

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 146**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2012 PCT/IB2012/055457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2012 E 12798373 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2768944**

54 Título: **Adición de hierro para mejorar el cultivo celular**

30 Prioridad:

21.10.2011 US 201161550058 P

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

22.09.2020

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**WANG, WENGE;
LUAN, YEN-TUNG;
DRAPEAU, DENIS y
NOLAN, RYAN P.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 784 146 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

Adición de hierro para mejorar el cultivo celular

Antecedentes

5 Un problema común en el cultivo celular de mamíferos es la muerte celular al final del cultivo, que puede ser causada por diversas agresiones, como el agotamiento de nutrientes, la acumulación de inhibidores y/o el estrés oxidativo, entre otros. Es de gran interés en general, y especialmente para aquellos que utilizan sistemas de cultivo de mamíferos para expresar productos proteicos farmacéuticamente relevantes, para mantener la viabilidad celular y/o retrasar la muerte celular durante la duración de los procedimientos de cultivo celular. Se han empleado varios procedimientos para aumentar la viabilidad de los cultivos celulares, como el uso de aditivos de medios y la sobreexpresión de genes antiapoptosis. Véase, por ejemplo, Arden, et al. "Chemical caspase inhibitors enhance cell culture viabilities and protein titer" *Biotechnol Prog.* 2007 Mar-Apr; 23 (2): 506-511; Mastrangelo, et al. "Antiapoptosis chemicals prolong productive lifetimes of mammalian cells upon Sindbis virus vector infection" *Biotechnol Bioeng.* 1999 Nov 5; 65 (3): 298-305; Balcarcel, et al. "Rapamycin Reduces Hybridoma Cell Death and Enhances Monoclonal Antibody Production" *Biotechnology and Bioengineering*, 2001 Vol. 76, 1-10; Zanghi et al. "The growth factor inhibitor suramin reduces apoptosis and cell aggregation in protein-free CHO cell batch cultures." *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 319-325; Simpson, et al. "Prevention of hybridoma cell death by bcl-2 during suboptimal culture conditions" *Biotechnol Bioeng* 1997, 54: 1-16; Singh, et al. "Enhancement of survivability of mammalian cells by overexpression of the apoptosis suppressor gene bcl-2." *Biotechnol Bioeng.* 1996, 52: 166-175; Mastrangelo, et al. "Overexpression of bcl-2 family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults." *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, Vol 67, 555-564; Arden, et al. "Inhibiting the apoptosis pathway using MDM2 in mammalian cell cultures." *Biotechnology and Bioengineering*, 2007; Vol. 97, 601-614). Sin embargo, en algunos casos, el uso de aditivos de medios puede retrasar la progresión del ciclo celular, lo que resulta en una menor densidad celular y, por lo tanto, una menor productividad. Algunos aditivos de medios pueden proteger a las células de la apoptosis durante la fase de crecimiento, pero no son efectivas durante la fase de muerte. Además, la mayoría de los aditivos de medios son costosos, lo que puede no ser práctico para la fabricación farmacéutica a gran escala. Para la sobreexpresión de genes antiapoptosis, la transfección génica es un desafío y el efecto puede ser dependiente del caso. El documento WO2009/087087 describe que la adición de hierro al medio de cultivo celular puede mejorar la viabilidad celular, la densidad celular y la formación de productos celulares.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el cultivo celular para aumentar la viabilidad, la densidad y/o el título celular.

Sumario

35 La presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas abarca el descubrimiento inesperado de que la adición de hierro, en particular, de altas concentraciones de hierro al medio de cultivo celular, puede mejorar significativamente la densidad, la viabilidad y/o el título celulares del cultivo, entre otros beneficios. Por lo tanto, la presente invención proporciona una solución efectiva pero económica y fácil para mejorar el cultivo celular. La presente invención es particularmente útil para mejorar la viabilidad al final del cultivo celular extendido.

40 En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para aumentar la densidad, la viabilidad y/o el título celulares en un cultivo celular, incluidas las etapas de proporcionar células en un medio de cultivo celular para iniciar un procedimiento de cultivo celular (por ejemplo, un procedimiento de cultivo celular del producto), y añadiendo una composición que comprende hierro a dicho medio de cultivo celular durante el procedimiento de cultivo celular de tal manera que la concentración de hierro en el medio de cultivo celular aumente a lo largo del procedimiento de cultivo celular.

45 De acuerdo con la presente invención, la composición que comprende hierro puede seleccionarse de una variedad de compuestos que contienen hierro. En algunas realizaciones, la composición que contiene hierro se selecciona del grupo que consiste en FeSO₄, Fe-citrato, Fe-transferrina, Fe-cloruro, Fe-nitrato, Fe-EDTA, Fe(NO₃)₃, FeCl₂, FeCl₃ y combinaciones de los mismos.

50 En algunas realizaciones, los procedimientos de acuerdo con la presente divulgación incluyen la adición de una composición que comprende hierro en un intervalo de puntos de tiempo a lo largo del procedimiento de cultivo celular. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro después del día 0. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 1. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 3. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 6. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 9. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en múltiples puntos de tiempo durante el procedimiento de cultivo celular.

55 En algunas realizaciones, la concentración de hierro en el medio de cultivo celular (por ejemplo, después de una o más adiciones de una composición que comprende hierro) varía entre 100 µM y 5 mM. En algunas realizaciones, la concentración de hierro en el medio de cultivo celular varía entre 300 µM y 1 mM. En algunas realizaciones, la concentración de hierro en el medio de cultivo celular es 1 mM.

- Se puede usar una variedad de tipos de células de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células son células de mamífero. En algunas realizaciones, las células de mamífero se seleccionan de una línea de mieloma de ratón BALB/c, retinoblastos humanos (PER.C6), células de riñón de mono, línea de riñón embrionario humano (293), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO), células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma cervical humano (HeLa),
- 5 células de riñón canino, células de hígado de rata búfalo, células de pulmón humano, células de hígado humano, células de tumor mamario de ratón, células TRI, células MRC 5, células FS4 o una línea de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones, las células de mamífero son células CHO.
- En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular es un procedimiento de cultivo alimentado por lotes. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular es un procedimiento de cultivo de realimentación por lotes. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular es un procedimiento de cultivo por perfusión. En algunas realizaciones, el procedimiento de cultivo celular es un procedimiento de cultivo de producción a gran escala. En algunas realizaciones, el volumen del medio de cultivo celular es de al menos aproximadamente 500 L. En algunas realizaciones, el cultivo celular se lleva a cabo en matraces con agitación.
- 10 En algunas realizaciones, se agregan proteínas suplementarias para mejorar la densidad, viabilidad y/o título del cultivo celular. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular no contiene hidrolizados. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular contiene hidrolizados.
- En algunas realizaciones, las células portan un gen que codifica una proteína recombinante. En algunas realizaciones, la proteína recombinante es un anticuerpo o fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL-22. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-GDF8. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo Myo29. En alguna realización, el anticuerpo es un anticuerpo de dominio único. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único es un nanocuerpo anti-TNF. En algunas realizaciones, la proteína recombinante es una glicoproteína. En algunas realizaciones, la proteína recombinante es una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un anticuerpo, un factor de crecimiento, un factor de
- 20 coagulación, una citoquina, una proteína de fusión, una sustancia farmacéutica, una vacuna, una enzima o un Small Modular ImmunoPharmaceutical™ (SMIP). En algunas realizaciones, los procedimientos inventivos descritos en el presente documento comprenden además una etapa de purificación de la proteína recombinante.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una proteína recombinante producida a partir de las células cultivadas de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento.
- 30 En aun otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para prevenir o retrasar la muerte celular en un cultivo celular mediante la adición de una composición que comprende hierro en uno o más puntos de tiempo posteriores al comienzo del procedimiento de cultivo celular.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para inhibir la apoptosis en un cultivo celular mediante la adición de una composición que comprende hierro en uno o más puntos de tiempo posteriores al comienzo del procedimiento de cultivo celular.
- 35 En algunas realizaciones, la composición que comprende hierro se agrega después del día 0. En algunas realizaciones, la composición que comprende hierro se agrega en o después del día 3. En algunas realizaciones, la composición que comprende hierro se agrega en o después del día 6. En algunas realizaciones, la composición que comprende hierro se agrega el día 9 o después.
- 40 En algunas realizaciones, se agrega hierro en una cantidad para efectuar una concentración en el medio de cultivo celular que varía entre 100 μ M y 5 mM. En algunas realizaciones, se agrega hierro en una cantidad para efectuar una concentración en el medio de cultivo celular que varía entre 300 μ M y 1 mM. En algunas realizaciones, se agrega hierro en una cantidad para efectuar una concentración en el medio de cultivo celular de 1 mM.
- En algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo alimentado por lotes. En algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de realimentación por lotes. En algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de perfusión. En algunas realizaciones, el cultivo celular es un cultivo de producción a gran escala. En algunas realizaciones, el volumen del cultivo celular es de al menos aproximadamente 500 L. En algunas realizaciones, el cultivo celular se lleva a cabo en matraces con agitación.
- 45 En algunas realizaciones, la composición que comprende hierro se selecciona del grupo que consiste en FeSO₄, Fe-citrato, Fe-transferrina, Fe-cloruro, Fe-nitrato, Fe-EDTA, Fe(NO₃)₃, FeCl₂, FeCl₃ y combinaciones de los mismos.
- 50 En aun otro aspecto, la presente divulgación proporciona, entre otras cosas, kits para hacer un medio de cultivo celular que comprende uno o más reactivos para hacer un medio de cultivo celular inicial, y una composición separada que comprende hierro. En algunas realizaciones, el kit comprende una instrucción para agregar la composición separada que comprende hierro al medio de cultivo celular inicial en uno o más puntos de tiempo durante el curso de un procedimiento de cultivo celular, por ejemplo, para aumentar la densidad, la viabilidad y/o el título celulares.
- 55

En algunas realizaciones, la composición separada que comprende hierro está en una cantidad para efectuar una concentración de hierro que varía entre 100 μM y 5 mM en el medio de cultivo celular inicial. En algunas realizaciones, la composición separada está en una cantidad para efectuar una concentración de hierro que varía entre 100 μM y 5 mM en un cultivo celular de al menos 500 L.

- 5 En algunas realizaciones, la composición separada se selecciona del grupo que consiste en FeSO_4 , Fe-citrato, Fe-transferrina, Fe-cloruro, Fe-nitrato, Fe-EDTA, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeCl_2 , FeCl_3 y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el kit comprende además componentes suplementarios para un cultivo alimentado por lotes. En algunas realizaciones, el kit comprende además componentes suplementarios para un cultivo realimentado por lotes. En algunas realizaciones, el kit comprende además componentes suplementarios para un cultivo de perfusión. En algunas realizaciones, los componentes suplementarios se seleccionan del grupo que consiste en hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones inorgánicos, tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos, aminoácidos, lípidos, glucosa u otras fuentes de energía, y combinaciones de los mismos.

- 15 En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se inKDRue lo contrario. Como se usa en esta solicitud, el término "comprenden" y las variaciones del término, tales como "que comprende" y "comprende", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o etapas. Como se usa en el presente documento, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Todos los números utilizados en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente están destinados a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante. En ciertas realizaciones, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se inKDRue lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto donde dicho número excediera el 100 % de un valor posible).

- 25 Otras características, objetivos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones que siguen. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones, aunque indican realizaciones de la presente invención, se proporcionan solo a modo de ilustración, no de limitación.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos son solo para fines ilustrativos, no limitativos.

- 30 *Figura 1.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de diferentes dosis de adición de hierro después del día 3 sobre el crecimiento celular de células CHO en matraces con agitación. El crecimiento celular se mide en términos de densidad celular viable (VCD)(el número total de células viables $\times 10^6$ células/ml) en un punto de tiempo dado.

Figura 2. Datos de ejemplo que demuestran el efecto de diferentes dosis de adición de hierro después del día 3 sobre la viabilidad celular CHO en matraces con agitación. La viabilidad se mide como un porcentaje de (células viables)/(células totales) en cultivo en un punto de tiempo dado.

- 35 *Figura 3.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de diferentes dosis de adición de hierro después del día 3 sobre la viabilidad en el día 16 de células CHO en matraces con agitación. La viabilidad se mide como un porcentaje de (células viables)/(células totales) en cultivo en un punto de tiempo dado.

- 40 *Figura 4.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de diferentes dosis de adición de hierro después del día 3 sobre el título de anticuerpos en el día 16 de células CHO en matraces con agitación. El título de anticuerpos se mide en gramos de anticuerpo/litro de medio de cultivo. El cambio del título de anticuerpos se mide como una relación de $[\text{anticuerpo}]_{\text{con hierro}}/[\text{anticuerpo}]_{\text{sin hierro}}$ en un punto de tiempo dado.

- 45 *Figura 5.* Datos de ejemplo que demuestran la mejora de la densidad, la viabilidad y el título celulares en el día 14 con respecto al control tras la adición de 1 mM de hierro al procedimiento de cultivo de la Línea Celular 2. La densidad celular se mide como el número total de células viables $\times 10^6$ células/ml en un punto de tiempo dado. La mejora de la densidad celular se representa como una relación de densidad celular_{con hierro}/densidad celular_{sin hierro}. La viabilidad se mide como un porcentaje de (células viables)/(células totales) en cultivo en un punto de tiempo dado. La mejora de la viabilidad se mide como una relación de % de viabilidad_{con hierro} / % de viabilidad_{sin hierro}. El título de anticuerpos se mide en gramos de anticuerpo/litro de medio de cultivo. El cambio del título de anticuerpos se mide como una relación de $[\text{anticuerpo}]_{\text{con hierro}}/[\text{anticuerpo}]_{\text{sin hierro}}$ en un punto de tiempo dado.

- 50 *Figura 6.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO_4 o Fe-citrato (600 μM) después del día 3 sobre la viabilidad en el día 14 y la densidad celular viable del cultivo por lotes de alimentación de la Línea Celular 1 en matraces con agitación. La densidad celular viable se mide como el número total de células viables $\times 10^6$ células/ml en un punto de tiempo dado. La mejora de la densidad celular viable se representa como una relación de densidad celular_{con hierro}/densidad celular_{sin hierro}.

Figura 7. Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ (1 mM) en el día 6 sobre la viabilidad celular de las células CHO que producen un nanocuerpo cultivado en cultivo alimentado en matraces con agitación.

Figura 8. Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ (1 mM) en el día 6 sobre el título de células CHO que producen un nanocuerpo cultivado en cultivo alimentado en matraces con agitación.

5 *Figura 9.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ (1 mM) en el día 6 sobre la productividad general de las células CHO que producen un nanocuerpo cultivado en cultivo alimentado en matraces con agitación.

10 *Figura 10.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ (1 mM) en el día 6 sobre la producción de lactato por las células CHO que producen un nanocuerpo cultivado en cultivo alimentado en matraces con agitación.

Figura 11. Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ o Fe-citrato (600 μM) sobre la densidad celular del cultivo alimentado por clones 2.8 en matraces con agitación.

