a gran escala de polipéptidos, que contengan cantidades reducidas de componentes, mientras que a la vez sean igualmente efectivos, o incluso mejores, en términos del crecimiento celular, productividad del polipéptido, calidad del polipéptido recombinante y funcionalidad del polipéptido.

Resumen de la Invención

45 Con el fin de abordar los desafíos técnicos anteriormente referidos, la presente invención proporciona un proceso con medios de cultivo celular con un alto contenido de cloruro de colina, los cuales causan una mejora inesperada en la productividad específica celular y en la viabilidad celular, en especial en las etapas posteriores de los procesos de producción biotecnológica. Además, la calidad del anticuerpo recombinante mediante el uso de los medios de cultivo celular también se puede mejorar sorpresivamente. Los medios de cultivo celular tal como se usan en un proceso de conformidad con la presente invención, son especialmente adecuados para utilizarse durante la fase de producción. De acuerdo con esto, la presente invención permite producir un anticuerpo recombinante a partir de células CHO.

50 Los medios de cultivo celular se pueden utilizar en particular como medios de producción, con el fin de lograr un alto crecimiento celular, una alta densidad de células viables y un alto título del polipéptido durante la fase de producción. También se encontró que la calidad del producto, en términos de menor agregación y/o mejor modificación posterior a la traducción, tal como un mejor patrón de glucosilación del producto recombinante, se pueden mejorar mediante el uso de los medios de cultivo celular en un proceso de conformidad con la

presente invención.

5 En la presente invención se utiliza preferiblemente cloruro de colina. Sin embargo, otras fuentes de colina, por ejemplo hidróxido de colina, tartrato/bitartrato de colina, sulfato de colina, fosfato de colina, o cualquier otro compuesto de colina basado en el uso de un contraión diferente, también son adecuadas para utilizarse en los medios de cultivo celular en un proceso de conformidad con la presente invención. Si se utilizan tales otros compuestos de colina, su cantidad se selecciona preferiblemente de tal modo que se logre la misma concentración molar de colina que la obtenida al utilizar cloruro de colina en los rangos de concentración y valores anteriormente dados; es decir, la otra sal de colina está presente preferiblemente en una concentración equivalente a la concentración de cloruro de colina tal como se señala. Esto también es aplicable a los aspectos específicos y modalidades que se presentan más adelante.

15 El medio de cultivo celular tal como se utiliza en un proceso de conformidad con el primer aspecto de la invención tiene un contenido de cloruro de colina en el rango de 60 mg/L a 2500 mg/L. El contenido de cloruro de colina en el medio de cultivo celular puede ser de 80 mg/L o mayor, alternativamente 160 mg/L o mayor, 200 mg/L o mayor o 220 mg/L o mayor. El contenido de cloruro de colina en el medio de cultivo celular está limitado a 2500 mg/L, alternativamente a 1000 mg/L, 840 mg/L, 500 mg/L o 300 mg/L. El cloruro de colina puede estar presente a una concentración de aproximadamente 240 mg/L.

20 El medio de cultivo celular tal como se utiliza en un proceso de conformidad con el primer aspecto de la invención, además comprende solo un contenido limitado de aminoácidos expresados por una concentración total de aminoácidos de 20 a 57 mmol/L. Alternativamente, la concentración de aminoácidos totales es mayor de 25 mmol/L, mayor de 30 mmol/L, mayor de 35 mmol/L o incluso mayor de 40 mmol/L. Además, la concentración de aminoácidos totales puede ser menor de 54 mmol/L. La concentración de aminoácidos totales, por ejemplo, puede ser de aproximadamente 51 mmol/L.

25 Además, el medio de cultivo celular opcionalmente comprende un reducido contenido de glutamina. En particular, la glutamina está presente en una concentración de 500 a 1400 mg/L, alternativamente de 800 a 1400 mg/L, o incluso de 900 a 1200 mg/L.

30 El contenido de aminoácidos en el medio de cultivo celular tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la invención, opcionalmente puede comprender los siguientes aminoácidos en las siguientes concentraciones expresadas en mmol/L:

35	Arginina	4,0 - 6,0, preferiblemente 4,5 - 5,5
	Asparagina	3,0 - 6,0, preferiblemente 4,0 - 5,5
	Ácido aspártico	2,5 - 4,0, preferiblemente 3,0 - 3,6
	Glicina	0,3 - 0,8, preferiblemente 0,5 - 0,7
	Histidina	0,6 - 1,0, preferiblemente 0,7 - 0,9
40	Isoleucina	2,0 - 5,0, preferiblemente 3,0 - 4,0
	Leucina	3,0 - 7,0, preferiblemente 3,5 - 6,0
	Lisina	2,0 - 4,0, preferiblemente 2,5 - 3,5
	Metionina	1,0 - 1,5, preferiblemente 1,2 - 1,4
	Fenilalanina	1,0 - 2,0, preferiblemente 1,3 - 1,8
45	Prolina	2,5 - 6,0, preferiblemente 3,0 - 5,5
	Serina	3,0 - 8,0, preferiblemente 4,0 - 7,0
	Treonina	2,0 - 3,5, preferiblemente 2,5 - 3,1
	Triptófano	0,4 - 1,0, preferiblemente 0,5 - 0,8
	Valina	2,5 - 5,0, preferiblemente 3,0 - 4,5
50	Tirosina	1,0 - 2,0, preferiblemente 1,2 - 1,8
	Cistina	0,5 - 1,0, preferiblemente 0,6 - 0,8

55 Los medios de cultivo celular están libres de suero y libres de proteínas. También están libres de hidrolizados de proteína.

De conformidad con la presente invención, se proporciona un proceso para la producción de un anticuerpo recombinante, que comprende una fase de producción en donde se cultivan células CHO recombinantes en un medio de cultivo celular.

60 El polipéptido recombinante preparado es un anticuerpo recombinante.

En el proceso de la invención, las células se cultivan preferiblemente en un proceso por lotes con alimentación.

65 Breve Descripción de los Dibujos

En la Fig. 1 a Fig. 8, los tres medios son medio de crecimiento con bajo contenido de colina (♦ (diamante);

control 1), medio de producción (▲ (triángulo); control 2) y medio de crecimiento con alto contenido de colina, es decir, medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con una cantidad adicional de 200 mg/L de cloruro de colina (■ (cuadro)).

5 La Fig. 1 ilustra las densidades de células viables normalizadas de células que expresan mAb1 cultivadas en frascos en agitación, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 1).

La Fig. 2 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb1 cultivadas en frascos en agitación, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 1).

10 La Fig. 3 ilustra el título de polipéptido normalizado obtenido después de cultivar células que expresan mAb1 en frascos en agitación, como función del tiempo, para tres diferentes medios (Experimento 1).

15 La Fig. 4 ilustra las densidades de células viables normalizadas de células que expresan mAb2 cultivadas en frascos en agitación, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 2).

La Fig. 5 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb2 cultivadas en frascos en agitación, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 2).

20 La Fig. 6 ilustra el título de polipéptido normalizado obtenido después de cultivar células que expresan mAb2 en matraces en agitación, como función del tiempo, para tres diferentes medios (Experimento 2).

25 La Fig. 7 ilustra las densidades de células viables normalizadas de células que expresan mAb3 cultivadas en matraces en agitación, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 3).

La Fig. 8 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb3 cultivadas en matraces en agitación, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 3).

30 La Fig. 9 ilustra el título de polipéptido normalizado obtenido después de cultivar células que expresan mAb3 en matraces en agitación, como función del tiempo, para tres diferentes medios (Experimento 3).

La Fig. 10 ilustra la tasa de agregación de mAb3 producida después de siete días de cultivo en matraces en agitación. La tasa de agregación se mide por cromatografía de exclusión de tamaño (CET). Las barras de error son las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas.

35 La Fig. 11 ilustra las densidades de células viables normalizadas de células que expresan mAb3 cultivadas por lotes en un biorreactor, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 4).

40 La Fig. 12 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb3 cultivadas por lotes en un biorreactor, como función del tiempo, en tres diferentes medios de cultivo celular (Experimento 4).

45 La Fig. 13 ilustra el título de polipéptido normalizado obtenido utilizando células que expresan mAb3 cultivadas por lotes en un biorreactor, como función del tiempo, utilizando tres diferentes medios (Experimento 4).

50 La Fig. 14 ilustra el título de anticuerpos mAb3 normalizado obtenido después de 13 días de cultivo celular utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con concentraciones variables de cloruro de colina.

La Fig. 15 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb3 en el día 13 de cultivo celular utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con concentraciones variables de cloruro de colina.

55 La Fig. 16 ilustra las densidades de células viables normalizadas de células que expresan mAb3 iniciando desde el día 3 (100%) hasta el día 13, utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con concentraciones variables de cloruro de colina.

60 La Fig. 17 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb3 iniciando desde el día 3 hasta el día 13 utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con varias concentraciones de cloruro de colina.

La Fig. 18 ilustra el desarrollo normalizado del título de anticuerpo mAb3, iniciando desde el día 3 hasta el día 13 de cultivo, utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con concentraciones variables de cloruro de colina.

65 La Fig. 19 ilustra las densidades de células viables normalizadas de células que expresan mAb4 iniciando desde el día 0 hasta el día 17, utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado

con concentraciones variables de cloruro de colina.

La Fig. 20 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb4, iniciando desde el día 0 hasta el día 17, utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con concentraciones variables de cloruro de colina.

La Fig. 21 ilustra la viabilidad de células que expresan mAb4 en el día 17 utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con varias concentraciones de cloruro de colina.

La Fig. 22 ilustra el título de anticuerpo mAb4 normalizado, iniciando desde el día 7 hasta el día 17, utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con concentraciones variables de cloruro de colina.

La Fig. 23 ilustra la concentración de anticuerpo mAb4 normalizada en el día 17 utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con varias concentraciones de cloruro de colina.

La Fig. 24 ilustra la productividad específica celular promedio (qP) normalizada de células que expresan mAb4 obtenidas en un periodo de 17 días de cultivo celular utilizando un medio de crecimiento con bajo contenido de cloruro de colina suplementado con varias concentraciones de cloruro de colina.

Descripción Detallada de la Invención

Los medios de cultivo celular convencionales que se utilizan para cultivar células y la subsiguiente producción de polipéptidos a partir de estos cultivos celulares solo contienen bajas cantidades de cloruro de colina. Solo unos pocos medios de cultivo celular descritos en la técnica anterior contienen cantidades moderadas o incluso altas de cloruro de colina. Sin embargo, esos medios no han sido sistemáticamente investigados en términos de la función que tienen altas cantidades de cloruro de colina sobre la productividad específica celular, el crecimiento de las células y la calidad del producto, especialmente cuando se utilizan durante la fase de producción.

De acuerdo con el proceso de la presente invención, se observa una mejoría inesperada de la productividad específica celular (o expresión del polipéptido) cuando se cultivan células CHO utilizando medios de cultivo celular como medios de producción que comprenden altas cantidades de cloruro de colina en comparación con medios que tienen bajas cantidades de cloruro de colina. Se demuestra en la presente que incluso un medio de crecimiento cuando es suplementado con altas cantidades de cloruro de colina, sorpresivamente se puede utilizar como un medio de producción efectivo para el cultivo de células CHO durante la fase de producción, obteniendo de esta manera grandes cantidades de anticuerpos obtenidos mediante la expresión recombinante en cultivos celulares.

Aunque el cloruro de colina se utiliza preferiblemente en un proceso de conformidad con la presente invención, otras fuentes de colina, por ejemplo hidróxido de colina, tartrato/bitartrato de colina, sulfato de colina, fosfato de colina, o cualquier otro compuesto de colina basado en el uso de un contraión diferente, también son adecuados para utilizarse en los medios de cultivo celular en el proceso de conformidad con la presente invención.

El uso del medio de cultivo celular en un proceso de conformidad con la presente invención para la producción de anticuerpos, generalmente incluye el cultivo de células CHO para la expresión recombinante de anticuerpos. Se prefiere que el medio de cultivo celular se utilice para la producción a gran escala de polipéptidos. La producción a gran escala de anticuerpos se refiere a las cantidades típicamente requeridas para la producción industrial de anticuerpos recombinantes utilizados para la preparación de compuestos biofarmacéuticos terapéuticamente activos. Los cultivos celulares con un volumen de al menos 500 L, al menos 1000 L, al menos 5000 L o incluso volúmenes mayores, típicamente representan las aplicaciones de producción a gran escala.

La cantidad de cloruro de colina en el medio de cultivo celular descrito tal como se usa en un proceso de conformidad con la presente invención utilizado para la producción de anticuerpos, es significativamente mayor que el contenido de cloruro de colina conocido de medios de cultivo celular utilizados previamente para la producción de anticuerpos a gran escala.

De conformidad con lo anterior, la presente invención es adecuada para la producción de un anticuerpo recombinante utilizando células CHO que comprende un alto contenido de cloruro de colina, tal como 60 mg/L o mayor, 80 mg/L o mayor, 160 mg/L o mayor, 200 mg/L o mayor, o incluso 220 mg/L o mayor. El contenido de cloruro de colina en el medio de cultivo celular está limitado a 2500 mg/L, 1000 mg/L, 840 mg/L, 500 mg/L o incluso 300 mg/L. El cloruro de colina puede estar presente a una concentración de aproximadamente 240 mg/L.

Cuanto más alta sea la concentración de cloruro de colina, más altos serán los costos del medio. Por lo tanto,

concentraciones de cloruro de colina demasiado altas son desventajosas desde una perspectiva de costos. Además, el contenido de cloruro de colina contribuye a la osmolalidad del medio. Concentraciones de cloruro de colina demasiado altas podrían ser desventajosas, ya que pueden causar junto con los demás componentes del medio, una osmolalidad total que sea más alta de lo deseado. En particular, en procesos por lotes con alimentación no es deseable utilizar osmolalidades iniciales demasiado altas, ya que esto podría imponer limitaciones en la estrategia de alimentación.

Por las razones anteriores, los inventores piensan que las concentraciones óptimas de cloruro de colina están dentro de los límites aquí establecidos.

Si se utilizan compuestos de colina diferentes al cloruro de colina, estos se emplean en concentraciones equivalentes. Las concentraciones equivalentes significan que se alcanzan concentraciones molares de colina que están en los mismos rangos que las alcanzadas cuando se utiliza cloruro de colina a concentraciones dentro de los rangos anteriores.

El medio de cultivo celular descrito tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la invención comprende solo un contenido limitado de aminoácidos, expresado por la concentración total de aminoácidos. Más en particular, el medio de cultivo celular descrito tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la invención está caracterizado por una concentración total de aminoácidos de 20 a 57 mmol/L. La concentración total de aminoácidos puede ser mayor de 25 mmol/L, mayor de 30 mmol/L, mayor de 35 mmol/L, o incluso mayor de 40 mmol/L. Además, la concentración total de aminoácidos puede ser menor de 54 mmol/L. La concentración total de aminoácidos, por ejemplo, puede ser de aproximadamente 51 mmol/L.

Al mismo tiempo, la concentración de cloruro de colina es como la anteriormente establecida, es decir, en el rango de 60 mg/L a 2500 mg/L, con los rangos y valores preferidos también ya establecidos anteriormente.

El medio de cultivo celular descrito tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención se puede utilizar en particular como medio de producción con el fin de obtener un alto crecimiento celular, una alta densidad de células viables y un alto título del anticuerpo durante la fase de producción. Además, se alcanza una más alta calidad del producto del anticuerpo recombinante, particularmente en términos de menos agregación y/o mejores modificaciones posteriores a la traducción, tales como un mejor patrón de glucosilación.

La función del aminoácido glutamina para el crecimiento de cultivos celulares y la resultante productividad del polipéptido se ha sometido a extensos estudios en los últimos años. Se ha encontrado que la glutamina no es solo un bloque de construcción importante para la síntesis de polipéptidos, sino que también representa una fuente de energía primaria para las células de mamífero. De acuerdo con esto, normalmente se han incluido altas concentraciones de glutamina en los medios de cultivo celular utilizados para la producción de polipéptidos. Son importantes altas cantidades de glutamina en los medios de cultivo celular para el crecimiento de las células y la expresión de polipéptidos, particularmente a escala industrial.

