



DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO METODOS DE PRODUCCION DE GLUCOPROTEINAS EN
CULTIVOS DE CELULAS DE MAMIFEROS USANDO GLUCO-
CORTICOIDES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO PRINCETON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDOÑEZ

22. BOGOTÁ, D. C., Abril 11, 2012

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-058562-00000-0000

Fecha: 2012-04-10 16:09:46
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 279

ción

FORMULARIO ÚNICO DE :

PC I

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE

(71)

Nombre: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Dirección: Route 206 and Province Line Road
Princeton, New Jersey 08543-4000, U.S.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 Usaquén

TP 20281

4

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: JING, Ying; LI, Zhengjian; QIAN, Yueming

Dirección: 25 Maurice Road Wellesley, MA 02482 (US); c/o Bristol-Myers Squibb Company 6000 Thompson Road Building 22A 1st Floor Syracuse, New York 13057 (US); c/o Bristol-Myers Squibb Company 6000 Thompson Road Building 22A 1st Floor Syracuse, New York 13057 (US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados unidos de América

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/051552

Fecha 06-10-2010

Publicación Internacional No. WO 2011/044180

Fecha 14-04-2011

6

Título (54)

METODOS DE PRODUCCION DE GLUCOPROTEINAS EN CULTIVOS DE CELULAS DE MAMIFEROS USANDO
GLUCOCORTICOIDES

7

Clasificación Internacional (51) C07K 14/435 - C07K 14/705

8

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) Pais de Origen

US

US

(32) Fecha

06-10-2009

05-10-2010

(31) Número de Solicitud

61/278,343

12/897,857

9

Comprobante de pago No. 12-0021417 - 12-0030434 - 12-0030435 -
12-0025489

Fecha

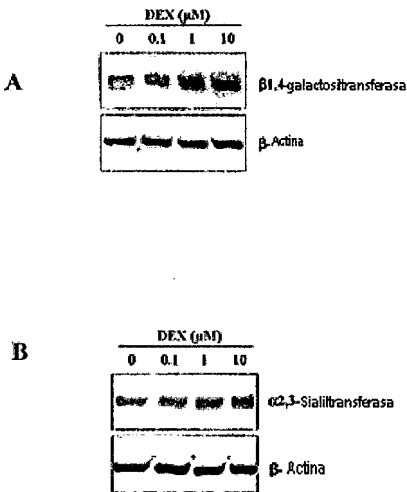
29-02-12 - 12-03-12 - 27-03-12

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos

11 FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

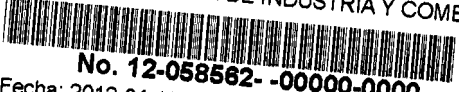
FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

3012/005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0021417	
				Bogotá D.C., Febrero 29 de 2012 - 16:46:18	
RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE				NI 900.034.906	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	R. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692632	28/02/2012	62.480.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1 50005-01-01 SOLICITUDES		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-058562-00000-0000 Fecha: 2012-04-10 16:09:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 279					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Febrero 29 de 2012 - 16:46:32					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0025489
		Bogotá D.C., Marzo 12 de 2012 - 17:30:47

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE	NI 900.034.906
--------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10159844	12/03/2012	87.945.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1641 S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACION (CB.NOMBRE, DOMICIL)	300.000.00	300.000.00
			\$300.000.00
=====			

SON: **TRESCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-058562- -00000-0000
Fecha: 2012-04-10 16:09:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 279

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0030434	
				Bogotá D.C., Marzo 27 de 2012 - 16:37:28	
RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE				NI 900.034.906	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	412111851	26/03/2012	106.845.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	30.000.00	30.000.00	
				\$30.000.00	
=====					
SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-058562- -00000-0000 Fecha: 2012-04-10 16:09:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 279					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Marzo 27 de 2012 - 16:37:52					

EXTRACTOS

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION	☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/435 - C07K 14/705			
(71) Solicitante(s) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY			
(72) Inventor(es) JING, Ying; LI, Zhengjian; QIAN, Yueming			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/278,343	06-10-2009	US
	12/897,857	05-10-2010	US
(85) Fecha inicio fase nacional: : 06-05-2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14-04-2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 06-10-2010		N° publicación: WO 2011/044180	
No. de solicitud PCT/US2010/051552			
(54) Titulo:METODOS DE PRODUCCION DE GLUCOPROTEINAS EN CULTIVOS DE CELULAS DE MAMIFEROS USANDO GLUCOCORTICOIDES			

CONTINUA AL RESPALDO ...