Figura 12. Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ o Fe-citrato (600 μM) sobre la viabilidad del cultivo de alimentación por clones 2.8 en matraces con agitación.

15 *Figura 13.* Datos de ejemplo que demuestran el efecto de la adición de FeSO₄ o Fe-citrato (600 μM) sobre la productividad general del cultivo de alimentación por clones 2.8 en matraces con agitación.

Figura 14. Datos de ejemplo que demuestran el efecto de dosis variables de la adición de hierro del día 0 sobre la viabilidad en el día 3 de la Línea Celular 1 en matraces con agitación. La viabilidad se mide como un porcentaje de (células viables)/(células totales) en cultivo en un punto de tiempo dado.

20 Descripción detallada

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona, entre otras cosas, procedimientos y composiciones para aumentar la densidad, la viabilidad y/o el título celulares del producto mediante la adición de una composición que comprende hierro en uno o más puntos de tiempo en el transcurso del procedimiento de cultivo celular. La presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas abarca el sorprendente hallazgo de que la adición de hierro a un cultivo celular puede retrasar y/o prevenir la muerte celular al final de un cultivo celular. En algunas realizaciones, la adición de hierro a un cultivo celular puede inhibir la apoptosis en el cultivo celular.

El hierro es un componente importante del medio de cultivo celular para el crecimiento de células de mamíferos. Sin embargo, antes de la presente divulgación, se cree que los niveles bajos de hierro pueden inhibir el crecimiento celular al agotarse el hierro, mientras que los niveles altos de hierro pueden inhibir el crecimiento celular debido a la toxicidad (por ejemplo, estrés oxidativo y formación de radicales libres). Por lo tanto, se pensó que un equilibrio entre las cualidades beneficiosas y tóxicas del hierro es importante para el cultivo celular de mamíferos. Antes de la presente invención, las formulaciones de medios convencionales usan bajas concentraciones de hierro para soportar suficientemente el crecimiento celular mientras permanecen por debajo de los niveles de concentración tóxica de hierro. Como se describe en la sección de Ejemplos, los inventores de la presente invención han descubierto inesperadamente que la adición de hierro a un cultivo celular, incluido el hierro a concentraciones que se considerarían altas, conduce a un crecimiento celular mejorado y a la muerte celular retardada del cultivo celular, lo que resulta en aumentó significativamente la densidad, la viabilidad y el título celulares, entre otros beneficios. Tal efecto es independiente de la línea celular, escala, producto y fuente de Fe. Además, la calidad del producto no se vio afectada por la alta concentración de Fe. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona una metodología nueva y rentable para mejorar el cultivo celular.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. Son las reivindicaciones las que definen el alcance de la presente invención, que no está y no debería estar limitada por esta descripción de ciertas realizaciones.

Composiciones de Hierro

Se puede usar una amplia variedad de composiciones que contienen hierro de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, una composición que comprende hierro se selecciona del grupo que comprende FeSO₄, Fe-citrato, Fe-transferrina, Fe-cloruro, Fe-nitrato, Fe-EDTA, Fe(NO₃)₃, FeCl₂, FeCl₃ y combinaciones de los mismos.

50 Se puede usar una variedad de concentraciones de hierro de acuerdo con la presente invención. Típicamente, el hierro se proporciona en el medio a una concentración mayor que la de una "concentración traza". El término "concentración traza", como se usa en el presente documento, se refiere a una concentración que puede ser inferior a un nivel medido ordinaria o fácilmente. Por ejemplo, el nivel traza de un compuesto puede ser <10⁻⁵, <10⁻⁶, <10⁻⁷ o <10⁻⁸ M. En ciertas realizaciones, se proporciona hierro en el medio a una concentración de entre aproximadamente 100 μM y 5 mM (por

- ejemplo, aproximadamente 100 μM -4,5 mM, 100 μM -3,0 mM, 100 μM -2,5 mM, 100 μM -1,0 mM, 100 μM -1,0 mM, 200 μM -2,0 mM, 200 μM -1,5 mM, 200 μM -1,0 mM, 150 μM -4,5 mM, 150 μM -3,5 mM, 150 μM -2,5 mM, 150 μM -1,5 mM, 150 μM -1,0 mM, 200 μM -1,5 mM, 200 μM -1,0 mM, 200 μM -2,5 mM, 300 μM -2,5 mM, 300 μM -1,5 mM, 300 μM -2,0 mM). En ciertas realizaciones, se proporciona hierro en el medio a una concentración de aproximadamente 100 μM , 150 μM , 200 μM , 250 μM , 300 μM , 350 μM , 400 μM , 450 μM , 500 μM , 550 μM , 600 μM , 650 μM , 700 μM , 750 μM , 800 μM , 850 μM , 900 μM , 950 μM , 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, o 5 mM, o en cualquier intervalo dentro de estas concentraciones. En ciertas realizaciones, se proporciona hierro en el medio a una concentración de entre aproximadamente 300 μM y 1 mM. En algunas realizaciones, la concentración de hierro en un medio de cultivo celular aumenta a lo largo del procedimiento de cultivo celular.
- 10 La presente divulgación también abarca el hallazgo de que una composición que comprende hierro puede proporcionarse en el medio en cualquier punto durante el procedimiento de cultivo celular. Se puede agregar una composición que comprende hierro para efectuar la concentración de hierro deseada en el medio de cultivo agregando la composición en uno o múltiples puntos durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 0 del procedimiento de cultivo celular. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro después del día 0. En ciertas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, de un procedimiento de cultivo celular (por ejemplo, un procedimiento de producción de cultivo celular) o en cualquier combinación de los puntos de tiempo anteriores. En algunas realizaciones, se agrega una composición que comprende hierro en o después del día 3.
- 20 Un experto habitual en la materia podrá elegir la concentración exacta de hierro y el tiempo de adición dentro de estos intervalos en función de los atributos particulares de su diseño experimental, incluido el carácter de las células por cultivar, el carácter de cualquier producto (por ejemplo, anticuerpo o proteína recombinante) producido por las células en cultivo, la presencia o ausencia de otros componentes en el medio en el que crecen las células y las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, las células cultivadas en cultivo estático pueden utilizar hierro de manera más o menos óptima en comparación con las células cultivadas en cultivo agitado (Véase, por ejemplo, WO 94/02592).

Medios de cultivo celular

- Los términos "medio", "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo" tal como se usan en el presente documento se refieren a una solución que contiene nutrientes que nutren las células de mamíferos en crecimiento. Típicamente, tales soluciones proporcionan aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, fuentes de energía, lípidos y oligoelementos requeridos por la célula para un crecimiento y/o supervivencia mínimos. Dicha solución también puede contener componentes suplementarios que mejoran el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, incluidas, entre otras, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales muy bajas), compuestos inorgánicos presentes en altas concentraciones finales (por ejemplo, hierro), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas realizaciones, un medio se formula ventajosamente a un pH y concentración de sal óptimos para la supervivencia y proliferación celular. En ciertas realizaciones, un medio es un medio de alimentación que se agrega después del comienzo del cultivo celular.
- 30 Se puede usar una amplia variedad de medios de crecimiento para mamíferos de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, las células pueden crecer en uno de una variedad de medios químicamente definidos, en el que los componentes de los medios son conocidos y controlados. En ciertas realizaciones, las células pueden crecer en un medio complejo, en el que no todos los componentes del medio son conocidos y/o controlados.
- 40 Los medios de crecimiento definidos químicamente para el cultivo celular de mamíferos se han desarrollado y publicado ampliamente en las últimas décadas. Todos los componentes de los medios definidos están bien caracterizados, por lo que los medios definidos no contienen aditivos complejos como suero o hidrolizados. Las primeras formulaciones de medios se desarrollaron para permitir el crecimiento celular y el mantenimiento de la viabilidad con poca o ninguna preocupación por la producción de proteínas. Más recientemente, se han desarrollado formulaciones de medios con el propósito expreso de apoyar cultivos celulares altamente productivos que produzcan proteínas recombinantes.
- 45 No todos los componentes de los medios complejos están bien caracterizados, por lo que los medios complejos pueden contener aditivos tales como fuentes de carbono simples y/o complejas, fuentes de nitrógeno simples y/o complejas, y suero, entre otras cosas. En algunas realizaciones, los medios complejos adecuados para la presente invención contienen aditivos tales como hidrolizados además de otros componentes del medio definido como se describe aquí.
- 50 En algunas realizaciones, los medios definidos incluyen típicamente aproximadamente cincuenta entidades químicas a concentraciones conocidas en agua. La mayoría de ellos también contienen una o más proteínas bien caracterizadas, como insulina, IGF-1, transferrina o BSA, pero otras no requieren componentes de proteínas y, por lo tanto, se denominan medios definidos libres de proteínas. Los componentes químicos típicos de los medios se dividen

en cinco amplias categorías: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, oligoelementos y una categoría miscelánea que desafía la categorización ordenada.

5 El medio de cultivo celular puede complementarse opcionalmente con componentes suplementarios. El término "componentes suplementarios" como se usa en el presente documento se refiere a componentes que mejoran el crecimiento y/o la supervivencia por encima de la tasa mínima, que incluyen, pero no se limitan a, hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones particulares (tales como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos (compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales muy bajas), aminoácidos, lípidos y/o glucosa u otra fuente de energía. En ciertas realizaciones, se pueden agregar componentes suplementarios al cultivo celular inicial. En ciertas realizaciones, se pueden agregar componentes suplementarios después del comienzo del cultivo celular.

10 Típicamente, los elementos traza se refieren a una variedad de sales inorgánicas incluidas a niveles micromolar o inferiores. Por ejemplo, los oligoelementos comúnmente incluidos son zinc, selenio, cobre y otros. En algunas realizaciones, el hierro (sales ferrosas o férricas) puede incluirse como un elemento traza en el medio de cultivo celular inicial a concentraciones micromolares. Como se discutió anteriormente, la presente invención proporciona procedimientos que incluyen la adición de hierro además de la cantidad traza de hierro presente en el medio de cultivo celular inicial de modo que las concentraciones de hierro en el medio de cultivo celular sean mayores que la cantidad traza (por ejemplo, mayor que 100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM , 500 μM , 600 μM , 700 μM , 800 μM , 900 μM o 1 mM). El manganeso también se incluye con frecuencia entre los oligoelementos como un catión divalente (MnCl_2 o MnSO_4) en un intervalo de concentraciones nanomolares a micromolares. Numerosos oligoelementos menos comunes generalmente se agregan a concentraciones nanomolares.

Células

Se puede utilizar cualquier célula huésped susceptible de cultivo celular de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, una célula huésped es mamífero. Ejemplos no limitantes de células de mamífero que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/I, ECACC No: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6, CruCell, Leiden, Países Bajos); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59,1977); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovario de hámster chino+/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

35 Además, se puede utilizar cualquier número de líneas celulares de hibridoma disponibles comercialmente y no comercialmente de acuerdo con la presente invención. El término "hibridoma", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula o progenie de una célula resultante de la fusión de una célula inmortalizada y una célula productora de anticuerpos. Tal hibridoma resultante es una célula inmortalizada que produce anticuerpos. Las células individuales utilizadas para crear el hibridoma pueden ser de cualquier fuente de mamíferos, incluidos, entre otros, ratas, cerdos, conejos, ovejas, cerdos, cabras y humanos. En ciertas realizaciones, un hibridoma es una línea celular de trioma, que se produce cuando la progenie de fusiones de mieloma heterohíbrido, que son el producto de una fusión entre células humanas y una línea celular de mieloma murino, se fusionan posteriormente con una célula plasmática. En ciertas realizaciones, un hibridoma es cualquier línea celular híbrida inmortalizada que produce anticuerpos tales como, por ejemplo, cuadromas (Véase, por ejemplo, Milstein et al., Nature, 537: 3053, 1983). Un experto en la materia apreciará que las líneas celulares de hibridoma pueden tener diferentes requisitos nutricionales y/o pueden requerir diferentes condiciones de cultivo para un crecimiento óptimo, y podrá modificar las condiciones según sea necesario.

Procedimientos de cultivo celular

50 Los términos "cultivo" y "cultivo celular" tal como se usan en el presente documento se refieren a una población celular que se suspende en un medio en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o el crecimiento de la población celular. Como quedará claro para los expertos en la materia, en ciertas realizaciones, estos términos tal como se usan en el presente documento se refieren a la combinación que comprende la población celular y el medio en el que se suspende la población. En ciertas realizaciones, las células del cultivo celular comprenden células de mamífero.

55 La presente invención puede usarse con cualquier procedimiento de cultivo celular que sea susceptible al procedimiento deseado (por ejemplo, producción de una proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo)). Como un ejemplo no limitante, las células pueden crecer en cultivos discontinuos o alimentados, donde el cultivo se termina después de una expresión suficiente de la proteína recombinante (por ejemplo, anticuerpo), después de lo cual se recolecta la proteína expresada (por ejemplo, anticuerpo). Alternativamente, como otro ejemplo no limitante, las células se pueden cultivar en cultivos de realimentación o perfusión por lotes, donde el cultivo no se termina y nuevos

nutrientes y otros componentes se agregan periódicamente o continuamente al cultivo, durante el cual la proteína recombinante expresada (por ejemplo, anticuerpo) se recolecta periódica o continuamente. Otros procedimientos adecuados (por ejemplo, cultivos en tubos de rotación) son conocidos en la técnica y pueden usarse para practicar la presente invención.

5 En ciertas realizaciones, un cultivo celular adecuado para la presente invención es un cultivo alimentado por lotes. El término "cultivo alimentado por lotes", como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento de cultivo celular en el que se proporcionan componentes adicionales al cultivo en un momento o momentos posteriores al comienzo del procedimiento de cultivo. Tales componentes proporcionados comprenden típicamente componentes nutricionales para las células que se han agotado durante el procedimiento de cultivo. Adicionalmente o
10 alternativamente, dichos componentes adicionales pueden incluir componentes suplementarios, como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, se proporcionan componentes adicionales en un medio de alimentación, como se describe en el presente documento. Un cultivo alimentado por lotes se detiene típicamente en algún punto y las células y/o componentes en el medio se recolectan y opcionalmente se purifican.

15 En ciertas realizaciones, un cultivo celular adecuado para la presente invención es un cultivo de realimentación por lotes. El término "cultivo de realimentación por lotes", como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento de cultivo celular en el que una porción de las células (por ejemplo, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o más de las células) se eliminan del cultivo celular después de la inoculación y el crecimiento durante un período de tiempo
20 particular (por ejemplo, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, etc.). Típicamente, el medio que contiene células que se elimina de los cultivos de realimentación por lotes se reemplaza con un volumen equivalente de medio fresco. En ciertas realizaciones, se proporcionan componentes adicionales en un medio de realimentación, como se describe en el presente documento. Un cultivo de realimentación por lotes generalmente es un procedimiento continuo que implica la expansión y el mantenimiento de cultivos celulares dentro del recipiente de cultivo (por ejemplo, biorreactor).
25

En ciertas realizaciones, un cultivo celular adecuado para la presente invención es un cultivo de perfusión. Típicamente, el cultivo de perfusión implica el mantenimiento de un medio de cultivo celular de volumen de trabajo mediante la introducción continua de medio de cultivo fresco y la eliminación del medio gastado mediante el uso de un sistema de retención celular. En algunas realizaciones, las células pueden retenerse en cultivo usando cualquier
30 procedimiento disponible, por ejemplo, filtración, sedimentación, centrifugación y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los cultivos de perfusión se pueden cultivar durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más).