No obstante, el metabolismo de la glutamina da como resultado la descomposición de la glutamina y la acumulación de iones amonio, los cuales son un subproducto que se sabe que es tóxico para el crecimiento de las células y la producción del polipéptido. Por lo tanto, es deseable limitar la cantidad de glutamina en los cultivos celulares. Se han sugerido varios agentes de reemplazo de glutamina en la técnica anterior, por ejemplo ácido glutámico. Sin embargo, se ha descrito que el reemplazo de la glutamina por ácido glutámico en procesos por lotes causa una menor formación de subproductos pero también una más baja productividad (Doverskog *et al.*, J. Biotechnol., 1997, 59, 103-115). Por lo tanto, los medios de cultivo celular que contienen cantidades reducidas de glutamina, mientras que a la vez permiten un alto crecimiento celular y alta productividad del polipéptido, son deseables.

Se ha encontrado que la adición de grandes cantidades de cloruro de colina permite el uso de medios que comprendan cantidades reducidas de glutamina, en comparación con algunos medios conocidos, especialmente durante la fase de producción, mientras que a la vez la productividad de las células permanece inalterada en gran medida.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso con un medio de cultivo celular que además comprende una cantidad opcional de glutamina, la cual es significativamente reducida cuando se compara con los medios de la técnica anterior. Los medios de cultivo celular también pueden estar libres de agentes de reemplazo de glutamina, tales como ácido glutámico o similares. El medio de cultivo celular opcionalmente comprende glutamina en una concentración de 500 a 1400 mg/L, de 800 a 1400 mg/L, o de 900 a 1200 mg/L.

Al mismo tiempo, la concentración de cloruro de colina es como la anteriormente establecida, es decir, en el rango de 60 mg/L a 2500 mg/L, con los rangos y valores preferidos tal como se establecieron anteriormente. Además, la concentración total de aminoácidos en el medio de cultivo celular es al mismo tiempo de 20 a 57 mmol/L, con los rangos y valores preferidos también como se establecieron anteriormente.

De conformidad con otra modificación opcional de la presente invención, las respectivas cantidades de aminoácidos individuales son como las que se definen a continuación.

5 Tales cantidades moderadas de aminoácidos todavía son más altas que las cantidades de aminoácidos contenidas en los medios de cultivo celulares convencionales, como el D-MEM o RPMI, pero al mismo tiempo son significativamente más bajas que las cantidades de aminoácidos contenidas en los medios de producción típicos utilizados para la producción a gran escala.

10 Se considera que cantidades mayores de aminoácidos en los medios de producción son importantes para la alta productividad y alta calidad del producto, especialmente cuando la producción del polipéptido se lleva a cabo a gran escala o incluso a escala industrial. Ahora se ha encontrado que la presencia de altas cantidades de cloruro de colina permite limitar la cantidad de aminoácidos individuales, especialmente en los medios de cultivo celular utilizados durante la fase de producción.

15 El contenido de aminoácidos individuales en el medio de cultivo celular descrito del proceso de conformidad con esta modificación opcional de la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las siguientes cantidades expresadas en mmol/L:

20	Arginina	4,0 - 6,0, preferiblemente 4,5 - 5,5
	Asparagina	3,0 - 6,0, preferiblemente 4,0 - 5,5
	Ácido aspártico	2,5 - 4,0, preferiblemente 3,0 - 3,6
	Glicina	0,3 - 0,8, preferiblemente 0,5 - 0,7
	Histidina	0,6 - 1,0, preferiblemente 0,7 - 0,9
	Isoleucina	2,0 - 5,0, preferiblemente 3,0 - 4,0
25	Leucina	3,0 - 7,0, preferiblemente 3,5 - 6,0
	Lisina	2,0 - 4,0, preferiblemente 2,5 - 3,5
	Metionina	1,0 - 1,5, preferiblemente 1,2 - 1,4
	Fenilalanina	1,0 - 2,0, preferiblemente 1,3 - 1,8
	Prolina	2,5 - 6,0, preferiblemente 3,0 - 5,5
30	Serina	3,0 - 8,0, preferiblemente 4,0 - 7,0
	Treonina	2,0 - 3,5, preferiblemente 2,5 - 3,1
	Triptófano	0,4 - 1,0, preferiblemente 0,5 - 0,8
	Valina	2,5 - 5,0, preferiblemente 3,0 - 4,5
	Glutamina	6,0 - 10,0, preferiblemente 7,5 - 9,0
35	Tirosina	1,0 - 2,0, preferiblemente 1,2 - 1,8
	Cistina	0,5 - 1,0, preferiblemente 0,6 - 0,8

40 Al mismo tiempo, la concentración de cloruro de colina es como la anteriormente establecida, es decir, en el rango de 60 mg/L a 2500 mg/L, con los rangos y valores preferidos también como los anteriormente establecidos. Además, la concentración total de aminoácidos en el medio de cultivo celular es al mismo tiempo de 20 a 57 mmol/L, con los rangos y valores preferidos también como los anteriormente establecidos.

45 Debido al alto contenido de cloruro de colina, las cantidades respectivas de aminoácidos pueden ser significativamente más bajas que las cantidades utilizadas en otros medios de cultivo celular empleados para la producción a gran escala de anticuerpos. En otras palabras, la adición de altas cantidades de cloruro de colina permite reducir significativamente la cantidad de la mayoría de los aminoácidos, sin deteriorar el crecimiento celular, la viabilidad celular y el título de anticuerpo. Esto tiene la ventaja técnica de que se pueden utilizar medios de cultivo celular con concentraciones más bajas de la mayoría de los aminoácidos incluidos, evitando de esta manera problemas de precipitación por los componentes de los medios de cultivo celular menos solubles. Además, se alcanzan reducciones en costos significativas con respecto a los medios de cultivo celular, aunque la calidad general y el rendimiento del producto de anticuerpo no se ven afectados o incluso podrían mejorar. Tal como se describe más adelante, la agregación del producto de anticuerpo recombinante se puede reducir mediante el uso de los medios de cultivo celular descritos en el proceso de conformidad con la presente invención. Adicionalmente, también se han obtenido mejores modificaciones posteriores a la traducción, tales como un mejor patrón de glucosilación u otros atributos de calidad de proteína, tales como una menor agregación del anticuerpo recombinante. En algunos casos, la modificación de los medios de cultivo celular tal como se utilizan en el proceso de la presente invención incluso ayuda a mejorar la viabilidad celular y el crecimiento celular, así como el título del anticuerpo resultante.

60 El término "medio de cultivo celular" se refiere a una solución acuosa de nutrientes que se pueden utilizar para el crecimiento de células por un periodo de tiempo prolongado. Típicamente, los medios de cultivo celular incluyen los siguientes componentes: una fuente de energía, que normalmente será un compuesto carbohidrato, preferiblemente glucosa, aminoácidos, preferiblemente el conjunto básico de los aminoácidos, incluyendo todos los aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas y/u otros compuestos orgánicos que son requeridos a bajas concentraciones, ácidos grasos libres y compuestos inorgánicos, incluyendo elementos traza, sales inorgánicas, compuestos amortiguadores y nucleósidos y bases.

5 El término "medio de crecimiento" se refiere a un medio de cultivo celular que normalmente se utiliza durante la fase de expansión del proceso de producción general. La fase de expansión es el primer periodo del proceso de cultivo/producción general, el cual predominantemente está caracterizado por una alta tasa de crecimiento celular y menor producción de polipéptido. La fase de expansión sirve para el propósito de expandir las células, lo cual significa generar un número adecuado de células que se encuentren en fase de crecimiento exponencial para inocular un biorreactor de producción.

10 El término "medio de producción" se refiere a un medio de cultivo celular que normalmente se utiliza durante la fase de producción del proceso de producción general. La fase de producción es una segunda fase del proceso de cultivo/producción general, que sirve para el propósito de producir altas cantidades del producto. Durante la fase de producción, las células se deben mantener en una modalidad viable y productiva, durante tanto tiempo como sea posible.

15 El uso de medios de cultivo celular en el campo de la industria farmacéutica, por ejemplo para la producción de polipéptidos recombinantes terapéuticamente activos, generalmente no permite el uso de ningún material de origen animal debido a aspectos de seguridad y contaminación. Por lo tanto, el medio de cultivo celular descrito en un proceso de conformidad con la presente invención es un medio libre de suero y/o libre de proteínas. El término "medio libre de suero y/o libre de proteínas", representa un medio químicamente definido en su totalidad, que no contiene aditivos de origen animal tales como hidrolizados de tejidos, suero fetal bovino o similares. Además, las proteínas, especialmente factores de crecimiento tales como insulina, transferrina o similares, tampoco se agregan al cultivo celular de conformidad con la presente invención. El medio de cultivo celular tampoco es suplementado con ninguna fuente de proteína hidrolizada, tal como peptona de soja, trigo o arroz, o hidrolizado de levadura, o similares.

25 El medio de cultivo celular descrito tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención se puede utilizar en varios procesos de cultivo celular. El cultivo de células se puede llevar a cabo en un cultivo adherente, por ejemplo en un cultivo en monocapa, o preferiblemente en un cultivo en suspensión.

30 El cultivo a gran escala de células se puede utilizar, por ejemplo, por los diversos procesos de fermentación establecidos en la biotecnología industrial. Los procesos de cultivo celular discontinuos y continuos, tales como la perfusión y el quimostato, se pueden usar con los medios de cultivo celular descritos en un proceso de conformidad con la presente invención. Los procesos discontinuos, incluyendo los procesos por lotes repetidos con alimentación y los procesos por lotes repetidos, son una modalidad preferida.

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

45 Las células cultivadas en el medio de cultivo celular descrito utilizado en un proceso de conformidad con la presente invención son células CHO.

La clase de polipéptidos producidos por los cultivos celulares y los medios de cultivo celular descritos utilizados en el proceso de conformidad con la presente invención son anticuerpos recombinantes.

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

55 Los productos obtenidos a partir de tales procesos de cultivo celular se pueden emplear para la preparación de preparaciones farmacéuticas. El término "preparación farmacéutica" se refiere a una composición adecuada o adaptada para ser administrada a un mamífero, especialmente un ser humano. Además, el anticuerpo de conformidad con la invención se puede administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, receptores, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 La presencia de altas cantidades de cloruro de colina en el medio de cultivo celular descrito tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención, permite reducir el contenido de aminoácidos en el medio de cultivo celular sin afectar negativamente la capacidad del medio para soportar el crecimiento de células a altas densidades y hacer posible un alto título de polipéptido al mismo tiempo. Este efecto es especialmente importante para la fase de producción del proceso de producción general.

La mayoría de los experimentos han revelado que se logran parámetros de rendimiento incluso mejores por el medio de cultivo celular descrito utilizado en un proceso de conformidad con la presente invención cuando se compara con los medios de producción convencionales que comprenden altas concentraciones de aminoácidos seleccionados, combinadas con solo bajas cantidades de cloruro de colina.

Sin pretender ceñirse a ninguna teoría, se supone que la concentración del precursor de fosfolípidos colina está vinculada con la cantidad del componente esencial de membrana celular fosfatidilcolina, la cual, además de otros fosfolípidos, es necesaria para conservar la integridad y funcionalidad de las membranas celulares. Podría suponerse que las células que crecen en un medio con bajo contenido de colina están limitadas en este sustrato durante el proceso de cultivo y, por lo tanto, en la fosfatidilcolina, incluso si la colina es un componente del medio no esencial y las células deberían ser capaces de sintetizarla independientemente. Sin embargo, una ruta inactiva o limitada podría ser la razón de que haya cantidades limitadas de colina disponibles para producir suficientes cantidades de fosfatidilcolina. Esto podría conducir a una composición "anormal" de las membranas, especialmente membranas del retículo endoplasmático y del complejo de Golgi. Esto podría influenciar de manera negativa la función de estas membranas y reducir la tasa de expresión de polipéptidos o el transporte de los mismos dentro de las células. La inhibición del transporte de polipéptidos desde el complejo de Golgi hacia la membrana plasmática en células CHO agotadas de fosfatidilcolina fue demostrada por Testerink *et al.* (2009); *Journal of Lipid Research*, Vol. 50, 2182-2192). Este defecto podría ser rescatado mediante la adición de fosfatidilcolina exógena.

Varias ventajas importantes son el resultado de la composición específica de los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención.

En primer lugar, la reducción del contenido total de aminoácidos en los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención permite realizar los procesos de cultivo celular con parámetros de desempeño técnico similares o incluso mejorados en términos de crecimiento celular, densidad de células viables, así como productividad de polipéptidos, mientras que al mismo tiempo la reducción del contenido total de aminoácidos o de algunos aminoácidos seleccionados en el cultivo celular causa un mejor balance económico global del proceso de producción debido a la reducción en costos en cuanto al medio de cultivo celular se refiere.

En segundo lugar, los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención evitan el riesgo de precipitación de los componentes contenidos en el medio de cultivo celular, en particular aminoácidos hidrofóbicos particulares contenidos en el medio a concentraciones relativamente altas. Esto es en particular ventajoso durante el almacenamiento de los medios. Para estos componentes, la reducida concentración ayuda a evitar el deterioro de suministro con sustratos esenciales durante el crecimiento de las células y la producción del polipéptido. Esto es especialmente beneficioso durante la fase de producción del proceso de producción general.

En tercer lugar, los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención, permiten la producción de anticuerpos recombinantes con una mayor calidad. La agregación del anticuerpo formado se reduce, las células son capaces de producir anticuerpo con mejores modificaciones posteriores a la traducción, y también se mejoran los patrones de glucosilación.

La agregación del anticuerpo formado durante la expresión recombinante es un problema técnico que causa una reducción en el rendimiento del producto. Además, la agregación dificulta la purificación del producto polipeptídico funcionalmente activo.

Por lo tanto, es deseable reducir la agregación del producto de anticuerpo formado tanto como sea posible durante el proceso de producción real. Se ha encontrado que los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención causan una reducida agregación del producto de anticuerpo recombinante cuando se comparan con los medios de producción típicos.

Muchos polipéptidos están sujetos a modificaciones posteriores a la traducción, especialmente la glucosilación de polipéptidos. Los polipéptidos resultantes comprenden cadenas de oligosacáridos enlazadas covalentemente. Se sabe que la glucosilación es un mediador importante de la funcionalidad del polipéptido. Por lo tanto, la capacidad de un sistema de células huésped utilizado para la producción de un polipéptido recombinante para imitar apropiadamente las estructuras de glucosilación endógenas es un aspecto importante para la calidad del producto. La eficiencia terapéutica de un polipéptido recombinante puede ser afectada en gran medida por una inapropiada glucosilación del polipéptido debido a las propiedades inmunogénicas y a la reducida vida media *in vivo* después de la administración de polipéptidos glucosilados de manera incorrecta.

En general, la manosiación se considera un aspecto crítico en la producción de polipéptidos recombinantes, especialmente en el campo de los anticuerpos recombinantes. Es un objetivo general en la producción de polipéptidos recombinantes evitar una alta manosiación de los polipéptidos. Por lo tanto, un objetivo

importante es reducir la alta manosiación durante la producción de polipéptidos recombinantes tanto como sea posible.

5 Los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención permiten producir anticuerpos recombinantes con muy bajo grado de alta manosiación. Este efecto técnico es especialmente significativo con respecto a los medios de producción típicos. Por ejemplo, la cantidad relativa de anticuerpo recombinante altamente manosilado con alta manosiación de la cantidad total de anticuerpo recombinante obtenido por la expresión utilizando los medios de cultivo celular en un proceso de conformidad con la presente invención, se disminuye preferiblemente en aproximadamente un 50%, en comparación con el medio de producción.

10 Además, sorpresivamente se ha encontrado que los anticuerpos recombinantes obtenidos por el uso de los medios de cultivo celular descritos utilizados en un proceso de conformidad con la presente invención, tienen porcentajes más altos de β -galactosilación, en relación con los correspondientes anticuerpos obtenidos mediante el uso de medios de crecimiento o medios de producción convencionales.

Otra ventaja del medio con altas concentraciones de colina, es que permite tener solo un medio para la fase de producción y la fase de expansión, lo cual ahorra tiempo y recursos.

20 Ejemplos

Los siguientes experimentos se pretende que ilustren la invención tal como se define en esta solicitud.

25 Descripción de los medios de cultivo celular

Se probaron los tres medios siguientes:

Medio de crecimiento con bajo contenido de colina, es decir, con un contenido de cloruro de colina de 40 mg/L (control 1);

30 Medio de producción (control 2);

Medio de crecimiento con alto contenido de colina, es decir, medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con una cantidad adicional de cloruro de colina de 200 mg/L, obteniéndose un contenido total de cloruro de colina de 240 mg/L.