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 14/435 - C07K 14/705	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	
(30) Prioridad	(31) No.	32) Fecha	(33) País
	61/278,343	06-10-2009	US
	12/897,857	05-10-2010	US
		(72) Inventor(es) JING, Ying; LI, Zhengjian; QIAN, Yueming	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 06-05-2012		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14-04-2011
	Fecha de presentación de la solicitud: 06-10-2010		N° publicación: WO 2011/044180
	No. de solicitud PCT/US2010/051552		
(54) Título: METODOS DE PRODUCCION DE GLUCOPROTEINAS EN CULTIVOS DE CELULAS DE MAMIFEROS USANDO GLUCOCORTICOIDES			

RESUMEN:

La presente invención describe métodos y procesos para la producción de proteínas, en particular de glucoproteínas, mediante el cultivo de células animales o de mamífero, preferentemente, pero no limitados a, cultivos celulares semicontinuos. En un aspecto, los métodos comprenden la adición de compuesto glucocorticoide durante el periodo de cultivo. La adición de compuesto glucocorticoide mantiene una viabilidad alta de los cultivos celulares y puede proporcionar un aumento en la titulación final de producto proteico y una calidad alta de producto proteico, tal como se determina, por ejemplo, por medio del contenido de ácido siálico en la proteína producida.

COPIA SOLICITUD
INTERNACIONAL

Received – BMS IP Dept

Action Due:

Due Date:

Atty/Agt:

By D. Bragg at Mar 19, 2012

From the INTERNATIONAL BUREAU OF PATENT COOPERATION

To:

PARLET, Nickki, L.
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2012 (16.03.2012)	
Applicant's or agent's file reference 11400-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2010/051552	International filing date (day/month/year) 06 October 2010 (06.10.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address JING, Ying c/o Bristol-Myers Squibb Company 6000 Thompson Road Building 22A 1st Floor Syracuse, New York 13057 United States of America	State of Nationality CN	State of Residence US
Telephone No.		
Facsimile No.		
E-mail address		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address JING, Ying 25 Maurice Road Wellesley, MA 02482 United States of America	State of Nationality CN	State of Residence US
Telephone No.		
Facsimile No.		
E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized		
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned	
☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer HARA Megumi e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07
---	---

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 April 2011 (14.04.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/044180 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/435 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2010/051552
- (22) International Filing Date:
6 October 2010 (06.10.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/278,343 6 October 2009 (06.10.2009) US
12/897,857 5 October 2010 (05.10.2010) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US]; Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **JING, Ying** [CN/US]; c/o Bristol-Myers Squibb Company, 6000 Thompson Road, Building 22A 1st Floor, Syracuse, New York 13057 (US). **LI, Zhengjian** [US/US]; c/o Bristol-

Myers Squibb Company, 6000 Thompson Road, Building 22A 1st Floor, Syracuse, New York 13057 (US). **QIAN, Yueming** [US/US]; c/o Bristol-Myers Squibb Company, 6000 Thompson Road, Building 22A 1st Floor, Syracuse, New York 13057 (US).

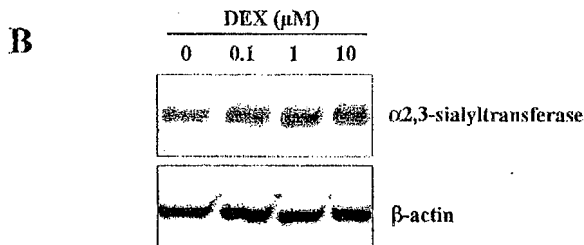
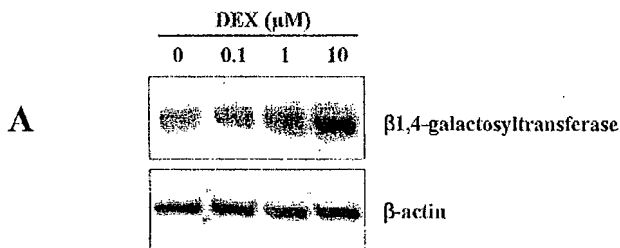
(74) Agents: **PARLET, Nickki, L.** et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS OF PRODUCTION OF GLYCOPROTEINS IN MAMMALIAN CELL CULTURES USING GLUCOCORTICOIDS



(57) Abstract: The present invention describes methods and processes for the production of proteins, particularly glycoproteins, by animal cell or mammalian cell culture, preferably, but not limited to, fed-batch cell cultures. In one aspect, the methods comprise the addition of glucocorticoid compound during the culturing period. The addition of glucocorticoid compound sustain a high viability of the cultured cells, and can yield an increased end titer of protein product, and a high quality of protein product, as determined, e.g., by sialic acid content of the produced protein.