Las células pueden crecer en cualquier volumen conveniente elegido por el profesional. Por ejemplo, las células pueden crecer en recipientes de reacción a pequeña escala que varían en volumen desde unos pocos mililitros hasta
35 varios litros. Alternativamente, las células se pueden cultivar en biorreactores comerciales a gran escala que varían en volumen de aproximadamente al menos 1 litro a 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 litros o más, o cualquier volumen intermedio.

La temperatura de un cultivo celular se seleccionará basándose principalmente en el intervalo de temperaturas a las
40 cuales el cultivo celular permanece viable y el intervalo en el que se produce un alto nivel del producto deseado (por ejemplo, una proteína o anticuerpo recombinante). Por ejemplo, la Línea Celular 1 crece bien y puede producir anticuerpos de alto título a aproximadamente 37°C. En general, la mayoría de las células de mamíferos crecen bien y pueden producir los productos deseados (por ejemplo, proteínas o anticuerpos recombinantes) dentro de un intervalo de aproximadamente 25°C a 42°C, aunque los procedimientos enseñados por la presente divulgación no se limitan a estas temperaturas. Ciertas células de mamíferos crecen bien y pueden producir los productos deseados (por ejemplo,
45 proteínas o anticuerpos recombinantes) dentro del intervalo de aproximadamente 35°C a 40°C. En ciertas realizaciones, se cultiva un cultivo celular a una temperatura de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45°C en una o más veces durante el procedimiento de cultivo celular. Los expertos en la materia podrán seleccionar la temperatura o temperaturas apropiadas para cultivar células, dependiendo de las necesidades particulares de las células y los requisitos de producción particulares del profesional.
50 Las células se pueden cultivar por cualquier cantidad de tiempo, dependiendo de las necesidades del profesional y el requisito de las células mismas.

Un cultivo puede estar sujeto a uno o más cambios de temperatura durante el curso del cultivo. Al cambiar la temperatura de una cultura, el cambio de temperatura puede ser relativamente gradual. Por ejemplo, puede llevar
55 varias horas o días completar el cambio de temperatura. Alternativamente, el cambio de temperatura puede ser relativamente brusco. La temperatura puede aumentarse o disminuirse constantemente durante el procedimiento de cultivo. Alternativamente, la temperatura puede aumentarse o disminuirse en cantidades discretas en varios momentos durante el procedimiento de cultivo. La(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura subsiguientes pueden ser más bajos o más altos que la(s) temperatura(s) o intervalo(s) de temperatura inicial o anterior. Un experto en la materia comprenderá que en esta realización se incluyen múltiples cambios de temperatura discretos. Por ejemplo, la
60 temperatura se puede cambiar una vez (ya sea a una temperatura o intervalo de temperatura más alto o más bajo), las células se mantienen a esta temperatura o intervalo de temperatura durante un cierto período de tiempo, después

de lo cual la temperatura se puede cambiar nuevamente a una nueva temperatura o intervalo de temperatura, que puede ser mayor o menor que la temperatura o intervalo de temperatura de la temperatura o intervalo de temperatura anterior. La temperatura del cultivo después de cada cambio discreto puede ser constante o puede mantenerse dentro de un cierto intervalo de temperaturas.

- 5 En ciertas realizaciones, se determinan la densidad, la viabilidad y/o el título celulares del cultivo celular. El término "densidad celular" como se usa en el presente documento se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio. El término "viabilidad celular" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de las células en cultivo para sobrevivir bajo un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término como se usa en el presente documento también se refiere a la porción de células que están vivas en un momento particular en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento. Los expertos en la materia apreciarán que uno de los muchos procedimientos para determinar la viabilidad celular se incluye en esta invención. Por ejemplo, uno puede usar un tinte (por ejemplo, azul de tripano) que no pasa a través de la membrana de una célula viva, pero puede pasar a través de la membrana alterada de una célula muerta o moribunda para determinar la viabilidad celular. La viabilidad celular de los cultivos sometidos a diversas condiciones de cultivo (por ejemplo, concentraciones de hierro o duración del cultivo) puede determinarse y compararse entre sí para determinar las condiciones óptimas de crecimiento para dichos cultivos. El término "título", como se usa en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a la cantidad total de proteína o anticuerpo expresada producida por vía recombinante por un cultivo celular de mamífero en una cantidad dada de volumen medio. El título se expresa típicamente en unidades de miligramos de proteína, por ejemplo, anticuerpo, por mililitro de medio.
- 10
- 15
- 20 En ciertas realizaciones, las reacciones por lotes y alimentadas por lotes se terminan una vez que se alcanza la densidad celular, la viabilidad y/o el título deseados, según lo determinado por las necesidades del profesional. Como ejemplo no limitativo, el cultivo puede terminarse una vez que las células alcanzan 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 por ciento de la densidad celular viable máxima. Además o alternativamente, las reacciones por lotes y alimentadas por lotes pueden terminarse antes de la acumulación excesiva de productos de desecho metabólico como lactato y amonio. En algunas realizaciones, las reacciones por lotes y alimentadas por lotes pueden terminarse una vez que la acumulación de productos de desecho (por ejemplo, lactato y/o amonio) alcanza 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más g/L de medio de cultivo.
- 25

En ciertos casos, puede ser beneficioso complementar un cultivo celular durante la fase de producción posterior con nutrientes u otros componentes del medio que hayan sido agotados o metabolizados por las células. Como ejemplos no limitantes, puede ser beneficioso complementar un cultivo celular con hormonas y/u otros factores de crecimiento, iones inorgánicos (como, por ejemplo, sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato), tampones, vitaminas, nucleósidos o nucleótidos, oligoelementos, compuestos inorgánicos a niveles superiores a la concentración traza (por ejemplo, hierro), aminoácidos, lípidos o glucosa u otra fuente de energía. Dichos componentes suplementarios pueden agregarse todos al cultivo celular al mismo tiempo, o pueden proporcionarse al cultivo celular en una serie de adiciones.

- 30 Un experto en la materia podrá adaptar condiciones específicas de cultivo celular para optimizar ciertas características del cultivo celular, que incluyen, entre otras, la tasa de crecimiento, la viabilidad celular, la densidad celular final del cultivo celular, la concentración final de metabolismo perjudicial subproductos como lactato y amonio, título final del producto deseado (por ejemplo, proteína o anticuerpo recombinante), o cualquier combinación de estas u otras condiciones consideradas importantes por el profesional.

40 **Expresión de proteínas**

Como se señaló anteriormente, en muchos casos las células se seleccionarán o diseñarán para producir altos niveles de productos deseados (por ejemplo, proteína o anticuerpo recombinante). A menudo, las células serán manipuladas por la mano del hombre para producir altos niveles de proteína recombinante, por ejemplo, mediante la introducción de un gen que codifica la proteína de interés y/o mediante la introducción de elementos de control genético que regulan la expresión de ese gen (ya sea endógeno o introducido).

- 45 Ciertas proteínas pueden tener efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular, la viabilidad celular o alguna otra característica de las células que en última instancia limita la producción de la proteína de interés de alguna manera. Incluso entre una población de células de un tipo particular diseñado para expresar una proteína específica, existe variabilidad dentro de la población celular de tal manera que ciertas células individuales crecerán mejor, producirán más proteínas de interés o producirán una proteína con niveles de actividad más altos (por ejemplo, actividad enzimática). En ciertas realizaciones, el practicante selecciona empíricamente una línea celular para un crecimiento robusto en las condiciones particulares elegidas para cultivar las células. En algunas realizaciones, las células individuales diseñadas para expresar una proteína particular se eligen para la producción a gran escala en función del crecimiento celular, la densidad celular final, el porcentaje de viabilidad celular, el título de la proteína expresada o cualquier combinación de estas u otras condiciones consideradas importantes por el facultativo.
- 50
- 55

Cualquier proteína que sea expresable en una célula huésped puede producirse de acuerdo con las presentes enseñanzas. El término "célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que se manipula de acuerdo con la presente invención para producir una proteína de interés como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, una célula huésped es una célula de mamífero. Una proteína puede expresarse

a partir de un gen que es endógeno a la célula huésped, o de un gen heterólogo que se introduce en la célula huésped. Una proteína puede ser una que ocurre en la naturaleza, o alternativamente puede tener una secuencia que fue diseñada o seleccionada por la mano del hombre.

5 Las proteínas que pueden expresarse deseablemente de acuerdo con la presente invención a menudo se seleccionarán con base en una actividad biológica o química interesante o útil. Por ejemplo, la presente invención puede emplearse para expresar cualquier enzima, receptor, anticuerpo, hormona, factor regulador, antígeno, agente de unión farmacéuticamente o comercialmente relevante, etc. En algunas realizaciones, la proteína expresada por las células en cultivo se selecciona de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, nanocuerpos, anticuerpos de dominio único, glicoproteínas, proteínas terapéuticas, factores de crecimiento, factores de coagulación, citoquinas, proteínas de fusión, sustancias farmacéuticas, vacunas, enzimas, o Small Modular ImmunoPharmaceuticals™ (IMMP). La lista de proteínas que se pueden producir de acuerdo con la presente invención tiene simplemente naturaleza de ejemplo, y no pretende ser una citación limitante. Un experto en la materia comprenderá que cualquier proteína puede expresarse de acuerdo con la presente invención y podrá seleccionar la proteína particular que se producirá en función de sus necesidades particulares.

15 **Anticuerpos**

Dado el gran número de anticuerpos actualmente en uso o bajo investigación como agentes farmacéuticos u otros agentes comerciales, la producción de anticuerpos es de particular interés de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Cualquier anticuerpo que pueda expresarse en una célula huésped puede producirse de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el anticuerpo por expresar es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico contiene fragmentos de aminoácidos que se derivan de más de un organismo. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se han descrito una variedad de metodologías para fabricar anticuerpos quiméricos. Véase, *por ejemplo*, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851 (1985); Takeda et al., Nature 314, 452 (1985), Cabilly et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Boss et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397; Tanaguchi et al., Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano derivado, por ejemplo, mediante el uso de bibliotecas de presentación de ribosomas o de presentación de fagos (*véase, por ejemplo*, Winter et al., Patente de los Estados Unidos No. 6,291,159 and Kawasaki, Patente de los Estados Unidos No. 5,658,754) o el uso de especies xenogénicas en las que los genes de anticuerpos nativos se inactivan y reemplazan funcionalmente con genes de anticuerpos humanos, mientras se dejan intactos los otros componentes del sistema inmune nativo (*véase, por ejemplo*, Kucherlapati et al., Patente de los Estados Unidos No. 6,657,103).

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico en el que la gran mayoría de los residuos de aminoácidos se derivan de anticuerpos humanos, minimizando así cualquier reacción inmune potencial cuando se administra a un sujeto humano. En los anticuerpos humanizados, los residuos de aminoácidos en las regiones determinantes de la complementariedad se reemplazan, al menos en parte, con residuos de una especie no humana que confieren una especificidad o afinidad de antígeno deseada. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden prepararse mediante cualquiera de varias técnicas conocidas en la técnica (*por ejemplo*, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)), y se hacen preferiblemente de acuerdo con las enseñanzas de la publicación PCT WO92/06193 o EP 0239400). Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos comercialmente, por ejemplo, Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britain. Para mayor referencia, véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos o humanizados descritos anteriormente pueden contener residuos de aminoácidos que no se producen naturalmente en ningún anticuerpo de ninguna especie en la naturaleza. Estos residuos extraños se pueden utilizar, por ejemplo, para conferir especificidad, afinidad o función efectora nuevas o modificadas al anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado. En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos anteriormente pueden conjugarse con fármacos para farmacoterapia sistémica, tales como toxinas, fármacos citotóxicos de bajo peso molecular, modificadores de respuesta biológica y radionúclidos (*véase, por ejemplo*, Kunz et al., Calicheamicin derivative-carrier conjugates, US20040082764 A1).

En algunas realizaciones, la presente invención se usa para producir un anticuerpo que se une específicamente al fragmento A β de la proteína precursora amiloide o a otros componentes de una placa amiloide, y es útil para combatir la acumulación de placas amiloides en el cerebro que caracterizan la enfermedad de Alzheimer. (*Véase, por ejemplo*, US Provisional Application 60/636,684. En algunas realizaciones, la presente invención se usa para producir un anticuerpo que se une específicamente al receptor HER2/neu. En algunas realizaciones, la presente invención se usa

para producir un anticuerpo anti-CD20. En algunas realizaciones, la presente invención se usa para producir anticuerpos contra TNF α , CD52, CD25, VEGF, EGFR, CD11a, CD33, CD3, IL-22, integrina alfa-4 y/o IgE.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención están dirigidos contra antígenos de la superficie celular expresados en células y/o tejidos diana en trastornos proliferativos tales como el cáncer. En una realización, el

5 anticuerpo es un anticuerpo IgG1 anti-Lewis Y. Lewis Y es un antígeno de carbohidrato con la estructura Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3] GlcNac β 1 \rightarrow 3R (Abe et al. (1983) J. Biol. Chem., 258 11793-11797). El antígeno Lewis Y se expresa en la superficie del 60 % al 90 % de los tumores epiteliales humanos (incluidos los de mama, colon, pulmón y próstata), de los cuales al menos el 40 % sobreexpresa este antígeno y tiene una expresión limitada en los tejidos normales.

10 Para apuntar a Ley y efectivamente apuntar a un tumor, idealmente se requiere un anticuerpo con especificidad exclusiva para el antígeno. Por lo tanto, preferiblemente, los anticuerpos anti-Lewis Y de la presente invención no reaccionan de forma cruzada con las estructuras de tipo 1 (es decir, la serie lacto de grupos sanguíneos (Lea y Leb)) y, preferiblemente, no se unen a otros epítomos tipo 2 (es decir, estructura neolacto) como estructuras Lex y H-tipo 2. Un ejemplo de un anticuerpo anti-Lewis Y preferido se designa hu3S193 (véanse las Patentes Estadounidenses
15 Números 6,310, 185; 6,518,415; 5,874,060). El anticuerpo humanizado hu3S193 (Attia, MA, et al. 1787-1800) se generó mediante injerto de CDR de 3S193, que es un anticuerpo monoclonal murino producido contra células de adenocarcinoma con especificidad excepcional por Ley (Kitamura, K., 12957-12961). Hu3S193 no solo conserva la especificidad de 3S193 para Ley, sino que también ha adquirido la capacidad de mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento (en lo sucesivo denominada CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en lo
20 sucesivo denominada ADCC) (Attia, MA, et al. 1787 -1800). Este anticuerpo se dirige a los xenoinjertos que expresan Ley en ratones desnudos, como lo demuestran los estudios de biodistribución con hu3S193 marcado con 125I, 111In o 18F, así como otros radiomarcadores que requieren un agente quelante, como 111In, 99mTc o 90Y (Clark, et al. 4804-4811).