Los dos primeros medios (medio de crecimiento y medio de producción con bajo contenido de colina) se utilizaron únicamente para propósitos comparativos, mientras que el tercer medio con alto contenido de cloruro de colina representa un medio utilizado en un proceso de conformidad con la presente invención.

40 El medio de crecimiento con bajo contenido de colina es un medio típico diseñado para el crecimiento y proliferación de un cultivo celular. Este medio permite cultivar células hasta que se alcance una alta densidad celular, lo cual es un requerimiento importante para la producción de polipéptidos a gran escala. Sin embargo, el medio de crecimiento con bajo contenido de colina no está diseñado para la producción de polipéptidos a partir de un cultivo celular, debido a que el contenido de muchos aminoácidos es de bajo a moderado, considerando la concentración total de aminoácidos en el medio de 51,1 mmol/L.

La composición de aminoácidos del medio de crecimiento con bajo contenido de colina es la siguiente:

Aminoácido	mg por L de medio	Conc. (mmol/L)
L-arginina, HCl	1053	5,0
L-asparagina monohidratada	616	4,1
Acido L-aspártico	461	3,5
Glicina	38	0,5
L-histidina•HCl•H ₂ O	168	0,8
L-isoleucina	394	3,0
L-leucina	500	3,8
L-lisina•HCl	622	3,4
L-metionina	180	1,2
L-fenilalanina	264	1,6
L-prolina	368	3,2
L-serina	432	4,1
L-treonina	334	2,8
L-triptófano	102	0,5
L-valina	375	3,2
L-glutamina	1170	8,0

L-tirosina	278*)	1,5
L-cistina	200*)	0,8
Contenido total		51,0

*) Se agregan L-tirosina y L-cistina al medio de crecimiento con bajo contenido de colina utilizando una solución concentrada con el fin de alcanzar las concentraciones anteriormente indicadas de tirosina y cistina.

- 5 En contraste con el medio de crecimiento con bajo contenido de colina, el segundo medio (medio de producción), es un medio útil para la producción a gran escala de polipéptidos, utilizando cultivos celulares. Este medio de producción contiene cantidades más elevadas de la mayoría de aminoácidos (la concentración total de aminoácidos en el medio es de 90,50 mmol/L), cuando se compara con el medio de crecimiento con bajo contenido de colina, aunque la cantidad de otros componentes es básicamente idéntica.

10

La composición de aminoácidos del medio de producción utilizado es la siguiente:

Aminoácido	mg por L de medio	Conc. (mmol/L)
L-arginina, HCl	1053	5,0
L-asparagina monohidratada	1501	10,0
Ácido L-aspártico	461	3,5
Glicina	38	0,5
L-histidina•HCl•H ₂ O	268	1,3
L-isoleucina	894	6,8
L-leucina	1200	9,2
L-lisina•HCl	822	4,5
L-metionina	280	1,9
L-fenilalanina	464	2,8
L-prolina	968	8,4
L-serina	1232	11,7
L-treonina	534	4,5
L-triptófano	252	1,2
L-valina	776	6,6
L-glutamina	1169	8,0
ácido L-glutámico, sal de Na hidratada	182	1,2
L-tirosina	423*)	2,3
L-cistina	305*)	1,3
Contenido total		90,7

15

El contenido de cloruro de colina en este medio de producción comparativo también es significativamente más alto que en el medio de crecimiento con bajo contenido de colina. Es importante notar que los medios de producción conocidos de la técnica anterior normalmente contienen cantidades mucho más bajas de cloruro de colina. Por lo tanto, el alto contenido de cloruro de colina en el medio de producción comparativo se debe considerar como una importante diferencia respecto a los medios de producción conocidos de la técnica anterior, los cuales normalmente no difieren de los medios de crecimiento conocidos en su contenido de cloruro de colina.

20

25

El tercer medio es un medio tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención representado por el medio de crecimiento con alto contenido de colina, es decir, el medio de crecimiento con bajo contenido de colina suplementado con 200 mg/L de cloruro de colina, obteniéndose un contenido total de cloruro de colina de 240 mg/L. Con excepción del mayor contenido de cloruro de colina, el tercer medio tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención todavía se podría considerar como un medio de crecimiento típico.

30

35

Los ejemplos demuestran que la marcada mejoría alcanzada por altas cantidades de cloruro de colina en los medios de crecimiento, tales como el medio de crecimiento con bajo contenido de colina, cuando se utilizan durante la fase de producción hacen que tales medios de crecimiento con alto contenido de cloruro de colina no sean muy superiores a los medios suplementados con bajo contenido de cloruro de colina, en términos del crecimiento celular, viabilidad celular y título de anticuerpo, sino que incluso son superiores a los medios de producción con cantidades igualmente altas de cloruro de colina en los mismos aspectos. En los medios de crecimiento normales, la adición de cantidades más altas de cloruro de colina ayuda a alcanzar un mejor crecimiento y viabilidad celular, y un mejor título del anticuerpo.

Etapa experimental

40

Para los experimentos, se utilizó una línea celular CHO progenitora, que es derivada de la línea celular dhfr (+) CHO-K1, ATCC CCL-61 (Kao *et al.*, Genetics, 1967, 55, 513-524; Kao *et al.*, PNAS, 1968, 60, 1275-1281;

Puck *et al.* J. Exp. Med., 1958, 108, 945-959), mediante la adaptación a condiciones de medio libre de suero, libre de proteína. Tres alícuotas de esta línea celular progenitora se transfectan para expresar tres diferentes anticuerpos monoclonales, mAb1, mAb2, mAb3, respectivamente.

5 Experimentos en matraces en agitación (Experimentos 1 a 3)

Los nueve matraces en agitación (tres por cada experimento) se procesaron bajo las mismas condiciones, excepto por el medio. Las condiciones incluyeron un cultivo por lotes con alimentación con dos bolos diarios de alimentación iniciando en los días 3 y 5, con una tasa de alimentación de 2 y 0,4% del volumen de cultivo inicial por día; un cambio de temperatura de 36,5°C a 33°C en el día 5; 10% de CO₂ en la incubadora; una tasa de agitación de 150 rpm (radio de agitación circunferencial = 25 mm). Se determinan el crecimiento celular/viabilidad de las células, así como el título resultante del anticuerpo recombinante expresado.

15 a) Experimento 1

La Fig. 1 y 2 muestran los resultados obtenidos para las células que expresaban el mAb1, cultivadas en el Experimento 1, en términos de crecimiento y viabilidad celular.

20 Tal como se ilustra en las Figs. 1 y 2, el medio de la presente invención con alto contenido de cloruro de colina (el medio de crecimiento con alto contenido de colina) muestra un incremento de un 53% en la densidad máxima de células viables y una disminución más lenta de la viabilidad, cuando se compara con el medio de crecimiento con bajo contenido de colina, que tiene un bajo contenido de cloruro de colina.

25 La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos para las células cultivadas en el Experimento 1 en términos del título del polipéptido.

30 Tal como se ilustra en la Fig. 3, el título del polipéptido del anticuerpo recombinante obtenido en el medio con alto contenido de cloruro de colina (el medio de crecimiento con alto contenido de colina), muestra un incremento en el título de polipéptido de un 330% en el día 13, en comparación con el medio de crecimiento con bajo contenido de colina, que solo tiene un contenido de cloruro de colina bajo y representa solamente un medio de crecimiento típico.

35 La Fig. 3 también revela que el medio con alto contenido de cloruro de colina permite incluso alcanzar un título de polipéptido que es ligeramente mayor que el título obtenido a partir del medio de producción.

40 b) Experimento 2

Las Figs. 4 y 5 muestran los resultados obtenidos para las células que expresan el mAb2 cultivadas en el Experimento 2, en términos de crecimiento y viabilidad celular.

45 Tal como se ilustra en las Figs. 4 y 5, el medio con alto contenido de cloruro de colina (el medio de crecimiento con alto contenido de colina), tiene solo una pequeña influencia sobre el crecimiento celular, pero produce viabilidades significativamente más altas al final del proceso cuando se compara con el medio de crecimiento con bajo contenido de colina, el cual tiene solo un contenido de cloruro de colina bajo.

50 La Fig. 6 muestra los resultados obtenidos para las células cultivadas en el Experimento 2 en términos del título de polipéptido.

55 La Fig. 6 revela un incremento del 85% del título de polipéptido en el día 11 para el medio de cultivo celular tal como se usa en un proceso de conformidad con la presente invención cuando se compara con el medio de crecimiento con bajo contenido de colina. Además, el título de polipéptido obtenido en el medio de cultivo celular tal como se usa en un proceso de conformidad con la presente invención, es incluso más alto cuando se compara con el título de polipéptido obtenido en el medio de producción que tiene un contenido igualmente alto de cloruro de colina.

60 c) Experimento 3

Las Figs. 7 y 8 muestran los resultados obtenidos para las células que expresan el mAb3 cultivadas en el Experimento 3, en términos del crecimiento y viabilidad celular.

65 Tal como se ilustra en las Fig. 7 y 8, se obtuvieron viabilidades celulares más altas al final del proceso de cultivo con el medio en un proceso de conformidad con la presente invención cuando se comparó con el medio de cultivo celular comparativo (el medio de crecimiento con bajo contenido de colina) que comprendía solo una baja cantidad de cloruro de colina.

La Fig. 9 muestra los resultados obtenidos para las células cultivadas en el Experimento 3, en términos del título de polipéptido.

La Fig. 9 revela que el título de polipéptido obtenido en el medio de cultivo celular tal como se usa en un proceso de conformidad con la presente invención, se incrementó en un 145% en el día 11, cuando se comparó con el medio comparativo, el medio de crecimiento con bajo contenido de colina. El título de polipéptido para el medio de cultivo celular tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención es incluso ligeramente mayor que el título obtenido utilizando el medio de producción con alto contenido de cloruro de colina.

Se ha confirmado experimentalmente, además, que el uso de concentraciones más altas de cloruro de colina en el medio de producción no dio como resultado un mejor crecimiento celular o mejor título de polipéptido cuando se compararon con el uso del medio de producción que tiene una cantidad estándar de cloruro de colina de 240 mg/L.

Los siguientes experimentos adicionales se llevaron a cabo con el fin de determinar la influencia del medio de cultivo celular sobre la calidad del producto polipeptídico. En particular, el producto se analizó con el fin de determinar la influencia de los medios sobre la agregación y la glucosilación.

La Fig. 10 muestra el porcentaje de agregación del producto de anticuerpo recombinante en relación con la cantidad total de anticuerpo recombinante. La tasa de agregación en el medio de cultivo celular tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención, se reduce en más de un 30% en relación con el medio de producción.

La expresión de mAb3 en diferentes medios de cultivo celular, seguida por el análisis del patrón de glucosilación de los anticuerpos recombinantes, muestra que el medio de crecimiento tal como se utiliza en un proceso de conformidad con la presente invención, con un alto contenido de cloruro de colina, produce un anticuerpo recombinante con una cantidad total más baja del producto recombinante con alta manosilación, lo cual representa un patrón de glucosilación no deseado. Utilizando un medio en un proceso de conformidad con la invención se obtuvo una reducción de más del 55% en términos de alta manosilación, en comparación con el uso del medio de producción.

Producción por lotes con alimentación del biorreactor (Experimento 4)

El siguiente experimento es una producción por lotes con alimentación en el biorreactor. Corresponde al anterior Experimento 3. Se utilizaron células que expresaban el mAb3. Las condiciones son las siguientes: volumen inicial 2 L; alimentación continua de dos diferentes soluciones de alimentación, iniciando el día 3 y 5, con una tasa de alimentación de 2 y 0,4% del volumen de cultivo inicial, por día; un cambio de temperatura de 36,5°C a 33°C en el día 5; pO₂=30%; pH=6,9 (banda inactiva 0,1); controlado con CO₂ y NaOH 0,5M; velocidad de agitación = 300 rpm.

Las Figs. 11 y 12 muestran los resultados obtenidos para el porcentaje de densidad y viabilidad celular en el Experimento 4, llevado a cabo en forma de una producción por lotes con alimentación en un biorreactor.

Con respecto al crecimiento y viabilidad celular, los resultados de la producción por lotes con alimentación en el biorreactor son consistentes con los resultados obtenidos en los experimentos en matraces en agitación. Es decir, la producción por lotes con alimentación en el biorreactor básicamente confirma los resultados obtenidos en los experimentos en matraces en agitación.

De manera similar al experimento en matraces en agitación, el pico de densidades de células viables alcanzado con el medio de producción fue ligeramente más alto en comparación con el proceso de la invención con un medio de cultivo celular (el medio de crecimiento con alto contenido de colina) con alto contenido de cloruro de colina. Sin embargo, el porcentaje de viabilidad se mantuvo en un nivel significativamente más alto cuando el proceso de la invención con un medio de cultivo celular es decir, el medio suplementado con alto contenido de cloruro de colina, se utilizó en comparación con el medio de crecimiento no suplementado que tenía solo un bajo contenido de cloruro de colina.

La Fig. 13 muestra los resultados obtenidos para el título de polipéptido en el Experimento 4, llevado a cabo en un proceso por lotes con alimentación en un biorreactor.

El título de polipéptido medido en el día 11 para el proceso de la invención con un medio de cultivo celular con alto contenido de cloruro de colina, se incrementó en un 170% cuando se comparó con el medio de crecimiento comparativo, que tiene solo una baja cantidad de cloruro de colina.

Mientras que el título de polipéptido obtenido para el proceso de la invención con un medio de cultivo celular con alto contenido de cloruro de colina es incluso superior al título de polipéptido obtenido utilizando el medio de producción para propósitos comparativos en los experimentos en matraces en agitación, el experimento en la producción por lotes con alimentación en el biorreactor revela un título de polipéptido ligeramente más bajo en el proceso de la invención con un medio de cultivo celular con alto contenido de cloruro de colina cuando

se compara con el medio de producción. No obstante, el título de polipéptido obtenido en el biorreactor utilizando el proceso de la invención con un medio de cultivo celular con alto contenido de cloruro de colina es muy alto y todavía está a un nivel comparable con el título de polipéptido obtenido utilizando el medio de producción para propósitos de comparación.

5 El experimento 4 en el biorreactor confirma además que el proceso de la invención con un medio de cultivo celular con alto contenido de cloruro de colina representa una alternativa adecuada a los medios de producción convencionales, permitiendo alcanzar títulos de polipéptido comparables mientras que la cantidad total de aminoácidos o la cantidad de aminoácidos seleccionados se puede reducir significativamente en el medio de cultivo celular respectivo.

10 El Experimento 4 en el biorreactor también prueba una vez más que el incremento del contenido de cloruro de colina en un medio de crecimiento típico ayuda a alcanzar un tremendo incremento del título de polipéptido cuando se utiliza el medio de crecimiento para la producción de polipéptidos.

15 Adición de diferentes concentraciones de cloruro de colina al medio de crecimiento

20 En un conjunto de experimentos adicional, se agrega cloruro de colina en varias concentraciones (40; 80; 120; 160; 200; 240; 500; 840; 1000; 3000 y 5000 mg/L en total) al medio de crecimiento en polvo. Los medios así obtenidos se utilizaron para producir mAb3 y mAb4, respectivamente, en general de la manera señalada anteriormente.

25 En la Fig. 14 a Fig. 24 se ilustran adicionalmente las concentraciones de anticuerpo normalizado, densidad de células viables normalizada y viabilidad para el mAb3, y, además, para el mAb4, la productividad específica celular normalizada durante toda la duración del cultivo (13 resp. 17 días).