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo es uno de los anticuerpos anti-GDF-8 humanos denominados Myo29, Myo28 y Myo22, y los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno derivados de los mismos. Estos anticuerpos son capaces de unirse a GDF-8 maduro con alta afinidad, inhibir la actividad de GDF-8 *in vitro* e *in vivo* como se demuestra, por ejemplo, mediante la inhibición de la unión a ActRIIB y los ensayos de genes informadores, y pueden inhibir la actividad de GDF-8 asociada con resultados negativos regulación de la masa muscular esquelética y la densidad ósea. Véase, *por ejemplo*, Veldman, et al, Patente de los Estados Unidos Application No. 20040142382.

30 **Receptores**

Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluyen receptores. Los receptores son típicamente glicoproteínas transmembrana que funcionan al reconocer un ligando de señalización extracelular. Los receptores típicamente tienen un dominio de proteína quinasa además del dominio de reconocimiento de ligando, que inicia una ruta de señalización al fosforilar las moléculas intracelulares diana al unirse
35 al ligando, lo que conduce a cambios en el desarrollo o metabólicos dentro de la célula. En una realización, los receptores de interés se modifican para eliminar los dominios transmembrana y/o intracelular, en lugar de los cuales opcionalmente se puede unir un dominio Ig. En una realización preferida, los receptores que se producirán de acuerdo con la presente invención son receptores tirosina quinasas (RTK). La familia RTK incluye receptores que son cruciales para una variedad de funciones de numerosos tipos de células (véase, por ejemplo, Yarden and Ullrich, Ann. Rev. Biochem. 57:433-478, 1988; Ullrich and Schlessinger, Cell 61:243-254, 199). Ejemplos no limitantes de RTK incluyen miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tirosina quinasa con inmunoglobulina y los dominios de homología EGF dominios-1 (TIE-1) y TIE-2 (Sato et al., Nature 376(6535):70-74 (1995) y el receptor c-Met, algunos de los cuales se han sugerido para promover la angiogénesis,
40 directa o indirectamente (Mustonen y Alitalo, J. Cell Biol. 129: 895-898, 1995) Otros ejemplos no limitantes de RTK incluyen la quinasa hepática fetal 1 (FLK-1) (a veces denominada receptor que contiene el dominio de inserción de quinasa (KDR) (Terman et al., Oncogene 6:1677-83, 1991) o receptor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares 2 (VEGFR-2)), tirosina quinasa-1 similar a fms (Flt-1) (DeVries et al. Science 255:989-991, 1992; Shibuya et al., Oncogene 5:519-524, 1990), a veces denominado receptor del factor de crecimiento de células endoteliales
45 vasculares 1 (VEGFR-1), neuropilina-1, endogлина, endosialina, y Axl. Los expertos en la materia conocerán otros receptores que se pueden expresar preferiblemente de acuerdo con la presente invención.

50 En algunas realizaciones, los inhibidores del factor de necrosis tumoral, en forma de receptores alfa y beta del factor de necrosis tumoral (TNFR-1; EP 417,563 publicada el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, EP 417,014 publicada el 20 de marzo de 1991) se expresan de acuerdo con la presente invención (para revisión, véase Naismith and Sprang, J Inflamm. 47(1-2):1-7 (1995-96). De acuerdo con una realización, el inhibidor del factor de necrosis tumoral comprende un receptor de TNF soluble y preferiblemente un TNFR-Ig. En algunas realizaciones, los inhibidores de TNF preferidos de la presente invención son formas solubles de TNFRI y TNFRII, así como proteínas de unión a TNF solubles, en otra realización, la fusión de TNFR-Ig es un TNFR: Fc, un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a "*etanercept*", que es un dímero de dos moléculas de la porción extracelular del receptor p75 TNF- α , cada
60 molécula que consiste en una porción Fc de 235 aminoácidos de IgG1 $^{\circ}$ humana.]

Factores de crecimiento y otras moléculas de señalización

Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluyen factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Los factores de crecimiento incluyen glicoproteínas que son secretadas por las células y se unen a los receptores de otras células y los activan, iniciando un cambio metabólico o de desarrollo en la célula receptora. En una realización, la proteína de interés es un polipéptido de fusión ActRIIB que comprende el dominio extracelular del receptor ActRIIB y la porción Fc de un anticuerpo (véase, por ejemplo, Wolfman, et al., ActRIIB fusion polypeptides and uses therefor, US2004/0223966 A1) En otra realización, el factor de crecimiento puede ser un propeptido GDF-8 modificado (véase, por ejemplo, Wolfman, et al., Modified and stabilized GDF propeptides and uses thereof, US2003/0104406 A1). Alternativamente, la proteína de interés podría ser una proteína que contiene un dominio de follistatina (véase, por ejemplo, Hill, et al., GASP1: a follistatin domain containing protein, US 2003/0162714 A1, Hill, et al., GASP1: a follistatin domain containing protein, US 2005/0106154 A1, Hill, et al., Follistatin domain containing proteins, US 2003/0180306 A1).

Ejemplos no-limitativos de factores de crecimiento de mamíferos y otras moléculas de señalización incluyen citoquinas; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como aFGF y bFGF; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3, TGF-beta 4 o TGF-beta 5; factor de crecimiento similar a la insulina I y -II (IGF-I e IGF-II); des (1-3) -IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; Proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (TL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; Citoquinas de la superfamilia IL-10 (por ejemplo, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26); factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora folicular; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes como la proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; RANTES (regulado en la activación de células T expresadas y secretadas normalmente); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); sustancia inhibidora de mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de los huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso como NGF-beta. Un experto en la materia será consciente de otros factores de crecimiento o moléculas de señalización que pueden expresarse de acuerdo con la presente invención.

Receptores acoplados a proteína G

Otra clase de polipéptidos que han demostrado ser eficaces como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluyen factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son proteínas que tienen siete dominios transmembrana. Al unirse un ligando a un GPCR, se transduce una señal dentro de la célula que da como resultado un cambio en una propiedad biológica o fisiológica de la célula.

Los GPCR, junto con las proteínas G y los efectores (enzimas intracelulares y canales modulados por proteínas G), son los componentes de un sistema de señalización modular que conecta el estado de los segundos mensajeros intracelulares a las entradas extracelulares. Estos genes y productos genéticos son potenciales agentes causantes de la enfermedad.

Se ha demostrado que defectos específicos en el gen de la rodopsina y el gen del receptor de vasopresina V2 causan diversas formas de retinosis pigmentaria autosómica dominante y recesiva autosómica, diabetes insipidus nefrogénica. Estos receptores son de importancia crítica tanto para el sistema nervioso central como para los procedimientos fisiológicos periféricos. La superfamilia de proteínas GPCR ahora contiene más de 250 tipos de parálogos, receptores que representan variantes generadas por duplicaciones de genes (u otros procedimientos), a diferencia de los ortólogos, el mismo receptor de diferentes especies. La superfamilia se puede dividir en cinco familias: Familia I, receptores tipificados por rodopsina y el receptor beta2-adrenérgico y actualmente representados por más de 200 miembros únicos; Familia II, la familia de receptores de hormona paratiroidea/calcitonina/secretina recientemente caracterizada; Familia III, la familia del receptor metabotrópico de glutamato en mamíferos; Familia IV, la familia de receptores de AMPc, importante en la quimiotaxis y el desarrollo de D. discoideum; y la Familia V, los receptores de feromonas de apareamiento fúngico como STE2.

Los GPCR incluyen receptores para aminas biogénicas, para mediadores lipídicos de inflamación, hormonas peptídicas y mediadores de señales sensoriales. El GPCR se activa cuando el receptor se une a su ligando extracelular. Los cambios conformacionales en el GPCR, que resultan de la interacción ligando-receptor, afectan la afinidad de unión de una proteína G a los dominios intracelulares de GPCR. Esto permite que GTP se una con afinidad mejorada a la proteína G.

La activación de la proteína G por GTP conduce a la interacción de la subunidad α de la proteína G con adenilato ciclasa u otros generadores de moléculas de segundo mensajero. Esta interacción regula la actividad de la adenilato

ciclasa y, por lo tanto, la producción de una segunda molécula mensajera, cAMP. cAMP regula la fosforilación y la activación de otras proteínas intracelulares. Alternativamente, los niveles celulares de otras moléculas de segundo mensajero, tales como cGMP o eicosinoides, pueden estar regulados por la actividad de los GPCR. La proteína G una

5 subunidad se desactiva por hidrólisis de la GTP por GTPasa, y las subunidades α, β y γ se reasocian. La proteína G heterotrimérica se disocia de la adenilato ciclasa u otro generador de moléculas de segundo mensajero. La actividad de GPCR también puede regularse mediante la fosforilación de los dominios o bucles intra y extracelulares.

Los receptores de glutamato forman un grupo de GPCR que son importantes en la neurotransmisión. El glutamato es el neurotransmisor principal en el SNC y se cree que tiene papeles importantes en la plasticidad neuronal, la cognición, la memoria, el aprendizaje y algunos trastornos neurológicos como epilepsia, accidente cerebrovascular y neurodegeneración (Watson, S. and S. Arkininstall (1994) The G- Protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press, San Diego CA, pp. 130-132). Estos efectos del glutamato están mediados por dos clases distintas de receptores denominados ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos contienen un canal catiónico intrínseco y median las rápidas acciones excitadoras del glutamato. Los receptores metabotrópicos son moduladores, aumentando la excitabilidad de la membrana de las neuronas al inhibir las conductancias de potasio dependientes de calcio y al inhibir y potenciar la transmisión excitadora de los receptores ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos se clasifican en cinco subtipos según la farmacología agonista y las vías de transducción de señales y se distribuyen ampliamente en los tejidos cerebrales.

La familia de polipéptidos intestinales vasoactivos (VIP) es un grupo de polipéptidos relacionados cuyas acciones también están mediadas por GPCR. Los miembros clave de esta familia son VIP, secretina y factor de liberación de la hormona del crecimiento (GRF). Los VIP tienen un amplio perfil de acciones fisiológicas que incluyen la relajación de los músculos lisos, la estimulación o inhibición de la secreción en varios tejidos, la modulación de diversas actividades de las células inmunes. y diversas actividades excitadoras e inhibitorias en el SNC. La secretina estimula la secreción de enzimas e iones en el páncreas y el intestino y también está presente en pequeñas cantidades en el cerebro. El GRF es un importante agente neuroendocrino que regula la síntesis y la liberación de la hormona del crecimiento desde la hipófisis anterior (Watson, S. and S. Arkininstall supra, pp. 278-283).

Después de la unión del ligando al GPCR, se transmite un cambio conformacional a la proteína G, lo que hace que la subunidad α intercambie una molécula de GDP unida por una molécula GTP y se disocie de las subunidades β, γ . La forma unida a GTP de la subunidad α funciona típicamente como una unidad estructural moduladora efectora, que conduce a la producción de segundos mensajeros, como el AMP cíclico (por ejemplo, por activación de adenilato ciclasa), diacilglicerol o fosfatos de inositol. Se conocen más de 20 tipos diferentes de subunidades α en el hombre, que se asocian con un conjunto más pequeño de subunidades β y γ . Ejemplos de proteínas G de mamífero incluyen Gi, Go, Gq, Gs y Gt. Las proteínas G se describen ampliamente en Lodish H. et al. Molecular Cell Biology, (Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995).

Los GPCR, son un objetivo importante para la acción y el desarrollo de fármacos. De hecho, los receptores han llevado a más de la mitad de los medicamentos conocidos actualmente (Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14: 1516) y los GPCR representan la diana más importante para la intervención terapéutica con un 30 % de los medicamentos recetados clínicamente, ya sea antagonizando o agonizando un GPCR (Milligan, G. and Rees, S., (1999) TIPS, 20: 118-124). Esto demuestra que estos receptores tienen una historia comprobada y establecida como dianas terapéuticas.

En general, quienes practiquen la presente invención seleccionarán su polipéptido de interés y conocerán su secuencia de aminoácidos precisa. Cualquier proteína dada que deba expresarse de acuerdo con la presente invención tendrá sus propias características idiosincráticas y puede influir en la densidad celular o la viabilidad celular cultivadas, y puede expresarse a niveles más bajos que otro polipéptido o proteína cultivada en condiciones de cultivo idénticas. Un experto habitual en la técnica podrá modificar apropiadamente las etapas y las composiciones de la presente invención para optimizar el crecimiento celular y/o la producción de cualquier polipéptido o proteína expresados.

Enzimas

Otra clase de proteínas que han demostrado ser efectivas como agentes farmacéuticos y/o comerciales incluyen las enzimas. Las enzimas pueden ser proteínas cuya actividad enzimática puede verse afectada por las condiciones de cultivo celular en las que se produjeron. Por lo tanto, la producción de enzimas con actividad enzimática deseable de acuerdo con la presente invención también es de particular interés. Un experto en la materia estará al tanto de muchas enzimas conocidas que las células pueden expresar en cultivo.

Ejemplos no limitantes de enzimas incluyen una carbohidrasa, como una amilasa, una celulasa, una dextranasa, una glucosidasa, una galactosidasa, una glucoamilasa, una hemicelulasa, una pentosanasa, una xilanas, una invertasa, una lactasa, una naringanasa, una pectinasa. y una pululanasa; una proteasa tal como una proteasa ácida, una proteasa alcalina, bromelina, ficina, una proteasa neutra, papaína, pepsina, una peptidasa (por ejemplo, una aminopeptidasa y carboxipeptidasa), cuajo, renina, quimosina, subtilisina, termolisina, una proteinasa aspártica y tripsina; una lipasa o esterasa, como una triglicéridasa, una fosfolipasa, una esterasa pregástrica, una fosfatasa, una fitasa, una amidasa, una iminoacilasa, una glutaminasa, una lisozima y una penicilina acilasa; una isomerasa tal como glucosa isomerasa; una oxidorreductasa, tal como una aminoácido oxidasa, una catalasa, una cloroperoxidasa, una

glucosa oxidasa, una hidroxisteroide deshidrogenasa o una peroxidasa; una liasa tal como una acetolactato descarboxilasa, una descarboxilasa aspártica, una fumarasa o una histadasa; una transferasa tal como ciclodextrina glicosiltransferasa; una ligasa; una quitinasa, una cutinasa, una desoxirribonucleasa, una lacasa, una manosidasa, una mutanasa, una enzima pectinolítica, una polifenoloxidasas, ribonucleasa y transglutaminasa.