30 Como puede observarse a partir de estos datos, los valores más bajos en términos de viabilidad y concentración de anticuerpo después de 13 o 17 días en cultivo, se alcanzan en el medio de crecimiento con 40 mg/L de cloruro de colina en total. Concentraciones de 3000 mg/L y más no afectaron negativamente la viabilidad de las células, pero como las células no crecían en esos medios, la concentración de anticuerpos permaneció por debajo de 1. Las viabilidades son más altas para todas las concentraciones de colina mayores de 40 mg/L. Parece ser un efecto dependiente de la concentración de cloruro de colina sobre la viabilidad. Concentraciones de cloruro de colina más altas en el medio dieron como resultado una mayor viabilidad al final del cultivo.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la producción de un anticuerpo recombinante que comprende una fase de producción en el que células CHO recombinantes se cultivan en un medio de cultivo celular y se expresa el anticuerpo recombinante, en donde el medio de cultivo celular está libre de suero y libre de proteínas, comprende de 60 a 2500 mg/L de cloruro de colina o una cantidad equivalente de otra sal de colina y tiene una concentración total de aminoácidos de 20 a 57 mmol/L.
- 10 2. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, en el que las células se cultivan en un proceso por lotes con alimentación.
3. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el medio de cultivo celular comprende de 80 a 1,000 mg/L de cloruro de colina, o una cantidad equivalente de otra sal de colina.
- 15 4. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio de cultivo celular tiene una concentración total de aminoácidos de 35 a 54 mmol/L.
- 20 5. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio de cultivo celular contiene glutamina en una concentración de 500 a 1,400 mg/L.
6. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el contenido de glutamina en el medio de cultivo celular es de una cantidad de 900 a 1,200 mg/L.
- 25 7. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el medio de cultivo celular de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 comprende los siguientes aminoácidos en las siguientes concentraciones, expresadas en mmol/L:

	Arginina	4,0 - 6,0
	Asparagina	3,0 - 6,0
30	Ácido aspártico	2,5 - 4,0
	Glicina	0,3 - 0,8
	Histidina	0,6 - 1,0
	Isoleucina	2,0 - 5,0
	Leucina	3,0 - 7,0
35	Lisina	2,0 - 4,0
	Metionina	1,0 - 1,5
	Fenilalanina	1,0 - 2,0
	Prolina	2,5 - 6,0
	Serina	3,0 - 8,0
40	Treonina	2,0 - 3,5
	Triptófano	0,4 - 1,0
	Valina	2,5 - 5,0
	Tirosina	1,0 - 2,0
45	Cistina	0,5 - 1,0