- 5 En general, quienes practiquen la presente invención seleccionarán una proteína de interés y conocerán su secuencia de aminoácidos precisa. Cualquier proteína dada que deba expresarse de acuerdo con la presente invención puede tener sus propias características particulares y puede influir en la densidad celular o la viabilidad celular cultivadas, puede expresarse a niveles más bajos que otra proteína cultivada en condiciones de cultivo idénticas, y puede tener actividad biológica diferente dependiendo de las condiciones exactas de cultivo y las etapas realizadas. Un experto
10 habitual en la técnica podrá modificar apropiadamente las etapas y las composiciones utilizadas para producir una proteína particular de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención para optimizar el crecimiento celular y el nivel de producción y/o actividad de cualquier proteína expresada dada.

Introducción de genes para la expresión de proteínas en células huésped

- 15 Generalmente, una molécula de ácido nucleico introducida en la célula codifica la proteína que se desea expresar de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, una molécula de ácido nucleico puede codificar un producto génico que induce la expresión de la proteína deseada por la célula. Por ejemplo, el material genético introducido puede codificar un factor de transcripción que activa la transcripción de una proteína endógena o heteróloga. Alternativa o adicionalmente, una molécula de ácido nucleico introducida puede aumentar la traducción o la estabilidad de una proteína expresada por la célula.

- 20 En la técnica se conocen procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de una proteína de interés en células huésped de mamífero. Véanse, por ejemplo, Gething et al., Nature, 293:620-625, 1981; Mantei et al., Nature, 281:40-46, 1979; Levinson et al. EP 117,060; y EP 117,058. Para las células de mamíferos, los procedimientos comunes para introducir material genético en las células de mamíferos incluyen el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb (Virology, 52:456-457, 1978) o el
25 procedimiento de Hawley-Nelson de la Lipofectamine™ (Gibco BRL) (Focus 15:73, 1993). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamífero han sido descritos por Axel en la Patente de los Estados Unidos No. 4,399,216 publicada el 16 de agosto de 1983. Para diversas técnicas para introducir material genético en células de mamíferos, véase Keown et al., Methods in Enzymology, 1989, Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537, 1990, y Mansour et al., Nature, 336:348-352, 1988.

- 30 En algunas realizaciones, un ácido nucleico para introducir está en forma de una molécula de ácido nucleico desnuda. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida en una célula puede consistir solo en el ácido nucleico que codifica la proteína y los elementos de control genético necesarios. Alternativamente, un ácido nucleico que codifica la proteína (incluidos los elementos reguladores necesarios) puede estar contenido dentro de un vector plasmídico. Ejemplos representativos no limitantes de vectores adecuados para la expresión de proteínas en células de mamífero
35 incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, et al. Mol. Cell Biol. 5:1136-1142, 1985; pMCIneo Poly-A, véase Thomas, et al. Cell 51:503-512, 1987; un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610; CDM8, véase Seed, B. Nature 329:840, 1987; y pMT2PC, véase Kaufman, et al. EMBO J. 6:187-195, 1987. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico para introducir en una célula está contenida dentro de un vector viral. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la proteína puede insertarse en el genoma viral (o un genoma viral parcial). Los elementos reguladores
40 que dirigen la expresión de la proteína pueden incluirse con el ácido nucleico insertado en el genoma viral (es decir, ligado al gen insertado en el genoma viral) o pueden ser proporcionados por el genoma viral mismo.

- El ADN desnudo se puede introducir en las células formando un precipitado que contiene el ADN y el fosfato de calcio. Alternativamente, el ADN desnudo también puede introducirse en las células formando una mezcla de ADN y DEAE-dextrano e incubando la mezcla con las células o incubando las células y el ADN juntos en un tampón apropiado y
45 sometiendo las células a un pulso eléctrico de alto voltaje (por ejemplo, por electroporación). Un procedimiento adicional para introducir células de ADN desnudas es mezclar el ADN con una suspensión de liposomas que contiene lípidos catiónicos. El complejo de ADN/liposoma se incuba con células. El ADN desnudo también se puede inyectar directamente en las células mediante, por ejemplo, microinyección.

- Alternativamente, el ADN desnudo también puede introducirse en las células formando un complejo de ADN con un catión, como la polilisina, que está acoplada a un ligando para un receptor de la superficie celular (véase, por ejemplo, Wu, G. and Wu, C.H. J. Biol. Chem. 263:14621, 1988; Wilson et al. J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992; y Patente de los Estados Unidos No. 5,166,320.). La unión del complejo ADN-ligando al receptor facilita la absorción del ADN por la endocitosis mediada por el receptor.

- 55 El uso de vectores virales que contienen secuencias particulares de ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc que codifica una proteína, es un enfoque común para introducir secuencias de ácido nucleico en una célula. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de células recibe el ácido nucleico, lo que puede evitar la necesidad de seleccionar las células que han recibido el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector viral, generalmente se expresan eficientemente en células que han tomado ácido nucleico del vector viral.

Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia de genes con fines de terapia génica (para una revisión, véase Miller, A.D. *Blood* 76:271, 1990). Se puede construir un retrovirus recombinante que tenga un ácido nucleico que codifique una proteína de interés insertada en el genoma retroviral. Además, se pueden eliminar porciones del genoma retroviral para que la replicación del retrovirus sea defectuosa. Tal retrovirus defectuoso de replicación se empaqueta luego en viriones que se pueden usar para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar mediante técnicas estándar.

El genoma de un adenovirus puede manipularse de modo que codifique y exprese una proteína de interés pero se inactiva en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase, por ejemplo, Berkner et al. *BioTechniques* 6:616, 1988; Rosenfeld et al. *Science* 252:431-434, 1991; y Rosenfeld et al. *Cell* 68:143-155, 1992. Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes son ventajosos porque no requieren que las células en división sean vehículos eficaces de suministro de genes y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluido el epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld et al., 1992, citado supra), células endoteliales (Lemarchand et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6482-6486, 1992), hepatocitos (Herz and Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993) y células musculares (Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584, 1992). Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en él) no está integrado en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episómico, evitando así los posibles problemas que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis de inserción en situaciones en las que el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad de carga del genoma adenoviral para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) en relación con otros vectores de administración de genes (Berkner et al. cited supra; Haj-Ahmand and Graham, *J. Virol.* 57:267, 1986). La mayoría de los vectores adenovirales defectuosos en la replicación actualmente en uso se eliminan para todos o parte de los genes virales E1 y E3, pero retienen hasta el 80 % del material genético adenoviral.

El virus adenoasociado (VAA) es un virus defectuoso natural que requiere otro virus, como un adenovirus o un virus del herpes, como un virus auxiliar para una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión, véase Muzyczka et al. *Curr. Topics in Micro. and Immunol.*, 158:97-129, 1992). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no se dividen, y exhibe una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356, 1992; Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828, 1989; y McLaughlin et al., *J. Virol.* 62:1963-1973, 1989). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de AAV pueden empaquetarse y pueden integrarse. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector AAV como el descrito en Tratschin et al. (*Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260, 1985) puede usarse para introducir ADN en las células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470, 1984; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081, 1985; Wondisford et al., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39, 1988; Tratschin et al., *J. Virol.* 51:611-619, 1984; y Flotte et al., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790, 1993).

Cuando el procedimiento utilizado para introducir moléculas de ácido nucleico en una población de células da como resultado la modificación de una gran proporción de las células y la expresión eficiente de la proteína por las células, la población modificada de células puede usarse sin más aislamiento o subclonación de células individuales dentro de la población. Es decir, puede haber producción suficiente de la proteína por parte de la población de células, de modo que no se necesita más aislamiento celular y la población puede usarse inmediatamente para sembrar un cultivo celular para la producción de la proteína. Alternativamente, puede ser deseable aislar y expandir una población homogénea de células a partir de unas pocas células o una sola célula que produzca eficientemente la proteína.

Alternativa a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula que codifica una proteína de interés, el ácido nucleico introducido puede codificar otro polipéptido o proteína que induce o aumenta el nivel de expresión de la proteína producida endógenamente por una célula. Por ejemplo, una célula puede ser capaz de expresar una proteína particular pero puede no hacerlo sin un tratamiento adicional de la célula. De manera similar, la célula puede expresar cantidades insuficientes de la proteína para el propósito deseado. Por lo tanto, un agente que estimula la expresión de la proteína de interés puede usarse para inducir o aumentar la expresión de esa proteína por la célula. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico introducida puede codificar un factor de transcripción que activa o regula al alza la transcripción de la proteína de interés. La expresión de dicho factor de transcripción a su vez conduce a la expresión, o una expresión más robusta de la proteína de interés.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de la proteína se introduce de manera estable en la célula huésped. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que dirige la expresión de la proteína se introduce transitoriamente en la célula huésped. Un experto habitual en la técnica podrá elegir si introducir de forma estable o transitoria un ácido nucleico en la célula en función de sus necesidades experimentales.

Un gen que codifica una proteína de interés puede estar opcionalmente unido a uno o más elementos reguladores de control genético. En ciertas realizaciones, un elemento de control genético dirige la expresión constitutiva de la proteína. En ciertas realizaciones, se puede usar un elemento de control genético que proporciona la expresión inducible de un gen que codifica la proteína de interés. El uso de un elemento de control genético inducible (por ejemplo, un promotor inducible) permite la modulación de la producción de la proteína en la célula. Ejemplos no limitantes de elementos de control genético inducible potencialmente útiles para su uso en células eucariotas incluyen

5 elementos regulados por hormonas (por ejemplo, véase Mader, S. and White, J.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607, 1993), elementos regulados por ligandos sintéticos (Véase, por ejemplo, Spencer, D.M. et al., Science 262:1019-1024, 1993) y elementos regulados por radiación ionizante (por ejemplo, véase Manome, Y. et al., Biochemistry 32:10607-10613, 1993; Datta, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10149-10153, 1992). Se pueden usar sistemas reguladores adicionales específicos de células u otros conocidos en la técnica de acuerdo con la invención.

Un experto habitual en la técnica podrá elegir y, opcionalmente, modificar apropiadamente el procedimiento de introducción de genes que hacen que la célula exprese la proteína de interés de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

Aislamiento de la proteína expresada

10 En general, típicamente será deseable aislar y/o purificar proteínas expresadas de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, la proteína expresada es secretada en el medio y, por lo tanto, las células y otros sólidos pueden eliminarse, tal como por centrifugación o filtración, por ejemplo, como una primera etapa en el procedimiento de purificación.

15 Alternativamente, la proteína expresada puede unirse a la superficie de la célula huésped. Por ejemplo, los medios pueden eliminarse y las células huésped que expresan la proteína se someten a lisis como una primera etapa en el procedimiento de purificación. La lisis de las células hospedadoras de mamíferos se puede lograr por cualquier número de medios bien conocidos por los expertos en la materia, incluida la interrupción física mediante perlas de vidrio y la exposición a condiciones de pH alto.

20 La proteína expresada puede aislarse y purificarse mediante procedimientos estándar que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, Intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño y cromatografía de hidroxapatita), filtración en gel, centrifugación o solubilidad diferencial, precipitación con etanol y/o mediante cualquier otra técnica disponible para la purificación de proteínas (Véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification Principles and Practice 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, 1987; Higgins, S.J. and Hames, B.D. (eds.), Protein Expression : A Practical Approach, Oxford Univ Press, 1999; y Deutscher, M.P., Simon, M.I., Abelson, J.N. (eds.), Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology (Methods in Enzymology Series, Vol. 182), Academic Press, 1997). Para la cromatografía de inmovilización en particular, la proteína se puede aislar uniéndola a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que se generaron contra esa proteína y se fijaron a un soporte estacionario. Alternativamente, las etiquetas de afinidad tales como una secuencia de capa de influenza, polihistidina o glutatión-S-transferasa se pueden unir a la proteína mediante técnicas recombinantes estándar para permitir una fácil purificación pasando por la columna de afinidad apropiada. Se pueden agregar inhibidores de la proteasa como el fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), leupeptina, pepstatina o aprotinina en cualquiera o en todas las etapas para reducir o eliminar la degradación de la proteína durante el procedimiento de purificación. Los inhibidores de la proteasa son particularmente ventajosos cuando las células deben ser sometidas a lisis para aislar y purificar la proteína expresada.

35 Un experto en la materia apreciará que la técnica de purificación exacta variará dependiendo del carácter de la proteína a purificar, el carácter de las células a partir de las cuales se expresa la proteína y/o la composición del medio en el que las células fueron cultivadas.

Formulaciones farmacéuticas

40 En ciertas realizaciones preferidas de la invención, los polipéptidos o proteínas producidos tendrán actividad farmacológica y serán útiles en la preparación de productos farmacéuticos. Las composiciones tal como se describieron anteriormente pueden administrarse a un sujeto o pueden formularse primero para su administración por cualquier vía disponible que incluya, pero no se limite a parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea, oral, nasal, bronquial, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, rectal y vaginal. Las composiciones farmacéuticas inventivas típicamente incluyen un polipéptido o proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero, un agente de administración (es decir, un polímero catiónico, transportador molecular de péptidos, tensioactivo, etc., como se describe anteriormente) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

50 Una composición farmacéutica está formulada para ser compatible con su vía de administración prevista. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen típicamente soluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil manipulación con jeringa. Las formulaciones farmacéuticas preferidas son estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En general, el vehículo relevante puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el polipéptido o la proteína purificada en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el polipéptido purificado o la proteína expresada a partir de una línea celular de mamífero en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el polipéptido o proteína purificada puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas, trociscos o cápsulas, *por ejemplo*, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para usar como enjuague bucal. Pueden incluirse agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. Las formulaciones para administración oral pueden incorporar ventajosamente agentes para mejorar la estabilidad dentro del tracto gastrointestinal y/o mejorar la absorción.

Para la administración por inhalación, las composiciones que comprenden un polipéptido o proteína purificada expresada a partir de una línea celular de mamífero y un agente de administración se administran preferiblemente en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, *por ejemplo*, un gas como dióxido de carbono o un nebulizador. La presente divulgación contempla particularmente el suministro de las composiciones usando un aerosol nasal, inhalador u otro suministro directo a las vías aéreas superiores y/o inferiores. Se ha demostrado que la administración intranasal de vacunas de ADN dirigidas contra los virus de la gripe induce respuestas de células T CD8, lo que indica que al menos algunas células del tracto respiratorio pueden absorber ADN cuando se administran por esta ruta, y los agentes de administración de la divulgación mejorarán la captación celular. De acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, las composiciones que comprenden un polipéptido purificado expresado a partir de una línea celular de mamífero y un agente de administración se formulan como partículas porosas grandes para la administración de aerosol.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación agentes de penetración apropiados para la barrera que se va a atravesar. Tales agentes de penetración son en general conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, el polipéptido purificado o la proteína y los agentes de administración se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Las composiciones también se pueden preparar en forma de supositorios (*por ejemplo*, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

En una realización, las composiciones se preparan con vehículos que protegerán el polipéptido o la proteína contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos

para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposómicas (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4,522,811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto por tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de polipéptido o proteína activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

El polipéptido o proteína expresado de acuerdo con la presente invención puede administrarse a diversos intervalos y durante diferentes períodos de tiempo según se requiera, por ejemplo, una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, entre 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas, aproximadamente 4, 5, o 6 semanas, etc. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluidos, entre otros, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, La salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Generalmente, el tratamiento de un sujeto con un polipéptido o proteína como se describe en el presente documento puede incluir un solo tratamiento o, en muchos casos, puede incluir una serie de tratamientos. Además, se entiende que las dosis apropiadas pueden depender de la potencia del polipéptido o proteína y, opcionalmente, pueden adaptarse al receptor particular, por ejemplo, mediante la administración de dosis crecientes hasta que se logre una respuesta deseada preseleccionada. Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto animal particular puede depender de una variedad de factores que incluyen la actividad del polipéptido o proteína específicos empleados, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la ruta de administración, la velocidad de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que se modula.