Fig. 1

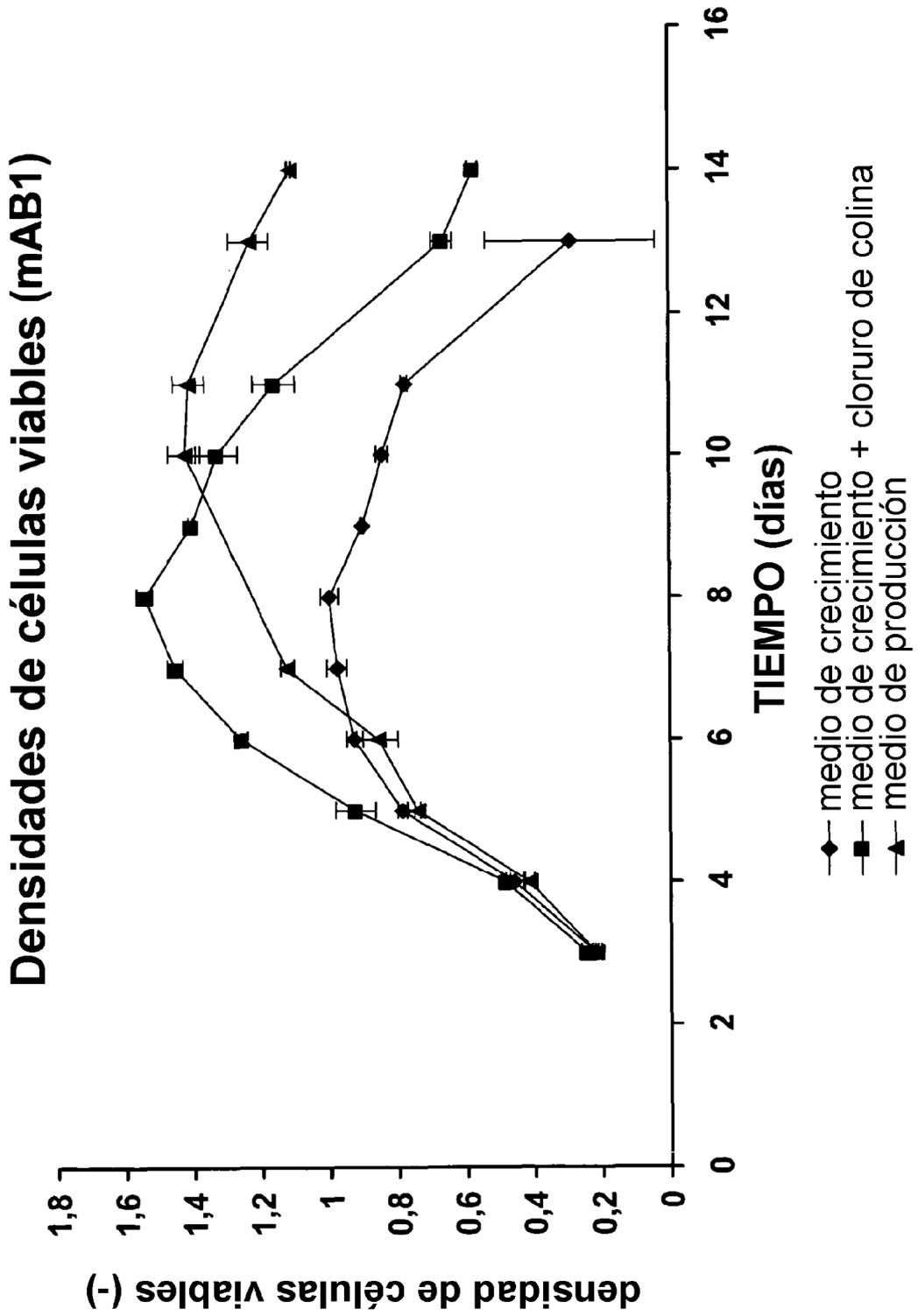


Fig. 2

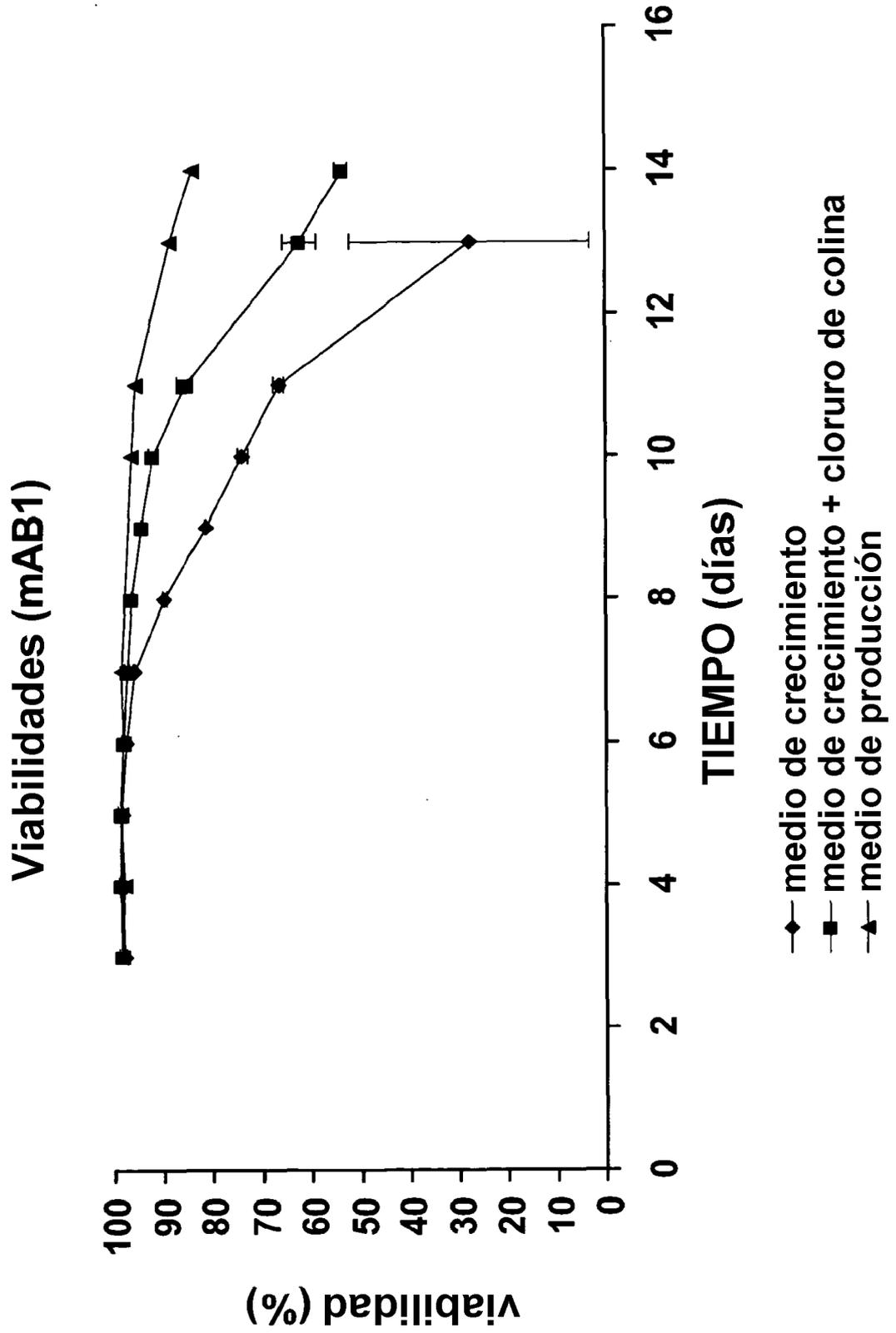


Fig. 3

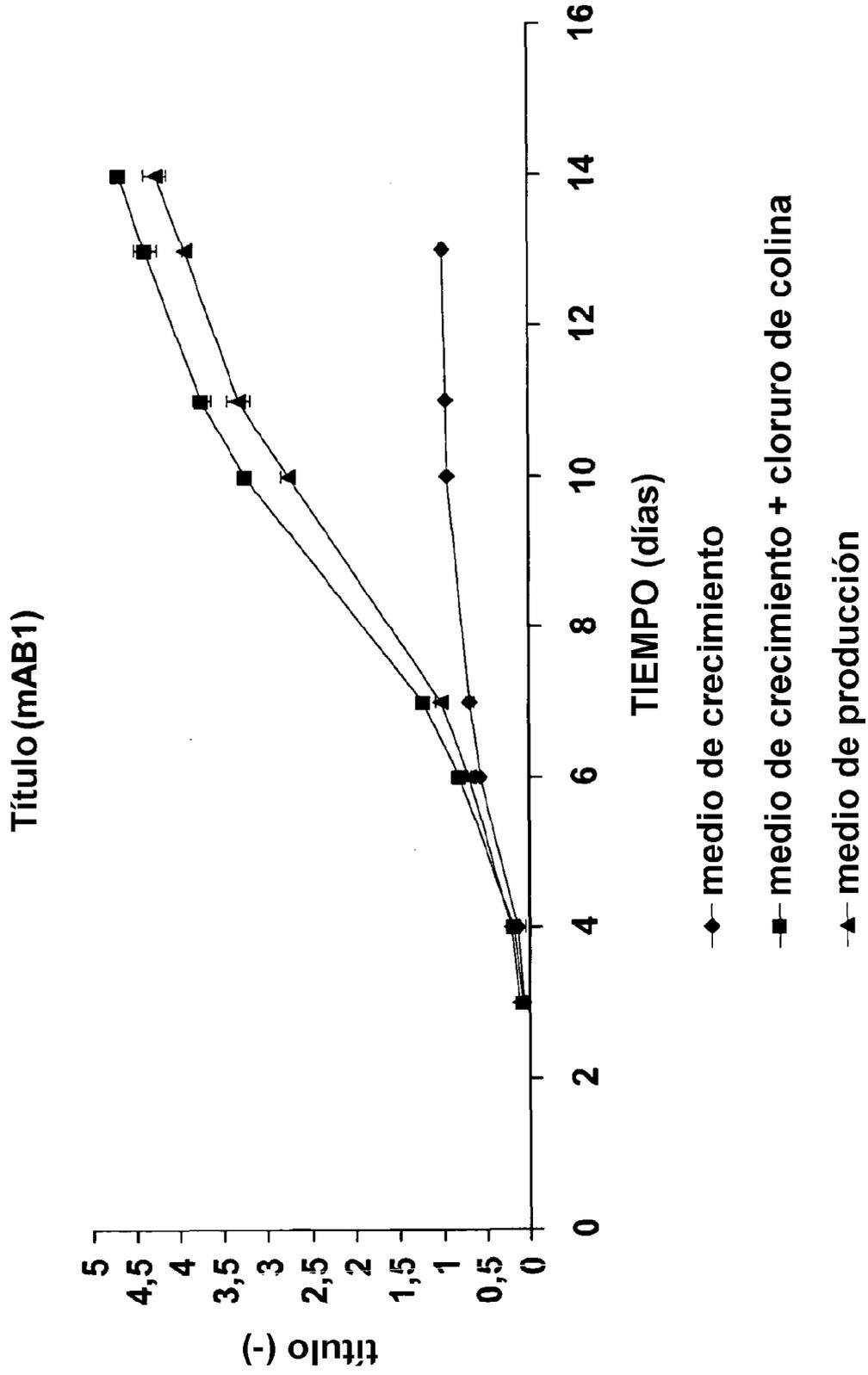


Fig. 4

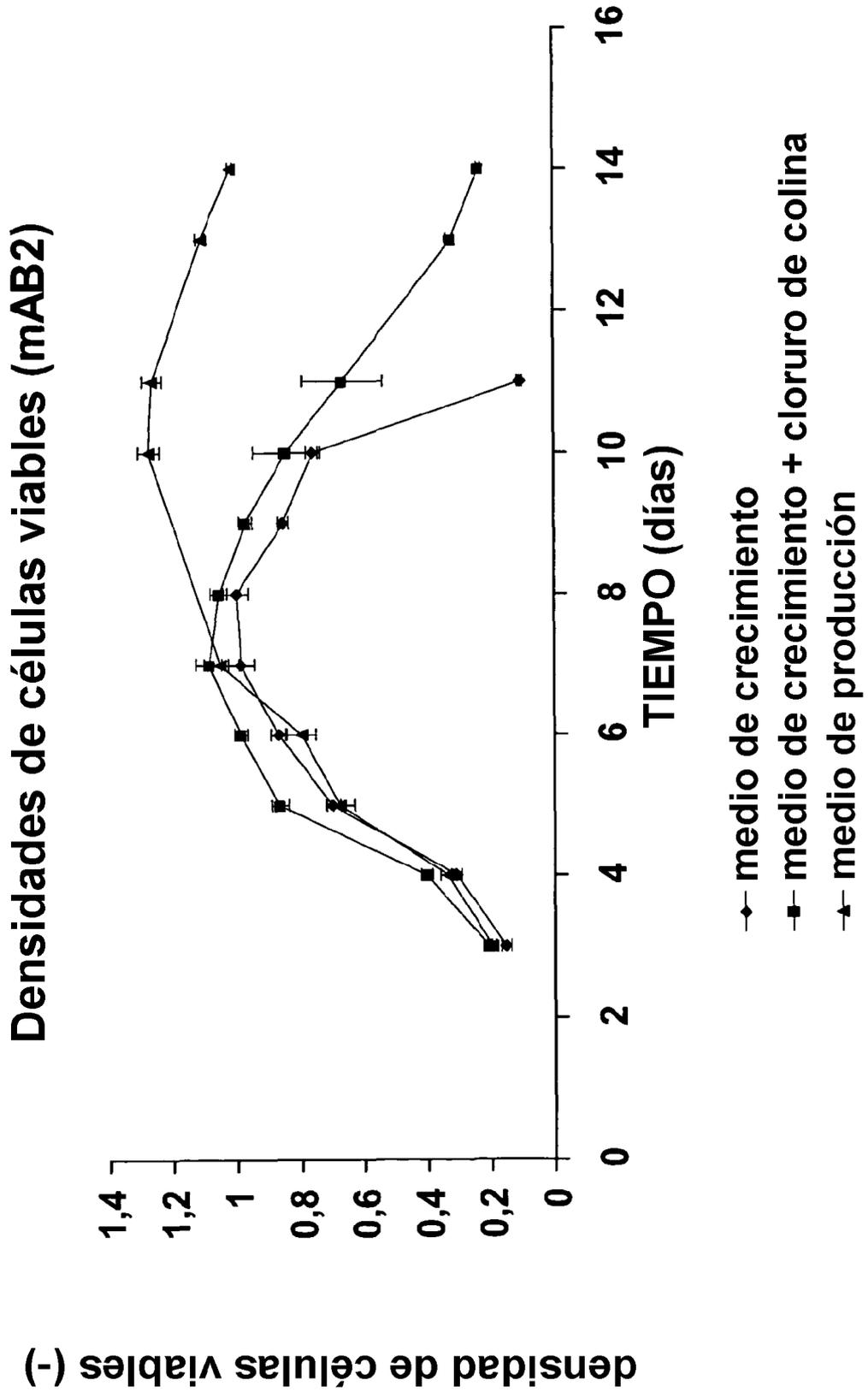
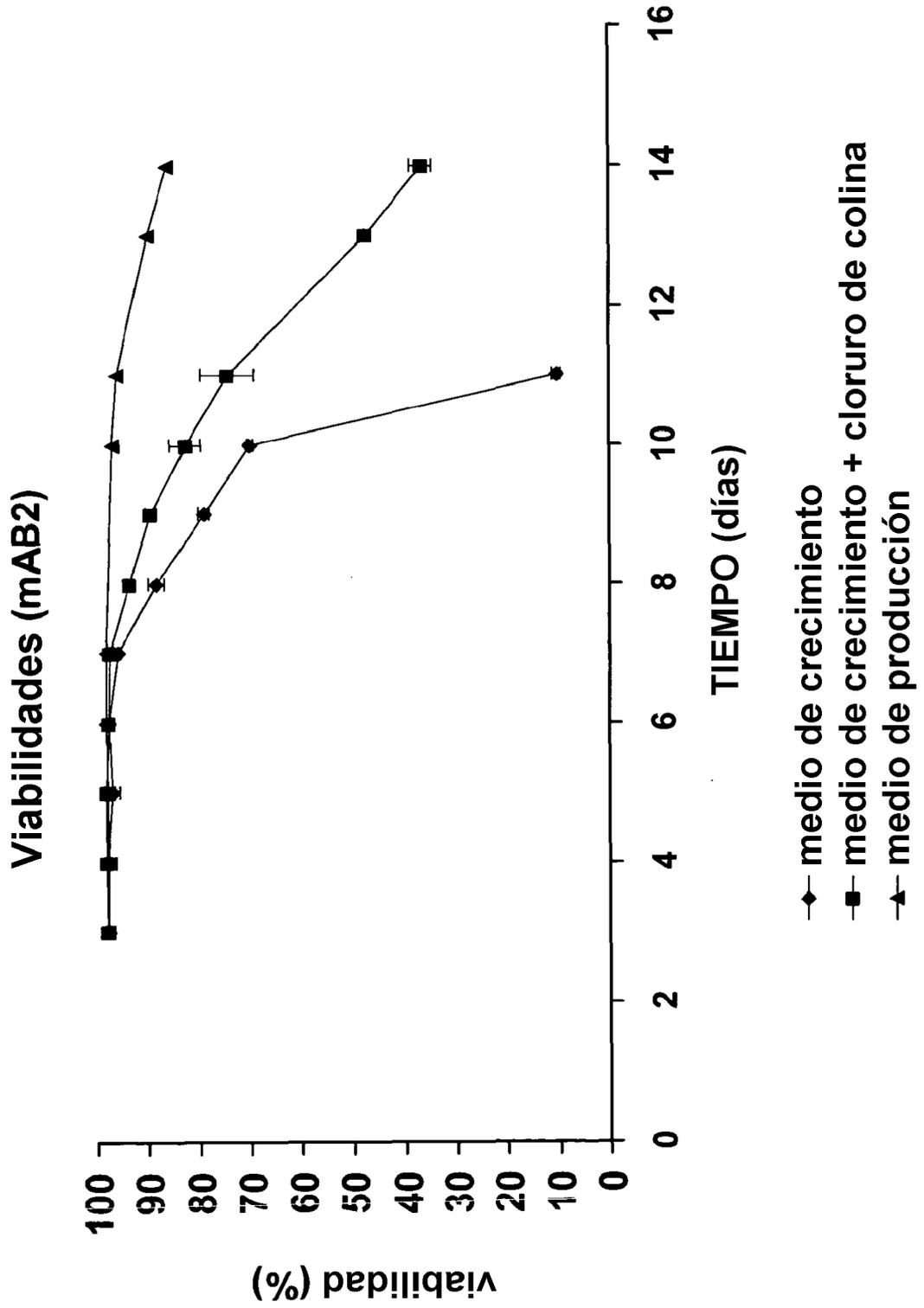