La presente divulgación incluye el uso de composiciones para el tratamiento de animales no humanos. En consecuencia, las dosis y los procedimientos de administración pueden seleccionarse de acuerdo con los principios conocidos de farmacología y medicina veterinaria. Se puede encontrar orientación, por ejemplo, en Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th edition, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Kits

La presente divulgación también proporciona kits que incluyen componentes útiles para preparar un medio de cultivo celular que incluye una composición que comprende hierro como se describe en el presente documento. Tales kits pueden ser de uso particular para aumentar la densidad, la viabilidad y/o el título celulares de un cultivo celular.

En algunas realizaciones, tales kits incluyen uno o más reactivos para hacer un medio de cultivo celular inicial. Dichos kits pueden incluir uno o más reactivos útiles para complementar un medio de cultivo celular definido (por ejemplo, hormonas y/u otros factores de crecimiento; iones inorgánicos como sodio, cloruro, calcio, magnesio y fosfato; tampones; vitaminas; nucleósidos o nucleótidos; oligoelementos; aminoácidos; lípidos; o glucosa u otra fuente de energía). Los kits pueden incluir una composición separada que comprende hierro (por ejemplo, FeSO₄, Fe-citrato, Fe-transferrina, Fe-cloruro, Fe-nitrato, Fe-EDTA, Fe(NO₃)₃, FeCl₂, o FeCl₃). En algunas realizaciones, los kits incluyen una composición separada que comprende hierro que efectuará concentraciones adecuadas en el medio de cultivo celular descrito en el presente documento (por ejemplo, que varía entre 100 μM y 5 mM). Los kits también pueden contener instrucciones (por ejemplo, manual del usuario) para agregar la composición separada de hierro al medio de cultivo celular inicial en uno o más puntos de tiempo durante el curso de un procedimiento de cultivo celular descrito aquí.

Los componentes de los kits pueden proporcionarse en contenedores individuales y pueden proporcionarse juntos múltiples contenedores de este tipo en un contenedor común.

La presente invención se ilustra con más detalles mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos se proporcionan solo a modo de ilustración y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Adición de Fe al cultivo alimentado por lotes después del día 3

Este experimento demuestra que la adición de Fe durante el cultivo alimentado por lotes de células que producen proteínas terapéuticas después del día 3 produce un aumento significativo en la densidad, la viabilidad y el título celulares.

Se cultivaron células CHO, Línea Celular 1, en un medio enriquecido químicamente definido usando un procedimiento de cultivo alimentado por lotes. Se añadió una alta concentración de Fe (por ejemplo, 100 μ M a 5 mM) al cultivo celular después del día 3 para efectuar diferentes concentraciones de Fe (por ejemplo, 0 mM, 0,1 mM, 1,0 mM, 2,0 mM o 5,0 mM). En este experimento, se usó citrato férrico y las células se cultivaron en matraces con agitación. Las células
5 fueron sometidas a análisis de densidad, viabilidad y título celular en varios puntos de tiempo a lo largo del procedimiento de cultivo celular.

La densidad celular viable fue determinada por CEDEX utilizando un procedimiento de reconocimiento de imágenes digitales. El efecto de diferentes dosis de adición de Fe después del día 3 sobre el crecimiento celular de la Línea Celular 1 de ejemplo se muestra en la Figura 1. Como se puede ver en la Figura 1, la adición de Fe después del día 3
10 aumentó la densidad celular viable en comparación con las células cultivadas en ausencia de hierro.

La viabilidad celular fue determinada por CEDEX por el procedimiento de exclusión de azul de tripano. El efecto de diferentes dosis de adición de Fe después del día 3 sobre la viabilidad celular de la línea celular 1 de ejemplo se muestra en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, la adición de Fe después del día 3 aumentó la viabilidad celular en comparación con las células cultivadas en ausencia de hierro.

15 Además, se determinó el efecto de la adición de Fe sobre la viabilidad celular en la etapa tardía del cultivo celular. Específicamente, la viabilidad celular se determinó el día 16 para células cultivadas en presencia o ausencia de hierro. Como se muestra en la Figura 3, la adición de Fe aumentó la viabilidad celular en el día 16.

También se determinó el efecto de diferentes dosis de adición de Fe después del día 3 sobre el título de anticuerpos. El título de anticuerpos se determinó por procedimientos de HPLC de afinidad de proteína A el día 16 para células cultivadas en presencia o ausencia de concentraciones variables de hierro. Como se muestra en la Figura 4, la adición de Fe aumentó el título de anticuerpos en el día 16.
20

También se observó que es probable que la concentración óptima de adición de Fe después del día 3 sea de 0,3 mM a 1 mM. La adición de Fe en cualquier día después del día 3 es efectiva. La distribución de Fe en múltiples alimentaciones puede ser mejor que una sola suma global.

25 Se realizaron experimentos similares en una segunda línea celular de ejemplo, la Línea Celular 2, y los resultados de ejemplo se muestran en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 5, la adición de Fe mejoró la densidad, la viabilidad y el título celulares, especialmente en la etapa tardía.

Además del Fe-citrato, también se probó el efecto de otros complejos de Fe, como FeSO_4 o Fe-transferrina. La Figura 6 resume los resultados de ejemplo que muestran el efecto de la adición de FeSO_4 y Fe-citrato después del día 3 sobre la densidad celular viable y la viabilidad en el día 14 de la Línea Celular 1 del cultivo alimentado por lotes.
30

También se han realizado experimentos similares en experimentos con matraces con agitación y biorreactores y el efecto fue el mismo. Este efecto se ha observado para diferentes productos (como diferentes anticuerpos monoclonales).

35 Por lo tanto, el efecto beneficioso de la adición de Fe es independiente de la línea celular, la escala de cultivo celular, la fuente de Fe y el producto. También se determinó que la calidad del producto no se vio afectada por la alta concentración de Fe.

Ejemplo 2: Adición de fe en el día 6

Las células CHO que expresan un nanocuerpo se cultivaron mediante cultivo alimentado por lotes en matraces con agitación. Las células se cultivaron inicialmente en una incubadora de CO_2 al 7 % a 37 °C durante 0-4 días y se cambiaron a 31 °C después del día 4. Se añadió FeSO_4 el día 6 para efectuar una concentración de 1 mM de hierro en el medio de cultivo celular. Las células se sometieron a análisis de densidad, viabilidad, título, nivel de lactato y Qp celulares en diversos puntos de tiempo a lo largo del procedimiento de cultivo celular como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados del ejemplo se muestran en las Figuras 7 a 10. Como se muestra en las Figuras 7 a 10, Fe la adición
40 mostró un beneficio significativo durante el cultivo celular, incluida la mejora de la viabilidad (por ejemplo, 96 % frente al 70 % el día 15 como se muestra en la Figura 7), la mejora del título (por ejemplo, 3,2 g/L frente a 1,5 g/L el día 15 como se muestra en el día 15 Figura 8), mejora de Qp (por ejemplo, 20 $\mu\text{g}/\text{e6}/\text{día}$ frente a 10 $\mu\text{g}/\text{e6}/\text{día}$ como se muestra en la Figura 9), y reducción del nivel de lactato (por ejemplo, el lactato se mantuvo cerca del cultivo celular 0 con adición de Fe, pero no para cultivo de control sin adición de Fe, que aumentó a 2,24 g/L en el día 15, como se muestra en la Figura 10).
45

Ejemplo 3: adición de Fe en el día 0

Este experimento está diseñado para probar si una alta concentración de Fe añadida en el día 0 tendría un efecto ventajoso. Las células de una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal (clon 2.8) se cultivaron en matraces con agitación con pH controlado con 7 % de CO_2 a 120 rpm usando un agitador orbital. La densidad de semillas fue de $1,5 \times 10^6$ células/mL. Las células se cultivaron durante 14 días. El medio basal era un medio basal definido
55 químicamente suplementado con aminoácidos que incluyen glutamina 4 mM. El medio de alimentación es un medio

de alimentación concentrado químicamente definido. Se añadió Fe-citrato o FeSO_4 el día 0 o el día 9 para efectuar una concentración de $600 \mu\text{M}$ de hierro en el medio de cultivo celular. Las células se sometieron a análisis de densidad, viabilidad, título y Q_p celulares en varios puntos de tiempo a lo largo del procedimiento de cultivo celular como se describe en ejemplos anteriores. Se muestran resultados de ejemplo en las Figuras 11 a 13.

- 5 La adición de Fe-citrato en el día 0 condujo a un mayor crecimiento celular en la etapa temprana del cultivo celular, mientras que la adición de Fe en el día 9 mostró una densidad celular mejorada en la etapa posterior del cultivo celular (Figura 11). Sin embargo, la adición de Fe-citrato en el día 0 no parece ayudar a mantener una mayor viabilidad al final del cultivo celular. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 12, la viabilidad en el día 14 para el cultivo celular con adición de Fe-citrato a $600 \mu\text{M}$ en el día 0 es aproximadamente del 75 %, que es comparable a la viabilidad del 74-80 % en el día 14 para el cultivo de control sin Fe además. Por el contrario, la viabilidad celular para el cultivo celular con adición de Fe en el día 9 es del 85-90 %.

Además, como se muestra en la Figura 13, la Q_p del cultivo celular con adición de Fe-citrato en el día 0 es más baja que todas las demás condiciones en todo el cultivo.

- 15 En algunos casos, cuando se añadió Fe al comienzo del cultivo celular, se observó toxicidad a altas concentraciones de Fe. Por ejemplo, se añadió Fe a la Línea Celular 1 en el día 0 y en la Figura 14 se muestran efectos de ejemplo sobre la viabilidad celular en el matraz de agitación. Como se puede ver en la Figura 14, se observó toxicidad para concentraciones de Fe superiores a $100 \mu\text{M}$. En comparación con los resultados mostrados en los Ejemplos 1 y 2, es sorprendente que las altas concentraciones de Fe añadidas después del día 0 no solo no tuvieran toxicidad, sino que también demostraron un beneficio para el cultivo celular, incluida la viabilidad celular y el crecimiento celular.

20 **Equivalentes**

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando nada más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención, descritas aquí. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la Descripción anterior, sino que es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

- 25 Las publicaciones discutidas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aumentar la densidad, la viabilidad y/o el título celular en un medio de cultivo celular que comprende etapas de:
 - (a) proporcionar células en un medio de cultivo celular para iniciar un procedimiento de cultivo celular en el que dicho medio de cultivo celular comprende hierro como un elemento traza; y
 - (b) añadir una composición que comprenda hierro a dicho medio de cultivo celular durante el procedimiento de cultivo celular, de tal manera que la concentración de hierro en el medio de cultivo celular aumente a lo largo del procedimiento de cultivo celular,
- 10 en el que la composición que comprende hierro es agregada en o después del día 3 del procedimiento de cultivo celular, en el que la concentración de hierro en el medio de cultivo celular después de la adición de la composición que comprende hierro varía entre 100 μM y 5 mM.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición que comprende hierro es seleccionada del grupo que consiste en FeSO_4 , Fe-citrato, Fe-transferrina, Fe-cloruro, Fe-nitrato, Fe-EDTA, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeCl_2 , FeCl_3 y combinaciones de los mismos.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición que comprende hierro es agregada en o después del día 6 del procedimiento de cultivo celular.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición que comprende hierro es agregada en múltiples puntos de tiempo durante el procedimiento de cultivo celular.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración de hierro en el medio de cultivo celular después de la adición de la composición que comprende hierro oscila entre 300 μM y 1 mM.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células son células de mamífero.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que las células de mamífero son células CHO.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento de cultivo celular es un procedimiento de cultivo de producción a gran escala.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el volumen del medio de cultivo celular es al menos aproximadamente 500 L.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células portan un gen que codifica una proteína recombinante.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la proteína recombinante es un anticuerpo o fragmento del mismo.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la proteína recombinante es una proteína terapéutica.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el procedimiento comprende además purificar la proteína recombinante.

FIG. 1

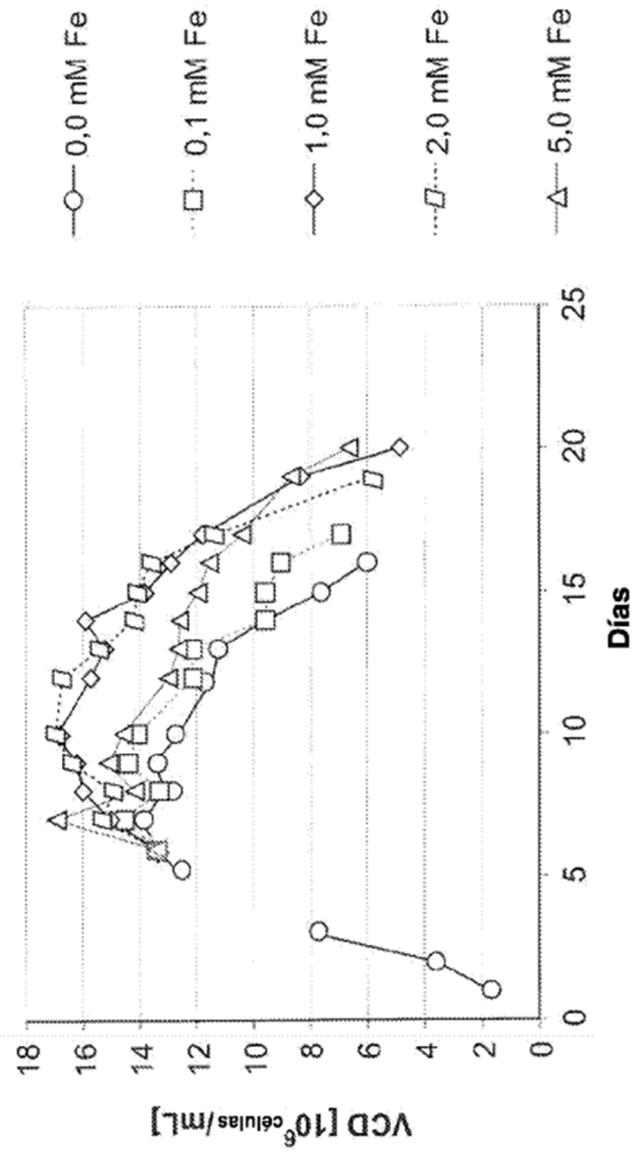


FIG. 2

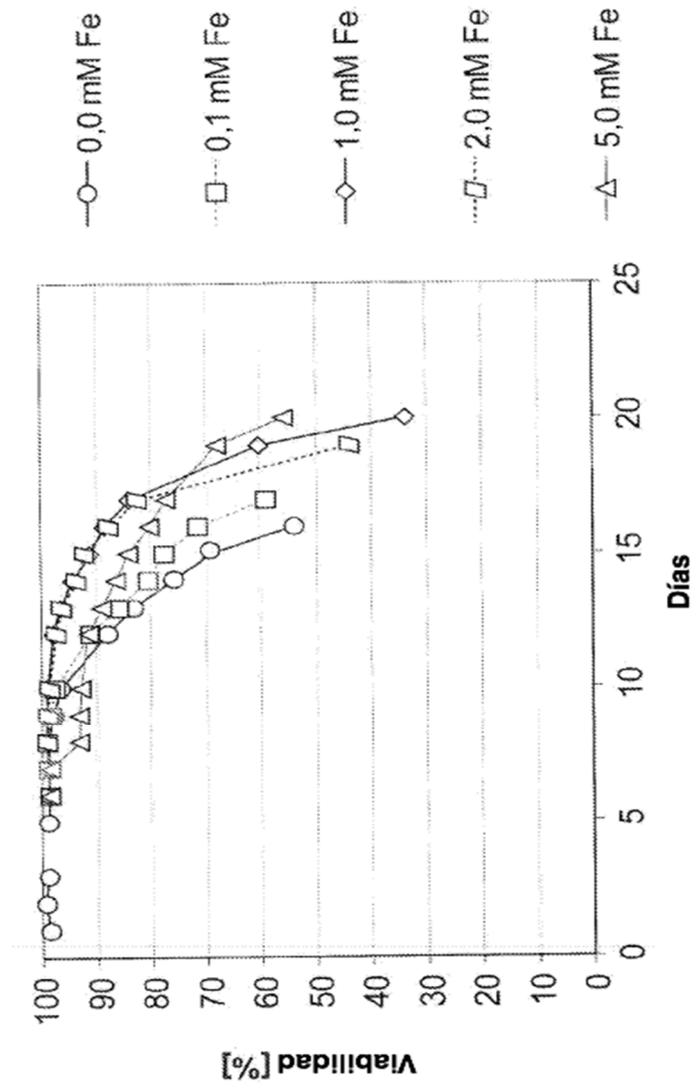


FIG. 3

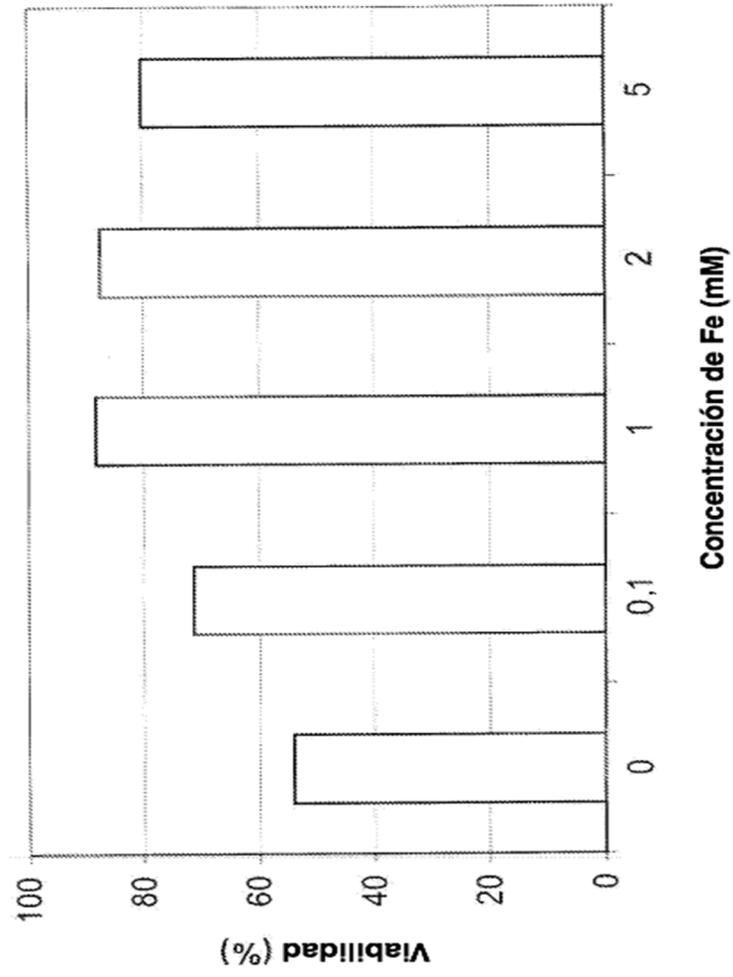


FIG. 4

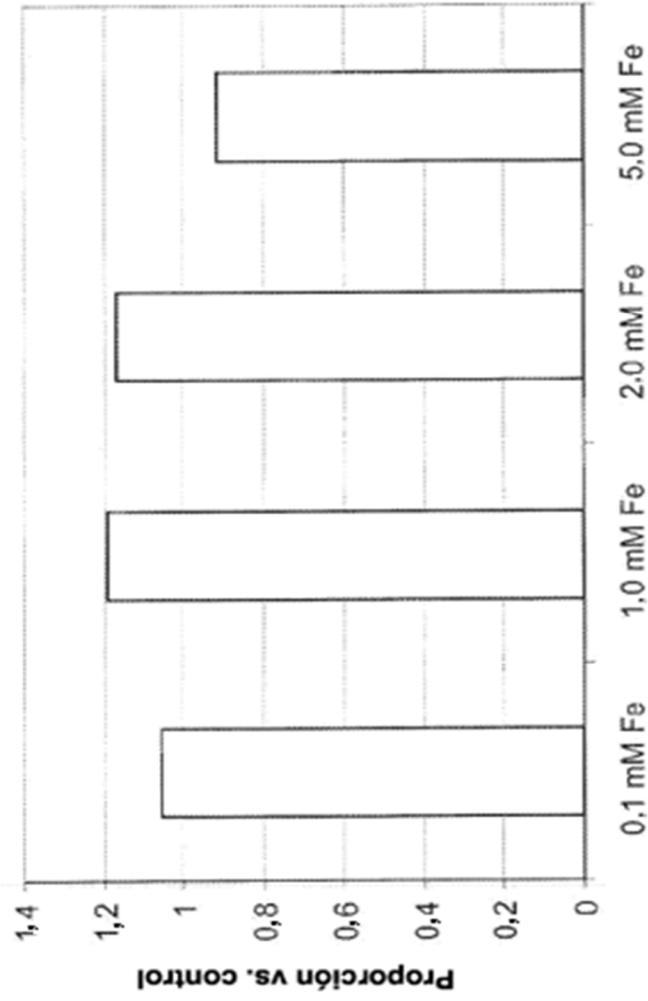


FIG. 5

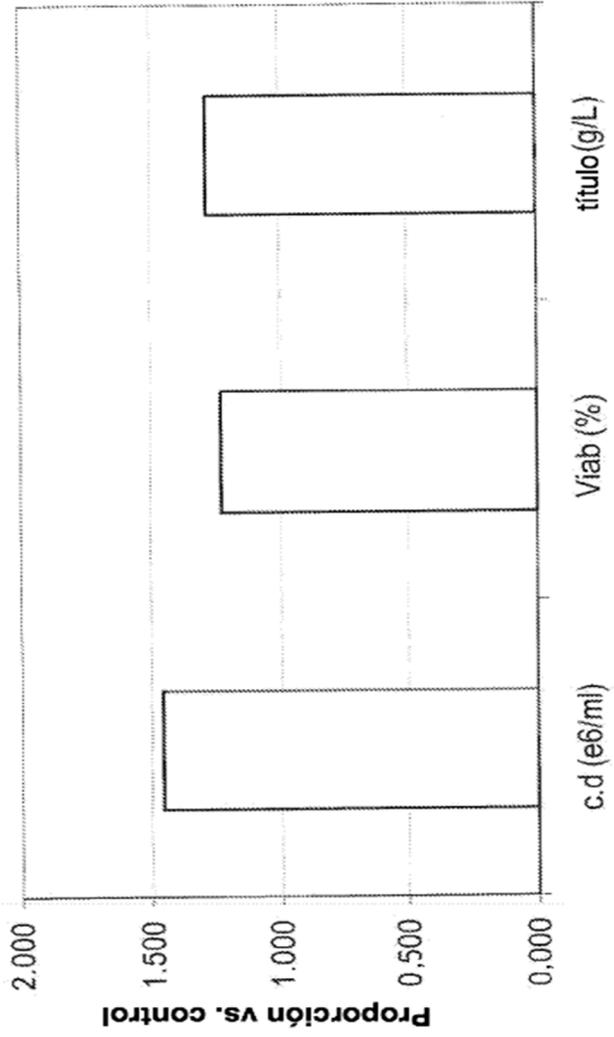


FIG. 6

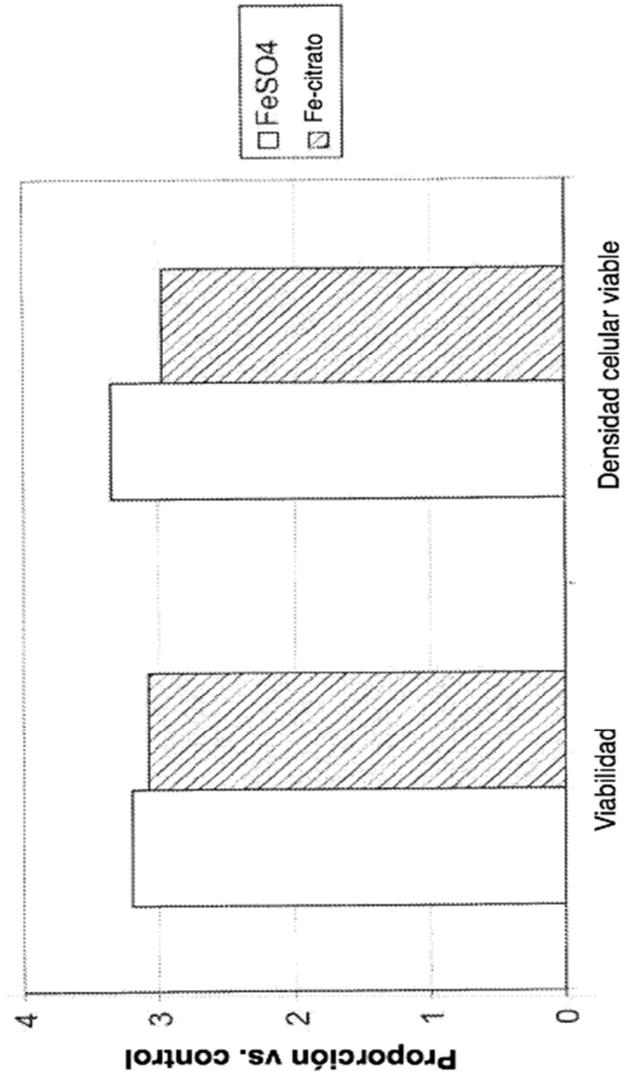


FIG. 7

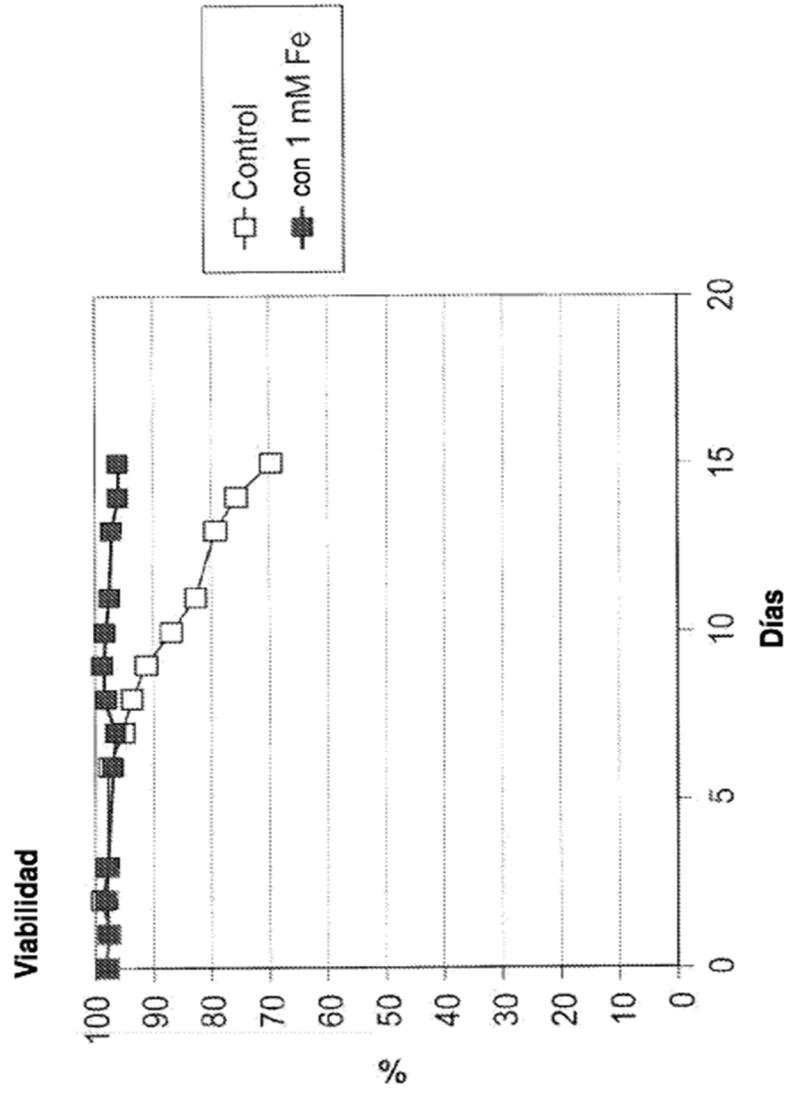