Fig. 5



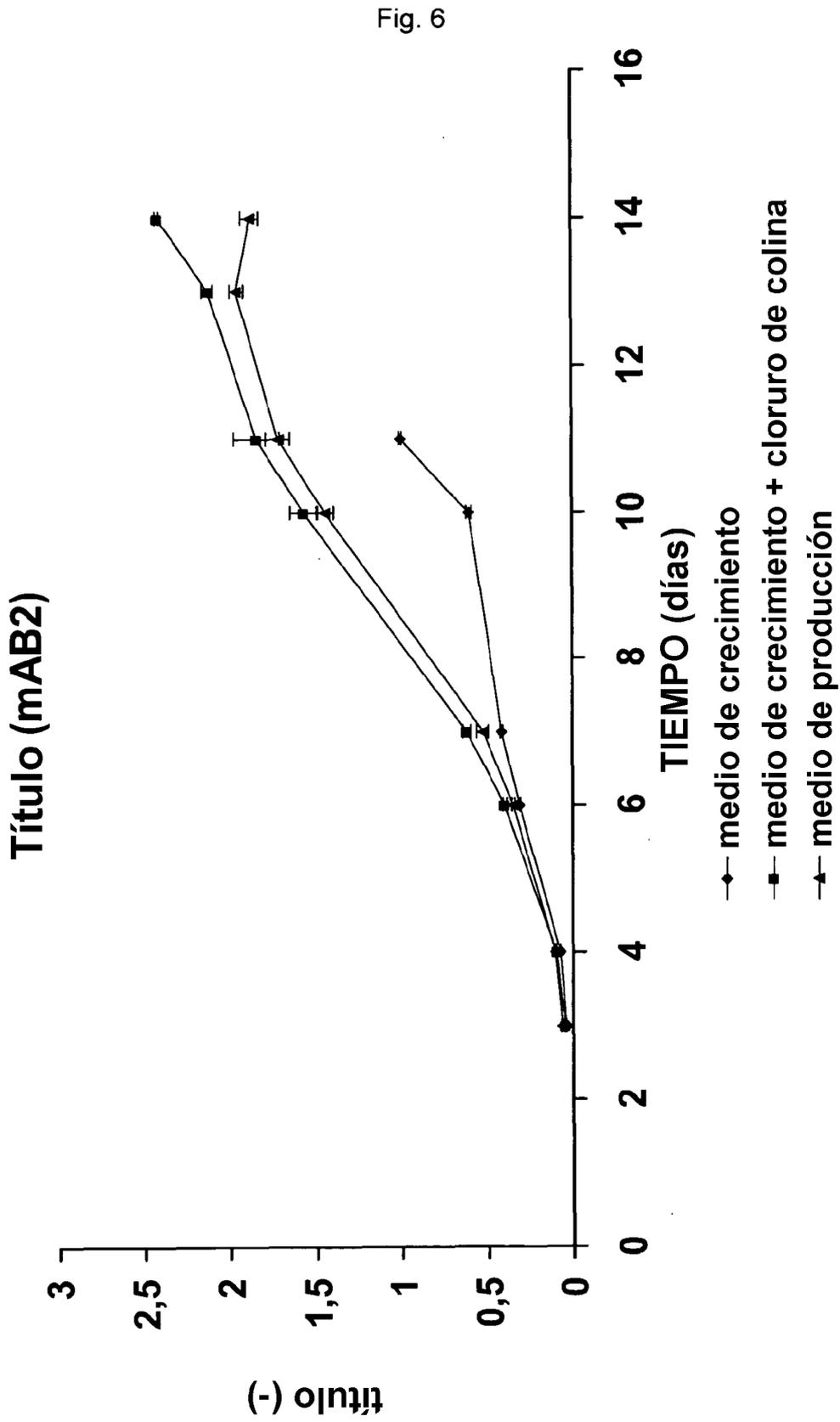


Fig. 7

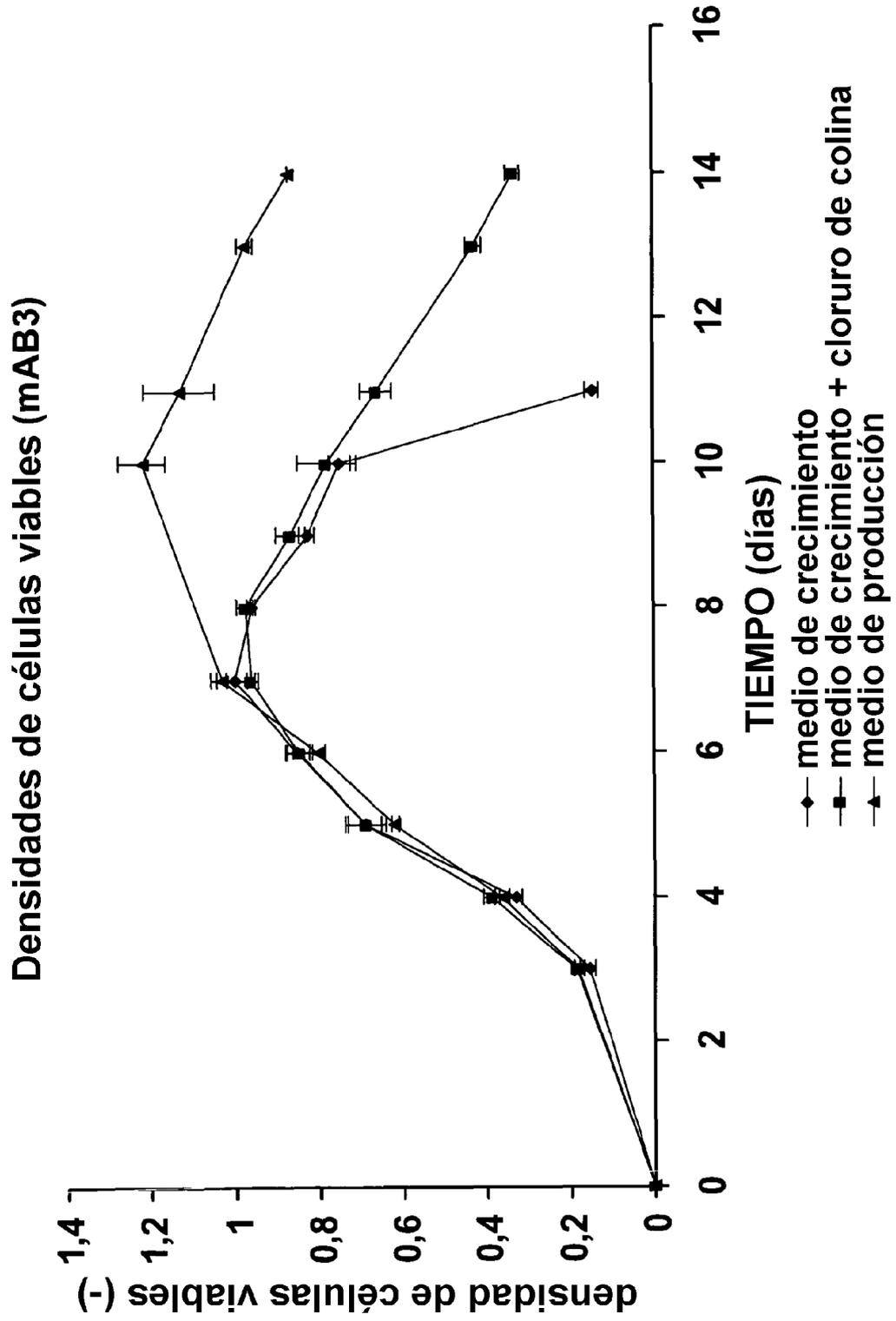


Fig. 8

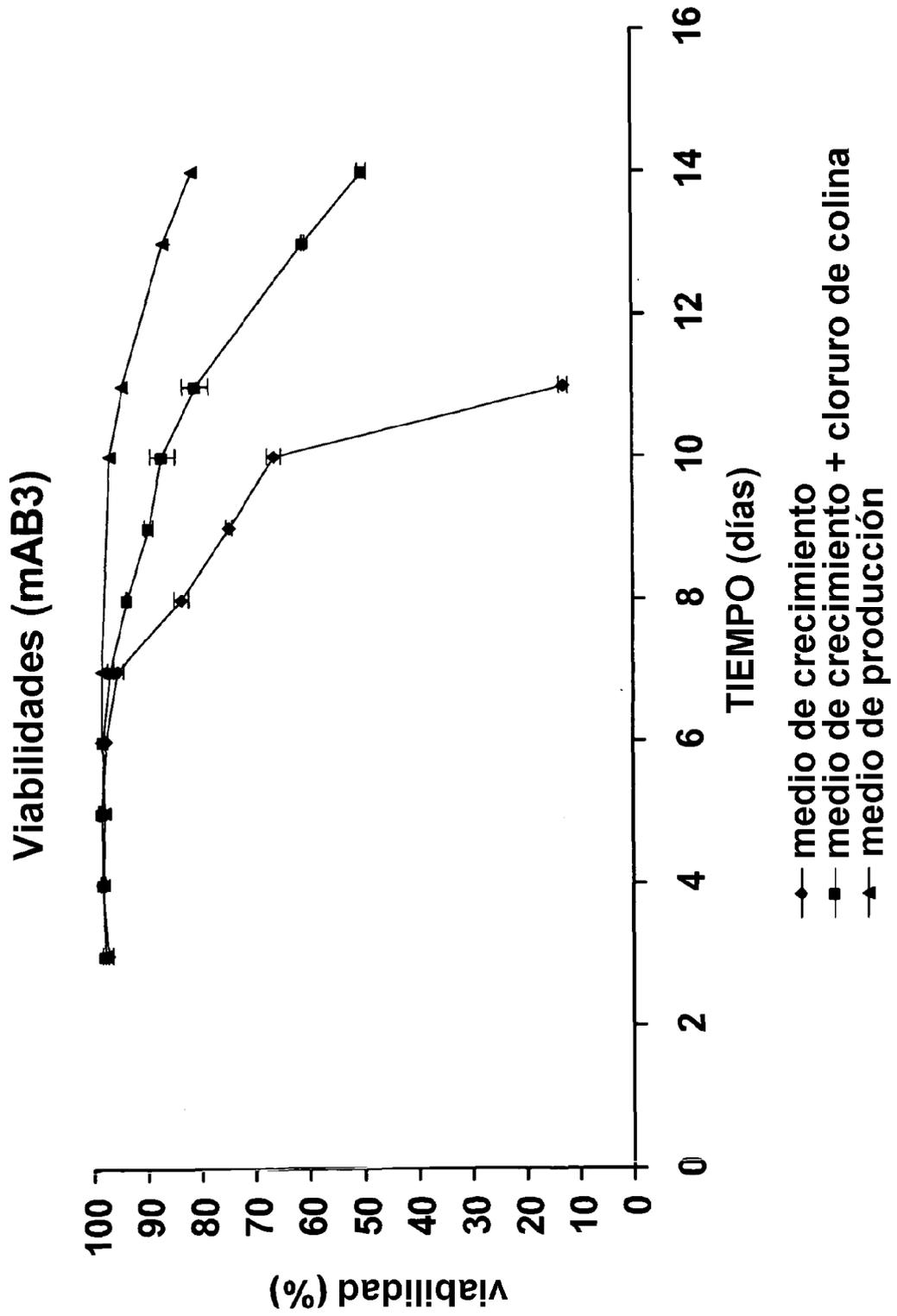


Fig. 9

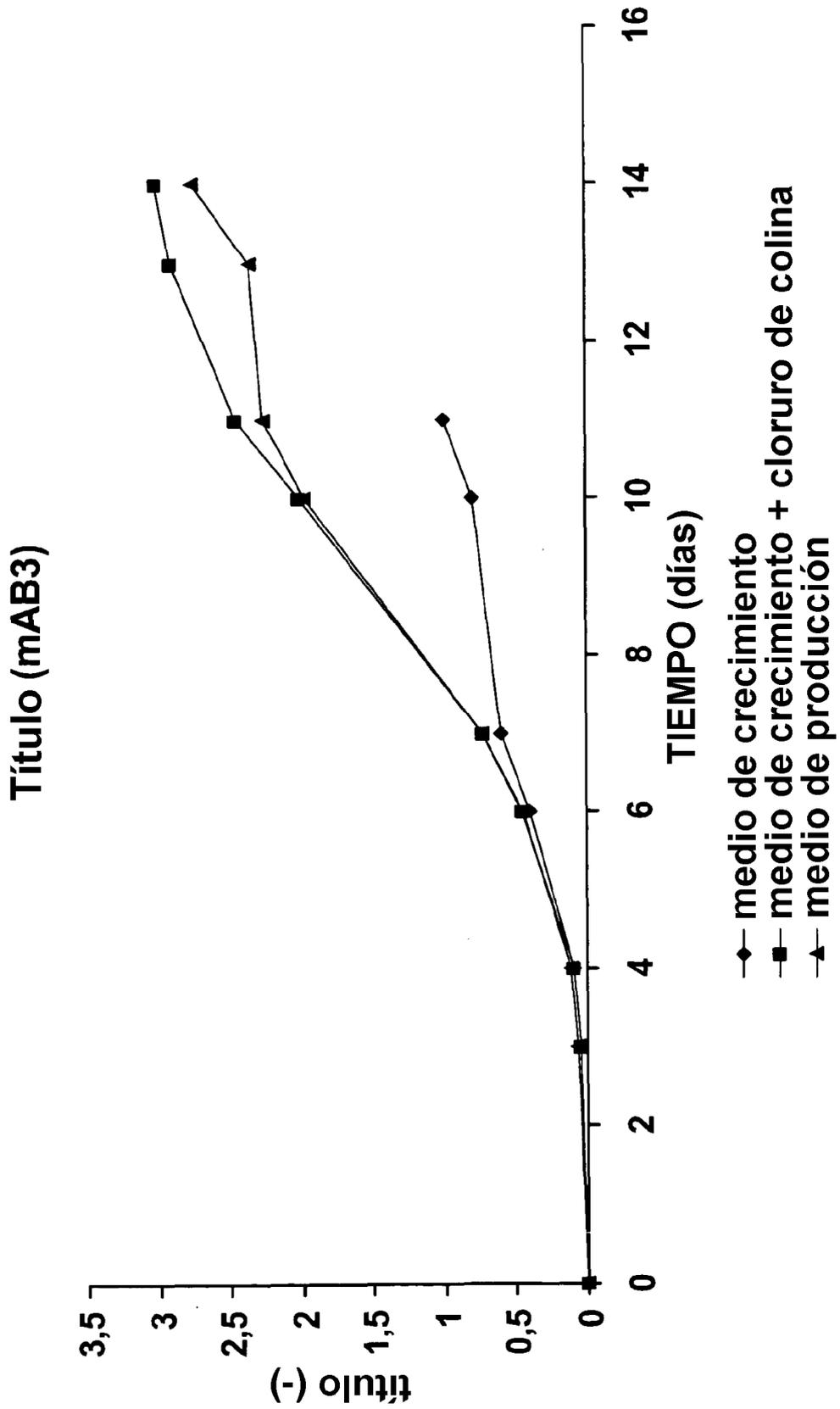


Fig. 10

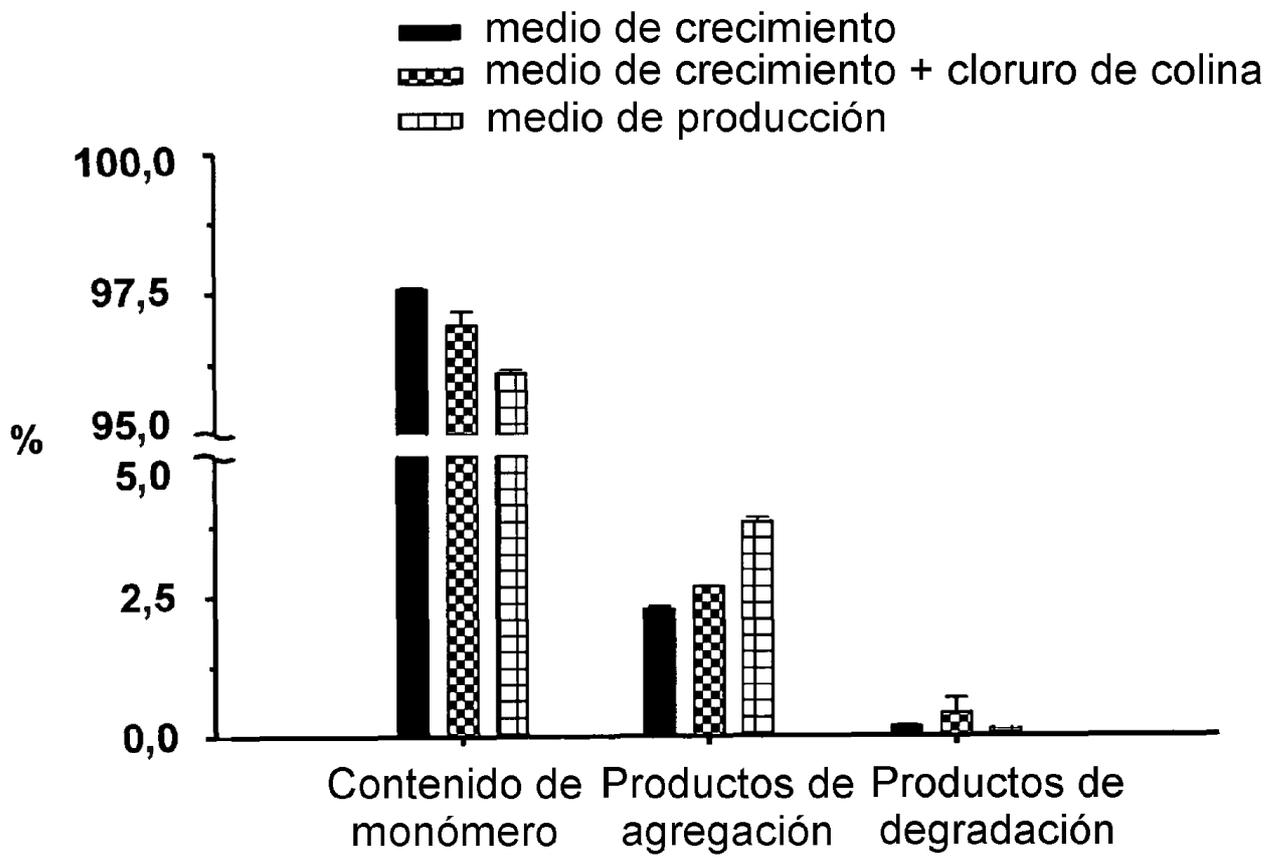


Fig. 11

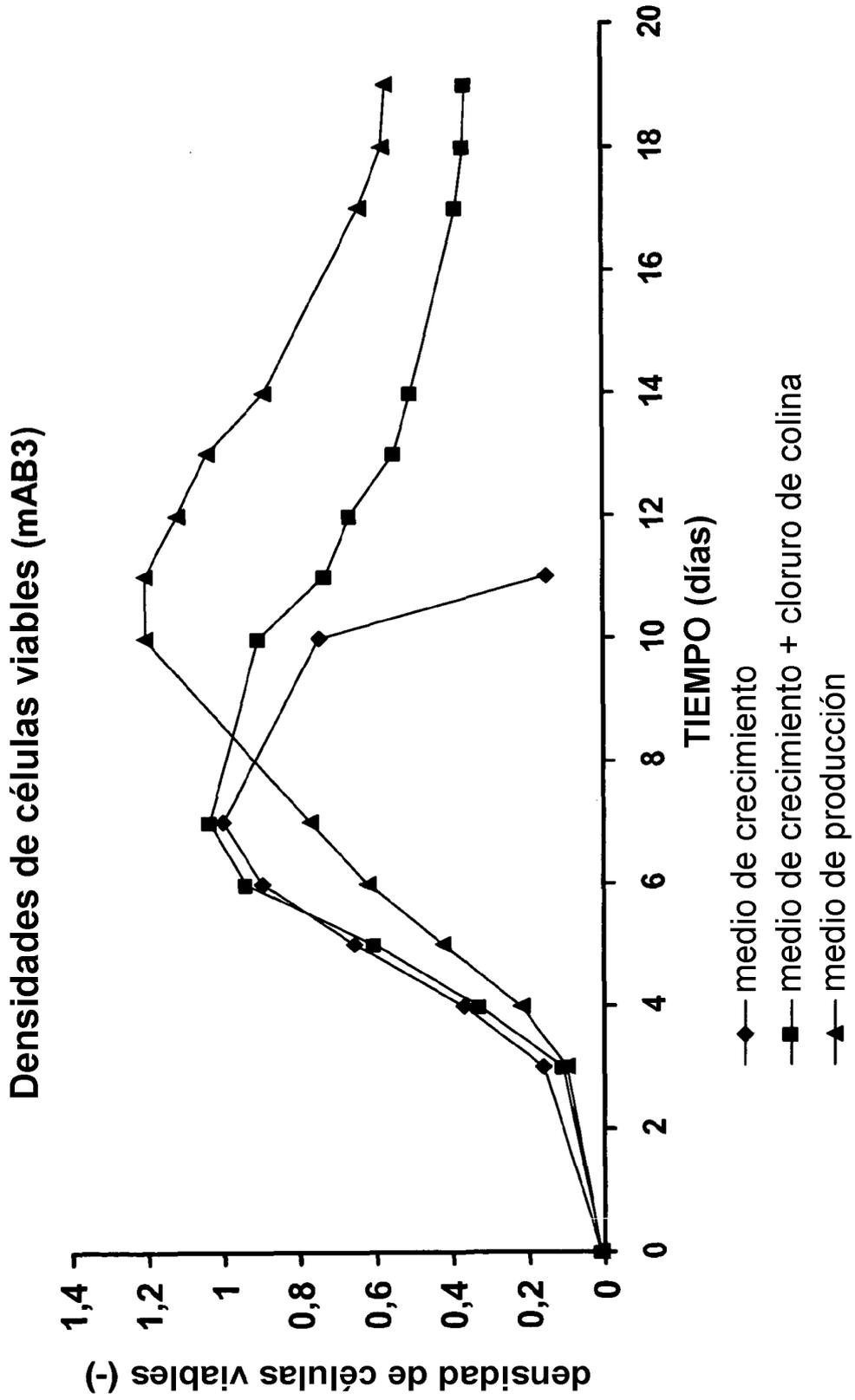


Fig. 12

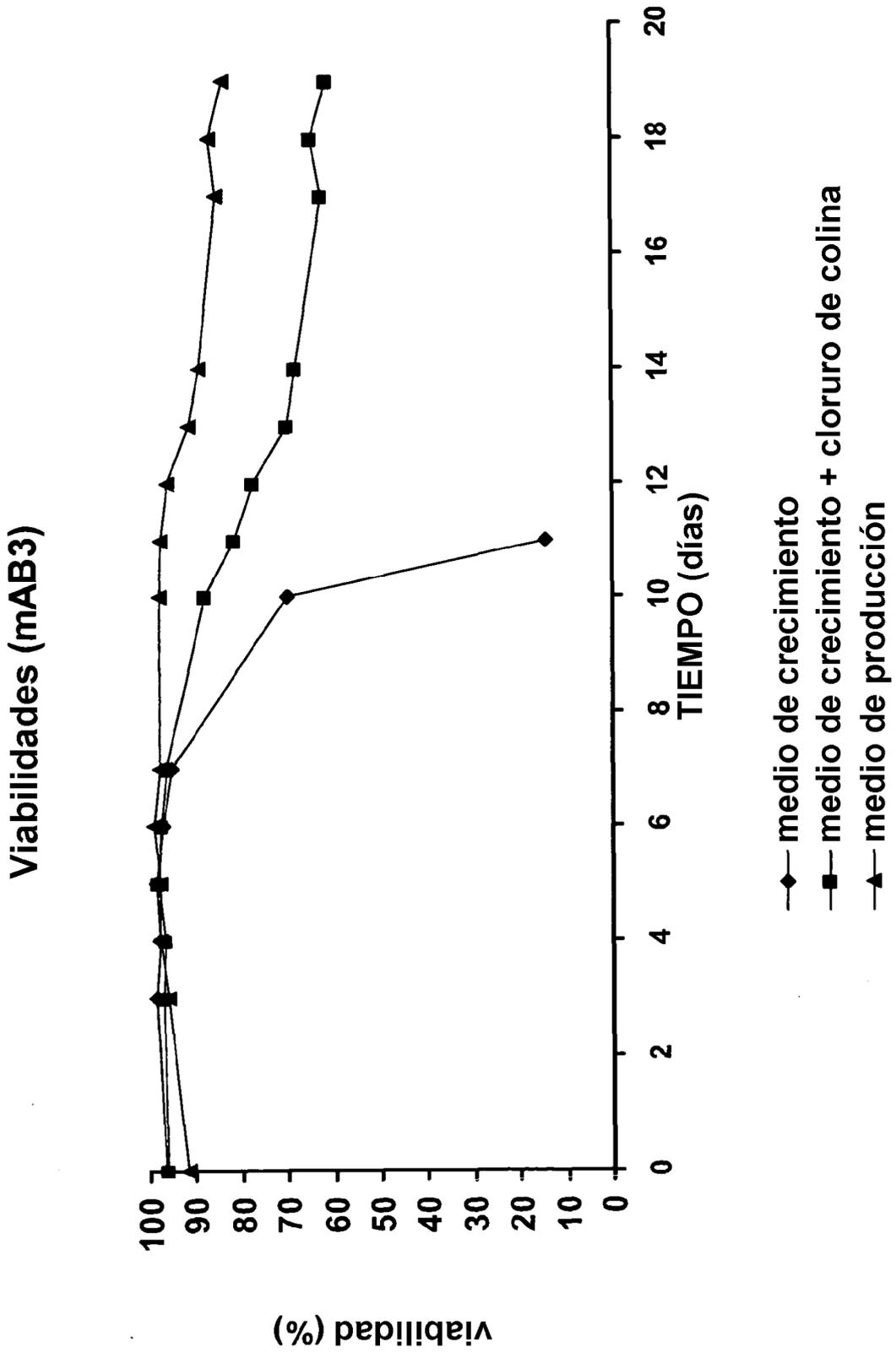
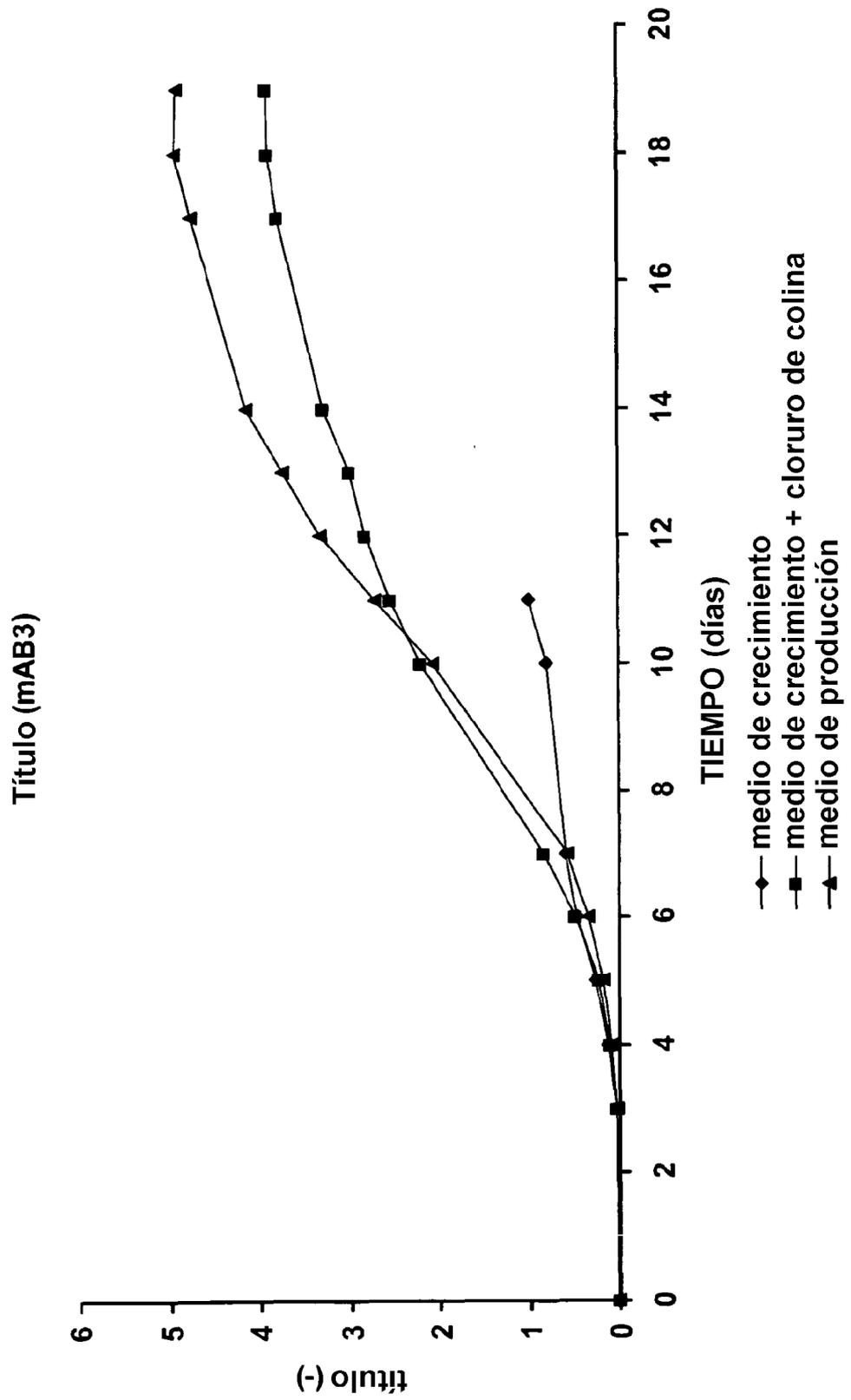
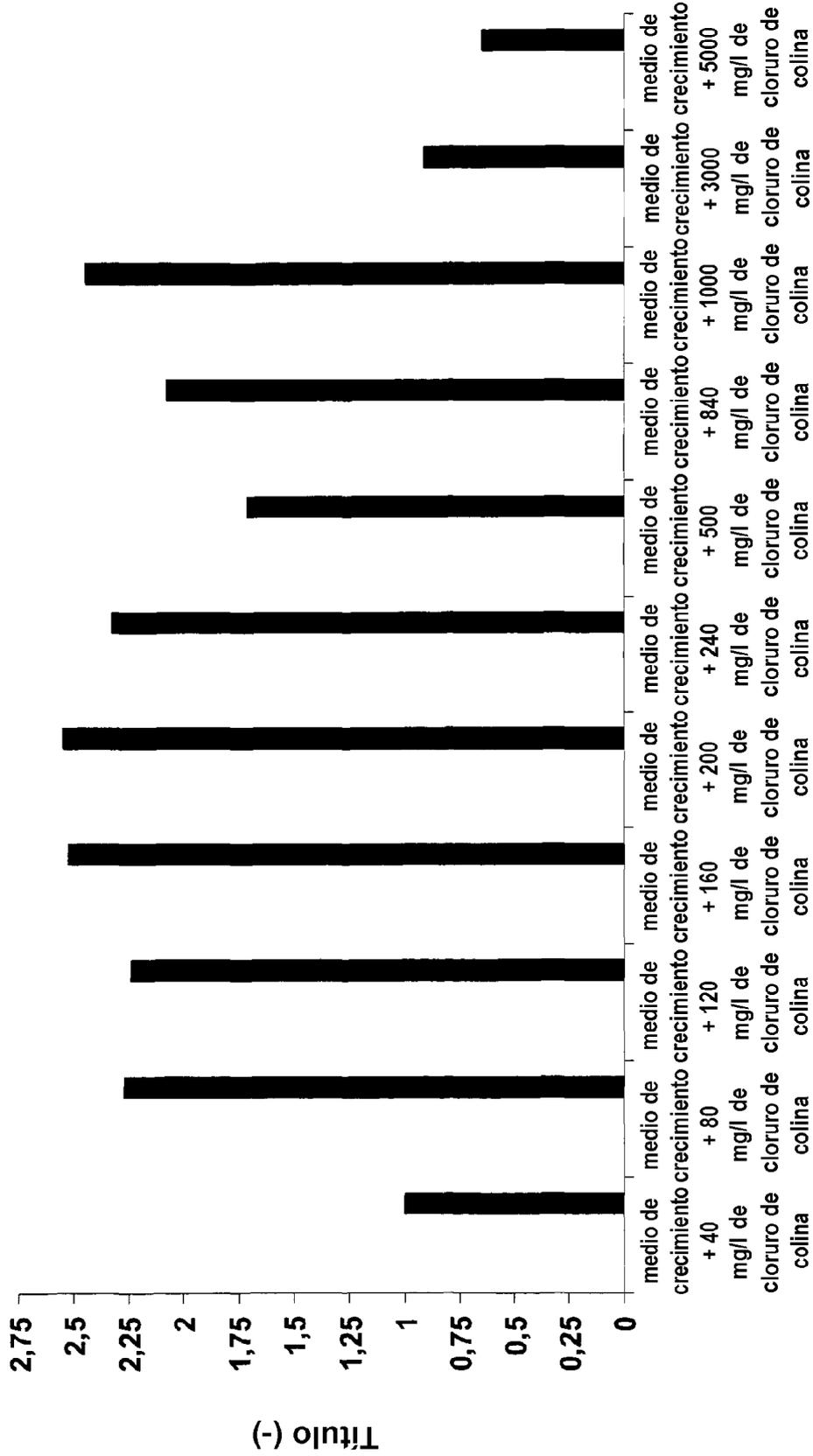


Fig. 13



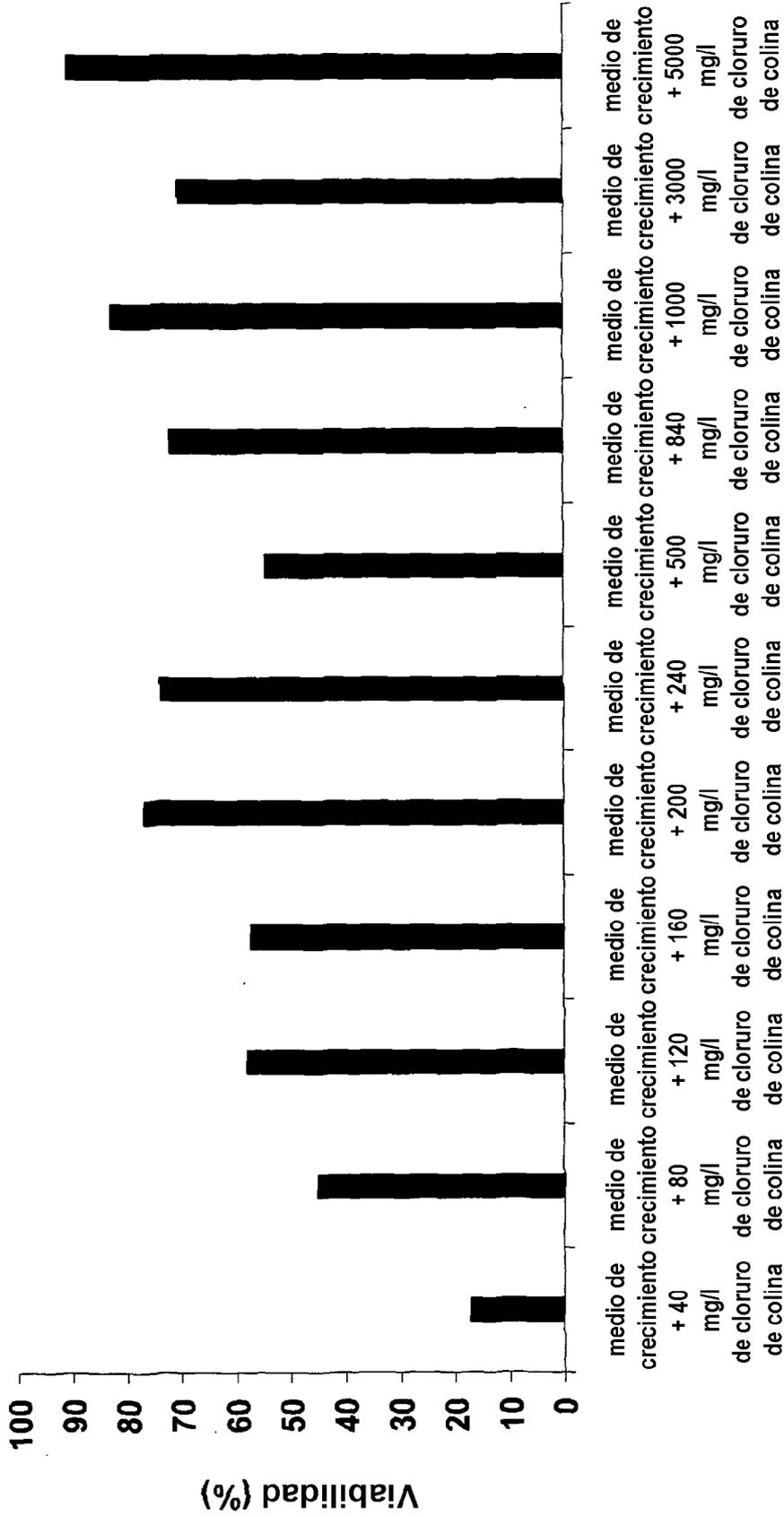
Concentración de anticuerpo (mAB3) después de 13 días en cultivo



Concentración de cloruro de colina

Viabilidades después de 13 días en cultivo (mAB3)