FIG. 8

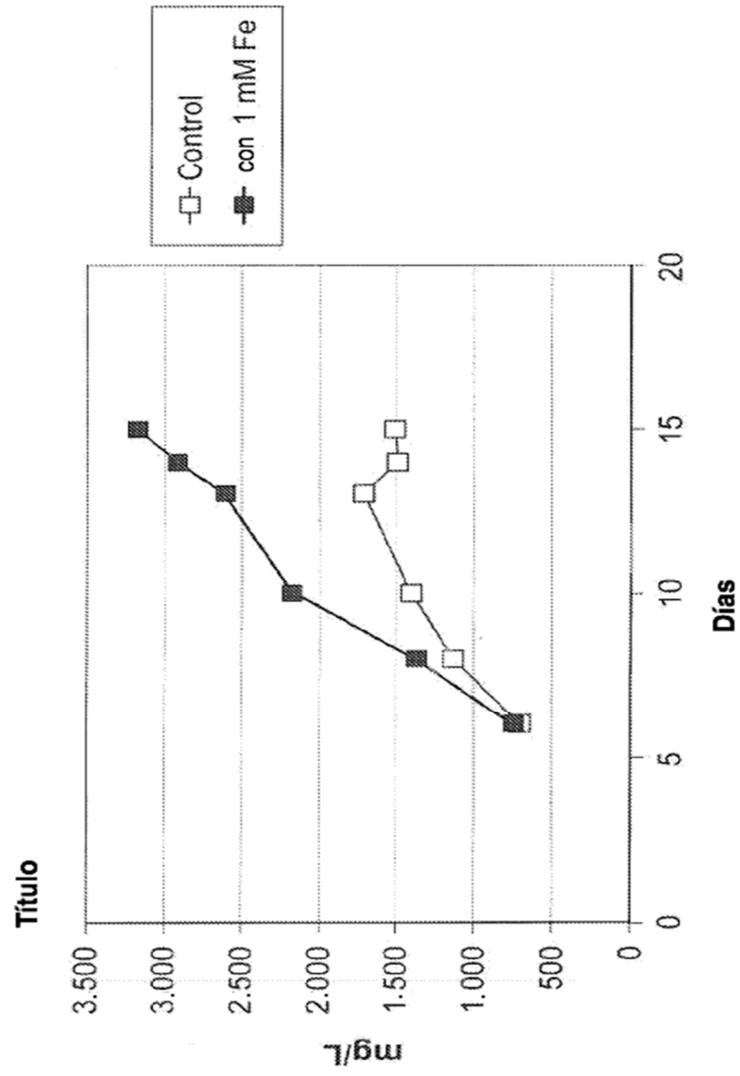


FIG. 9

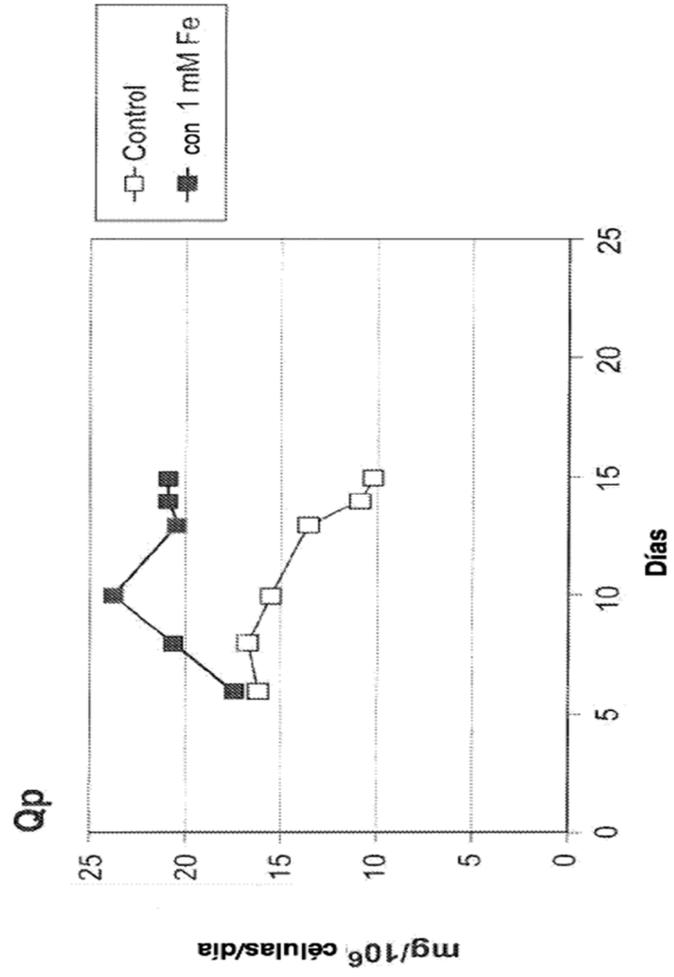


FIG. 10

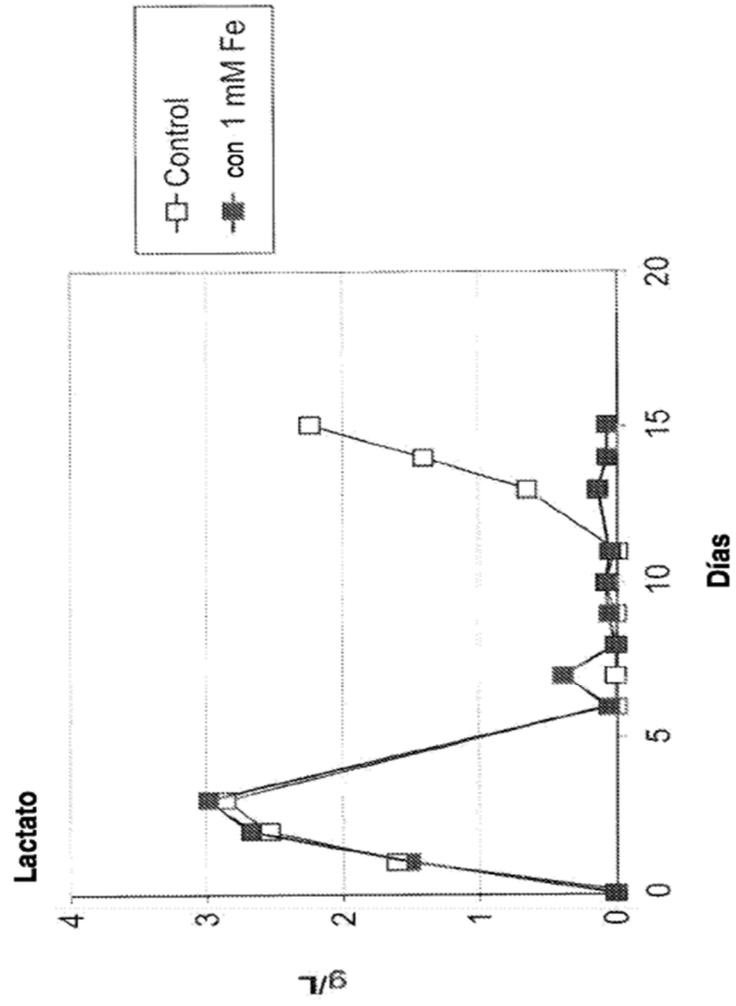


FIG. 11

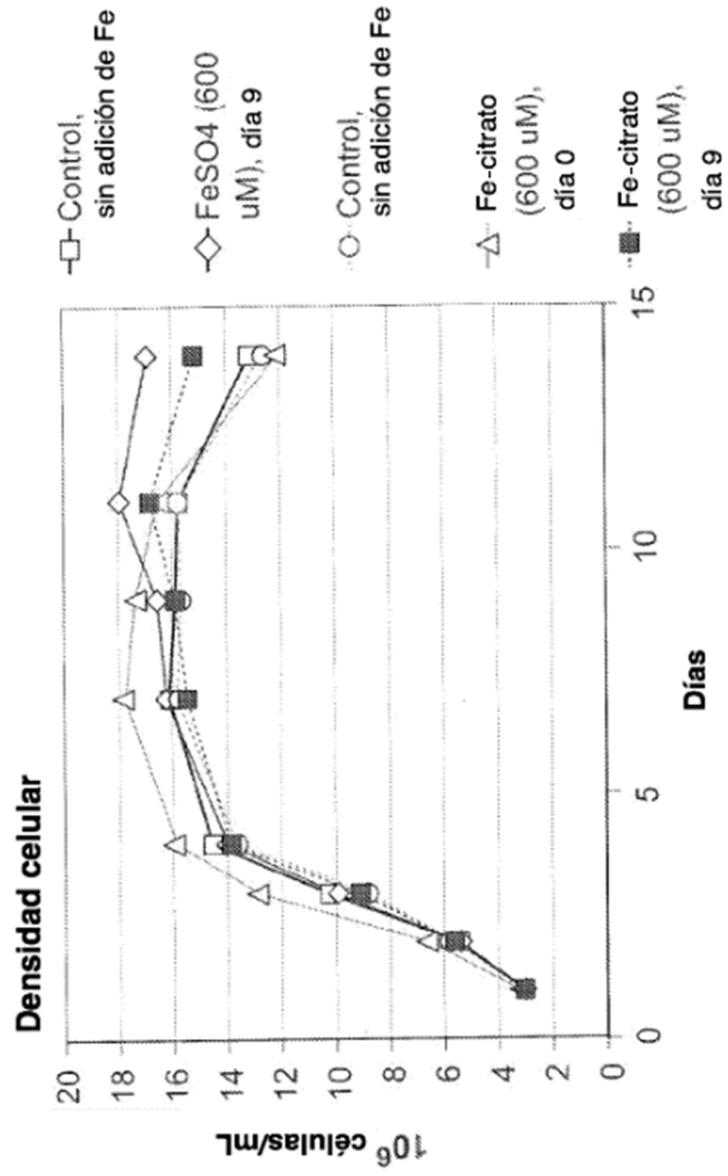


FIG. 12

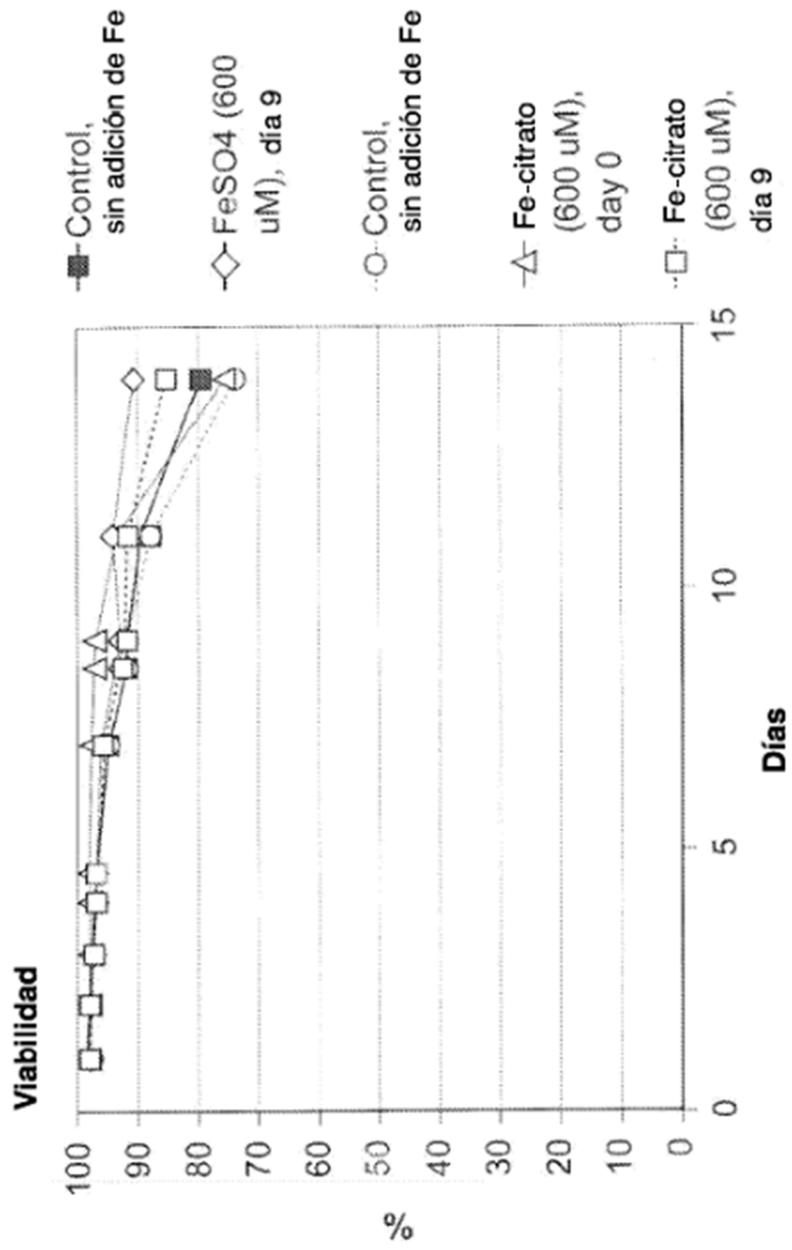


FIG. 13

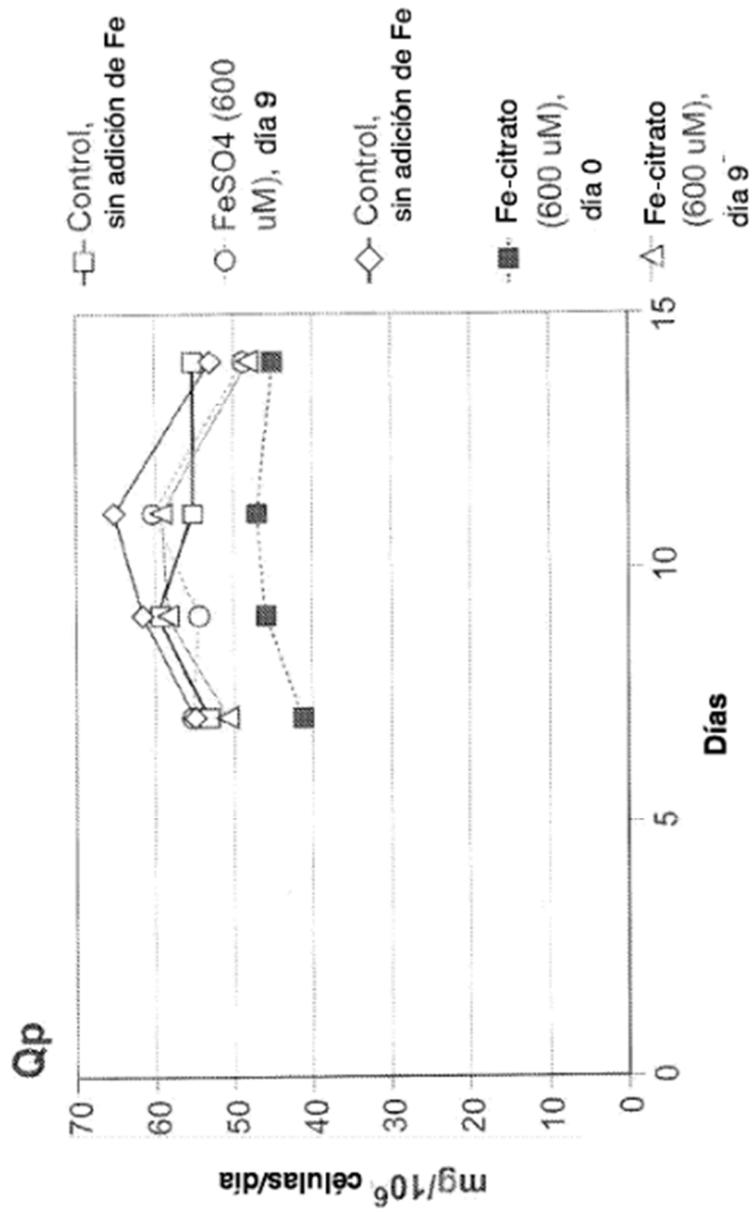


FIG. 14