Fig. 15



Concentración de cloruro de colina

Fig. 16

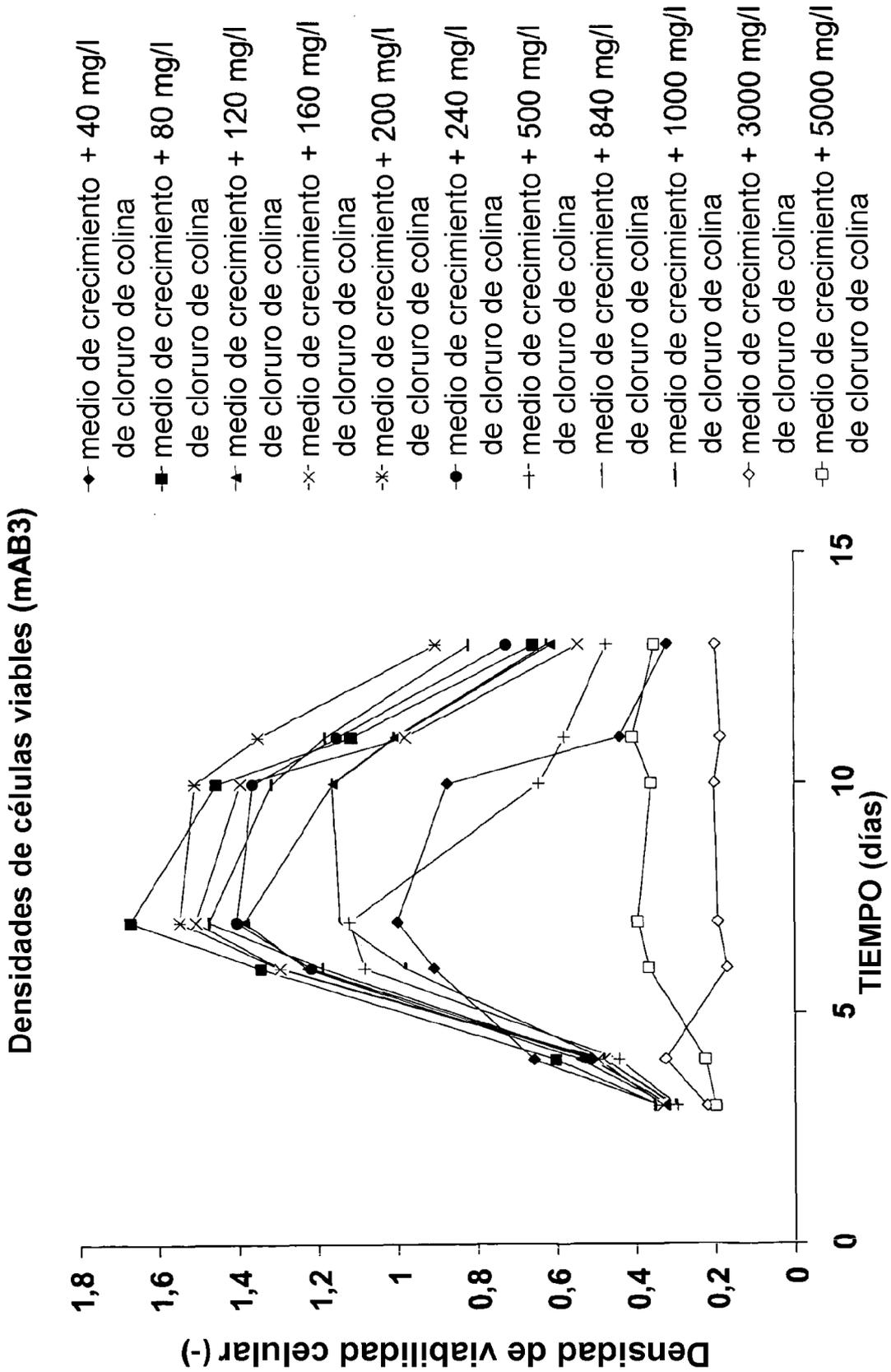


Fig. 17

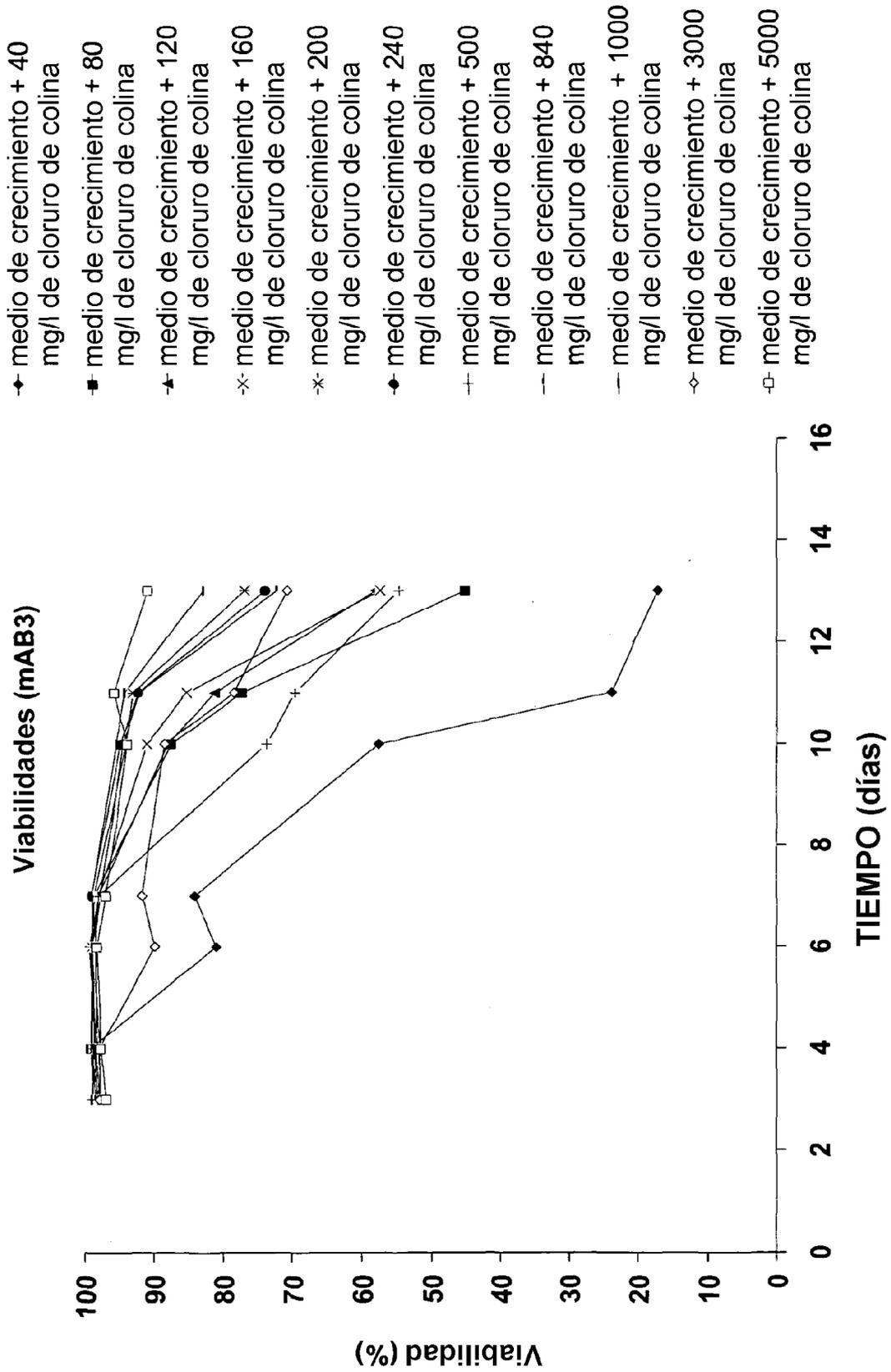
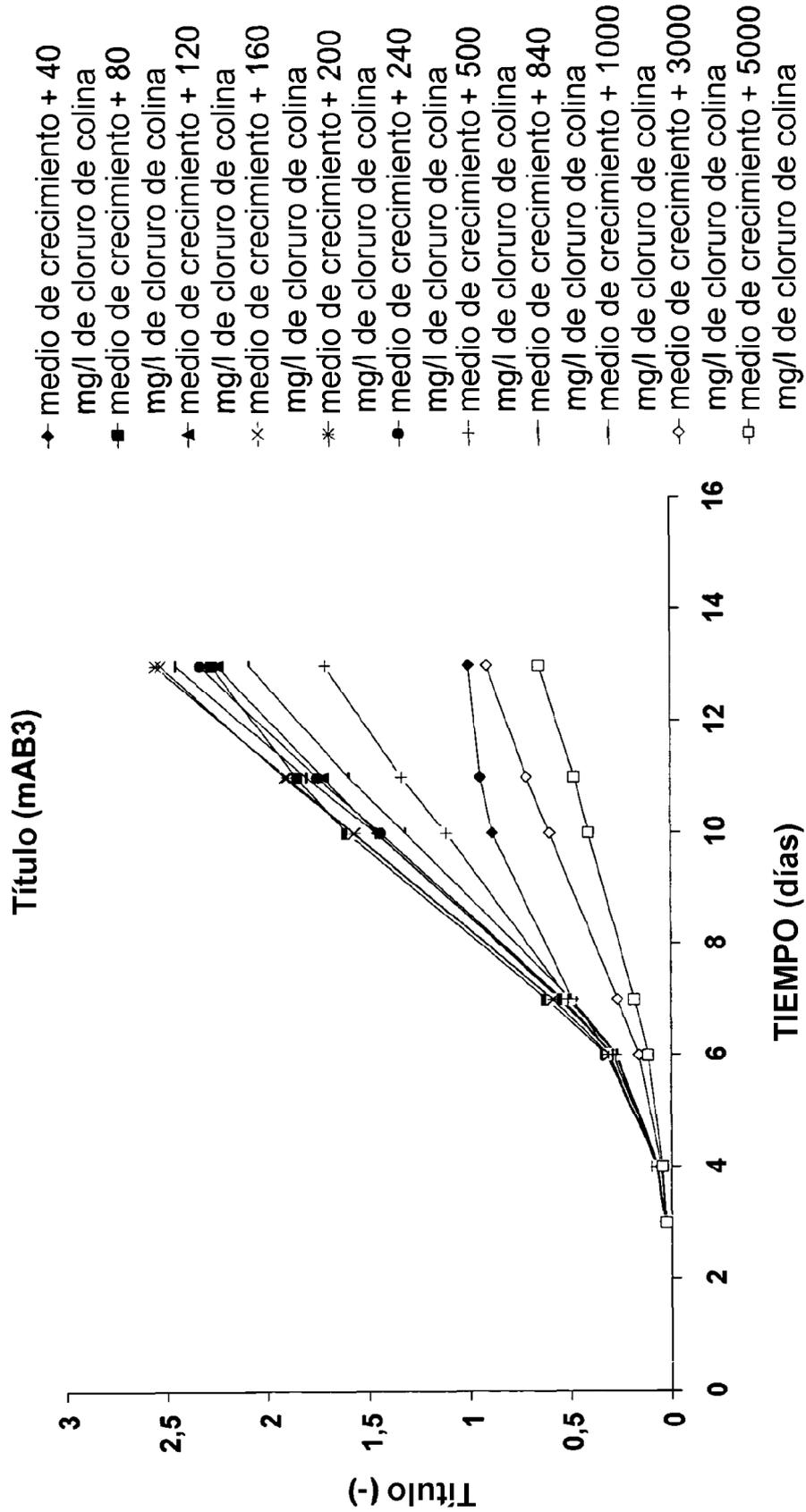


Fig. 18



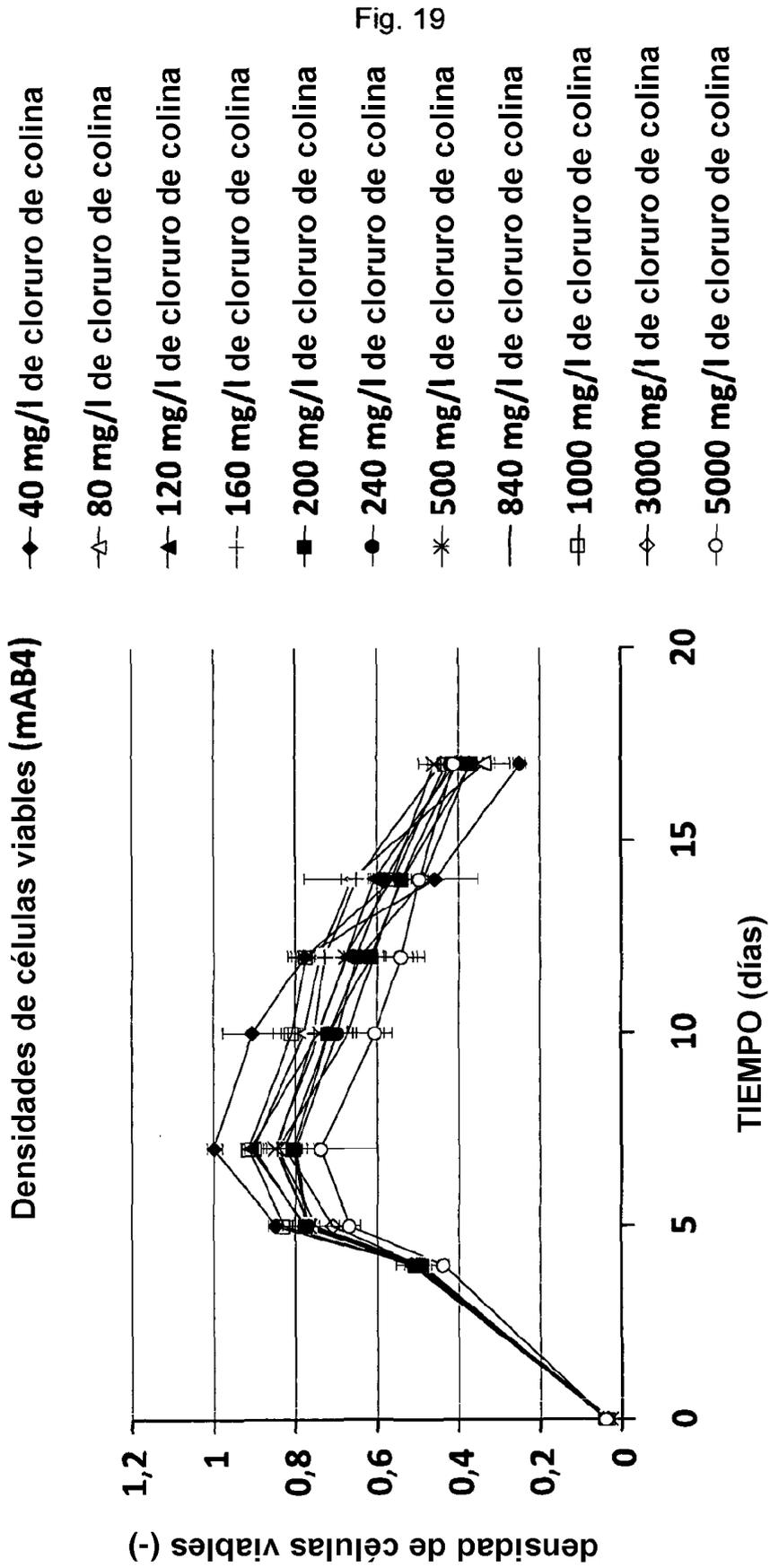
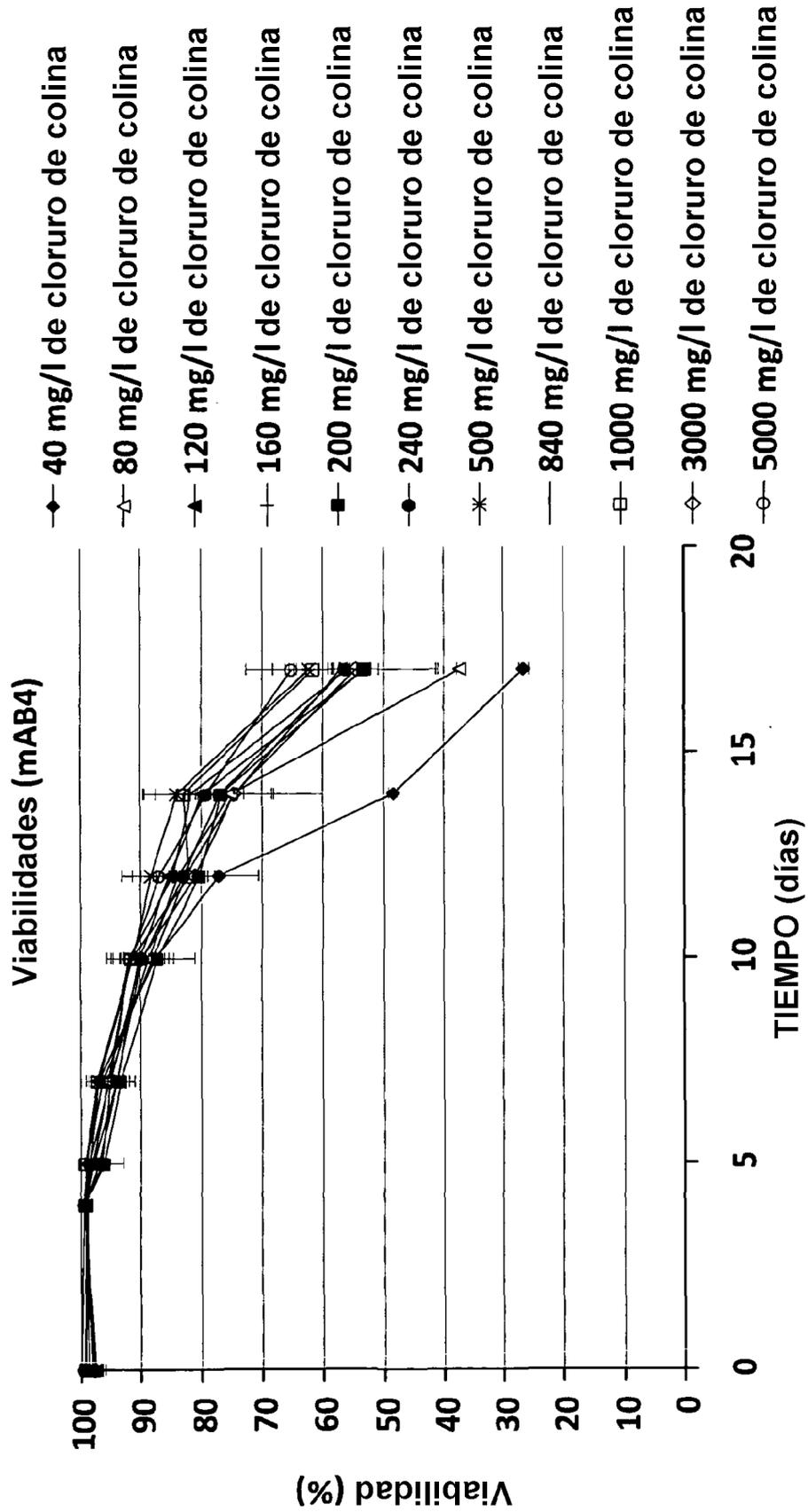


Fig. 20



Viabilidades después de 17 días en cultivo (mAB4)

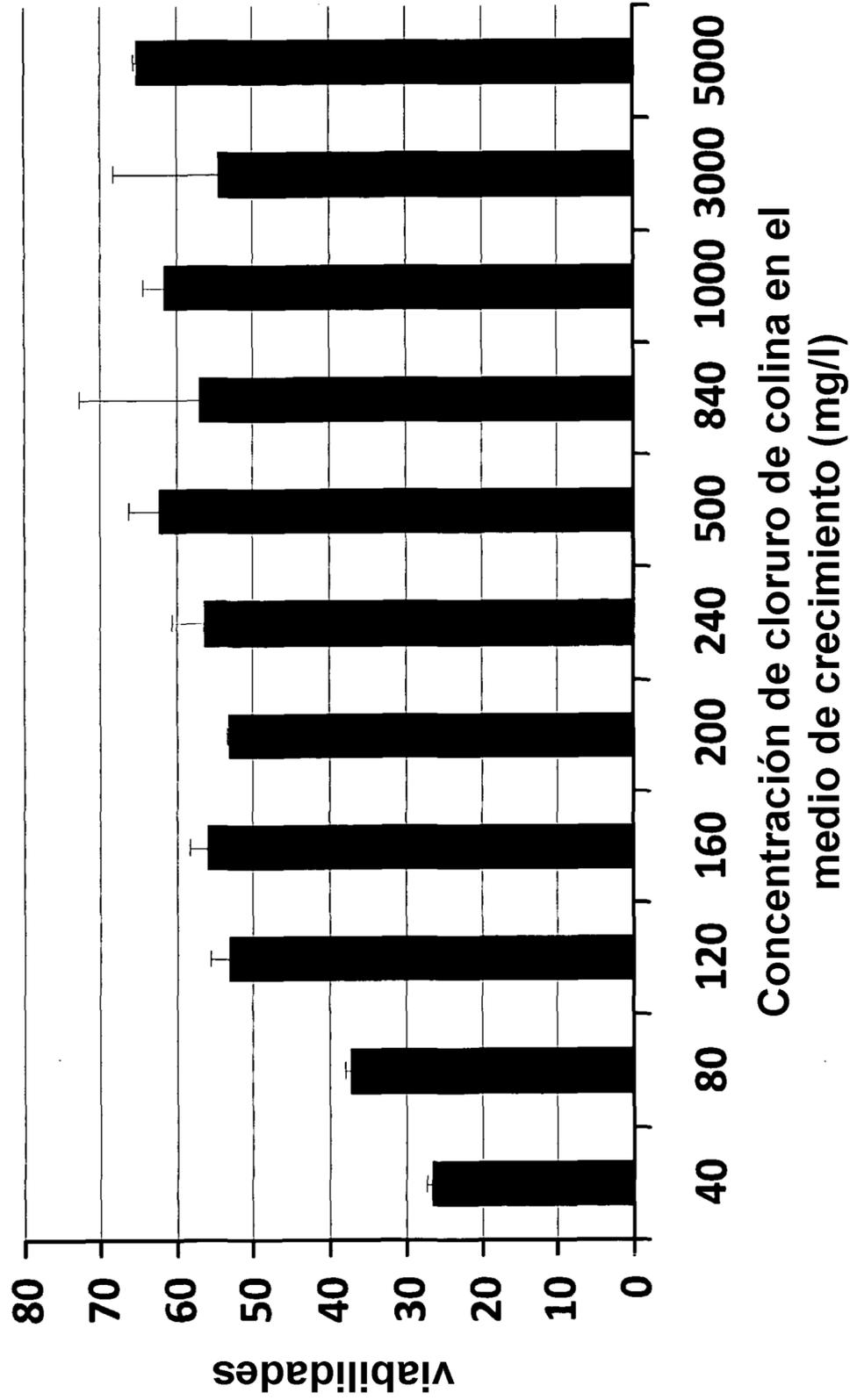


Fig. 22