WO 2011/044180 A1

ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

METHODS OF PRODUCTION OF GLYCOPROTEINS IN MAMMALIAN CELL CULTURES USING GLUCOCORTICOIDS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to new processes for culturing mammalian cells which produce a protein product, preferably a glycosylated protein product. Performance of the cell culturing processes result in high cell viability and can also result in high product quality and productivity, extension of the growth phase and reduction of death rate in the death phase.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Animal cell culture, notably mammalian cell culture, is preferably used for the expression of recombinantly produced, glycosylated proteins for therapeutic and/or prophylactic applications. Glycosylation patterns of recombinant glycoproteins are important, because the oligosaccharide side chains of glycoproteins affect protein function, as well as the intramolecular interactions between different regions of a protein. Such intramolecular interactions are involved in protein conformation and tertiary structure of the glycoprotein. (See, e.g., A. Wittwer et al., 1990, *Biochemistry*, 29:4175-4180; Hart, 1992, *Curr. Op. Cell Biol.*, 4:1017-1023; Goochee et al., 1991, *Bio/Technol.*, 9:1347-1355; and R.B. Parekh, 1991, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1:750-754). In addition, oligosaccharides may function to target a particular polypeptide to certain structures based on specific cellular carbohydrate receptors. (M.P. Bevilacqua et al., 1993, *J. Clin. Invest.*, 91:379-387; R.M. Nelson et al., 1993, *J. Clin. Invest.*, 91:1157-1166; K.E. Norgard et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1068-1072; and Y. Imai et al., 1993, *Nature*, 361:555-557).

The terminal sialic acid component of a glycoprotein oligosaccharide side chain is known to have an effect on numerous aspects and properties of a glycoprotein, including absorption, solubility, thermal stability, serum half life, clearance from the serum, as well as its physical and chemical structure/behavior and its immunogenicity. (A. Varki, 1993, *Glycobiology*, 3:97-100; R.B. Parekh, *Id.*, Goochee et al., *Id.*, J. Paulson et al., 1989, *TIBS*, 14:272-276; and A. Kobata, 1992, *Eur. J. Biochem.*, 209:483-501; E.Q.

Lawson et al., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.*, 220:572-575; and E. Tsuda et al., 1990, *Eur. J. Biochem.*, 188:405-411).

The amount of sialic acid in glycoproteins is affected by two opposite processes: the intracellular additions of sialic acid by sialyltransferase activity
5 and the extracellular removal of sialic acid by sialidase cleavage.

Intracellular addition of sialic acid is the last stage of the glycosylation process that takes place in the trans-Golgi. This involves the enzymatic transfer of sialic acid from the nucleotide sugar precursor, CMP-sialic acid to an available galactose on the emerging glycan structure that is attached to
10 the newly synthesized protein. Possible limitations to the process that might cause incomplete sialylation include the availability of CMP-sialic acid, the activity of the sialyltransferase enzyme, the amount of the galactose on the emerging glycan structure and the activity of the galactosyltransferase enzyme. Significant amount of research has been focusing on maximizing
15 sialylation through gene over-expression and enzyme activity enhancement of sialyltransferase and glycosyltransferase. Zhang et al. (*Biochim Biophys Acta* 1425(3):1998, 441-52) reported that expression of human α 2,6-sialyltransferase in CHO cells with tissue plasminogen activator (tPA) production enhances the α 2,6-sialylation of tPA. Weikert et al (*Nat Biotechnol*
20 17(11):1999, 1116-21) reported that coexpression of α 2,3-sialyltransferase and β 1,4-galactosyltransferase results in greater than 90% sialylation of TNK-tPA and TNFR-IgG. Moreover, supplementation with the proper amount of manganese (Mn^{2+}), a cofactor for β 1,4-galactosyltransferase, greatly reduced the amount of rHuEPO in the lower sialylated fraction, increased carbohydrate
25 site occupancy and narrowed carbohydrate branching (Zhang et al. 1998) to bi-antennary structures in these lower sialylated species (Crowell et al. *Biotechnol Bioeng* 96(3):538-49,2007).

The amount of sialic acid in glycoproteins is also affected by the extracellular removal of sialic acid by sialidase cleavage. Gramer and
30 Goochee (*Biotechnol Prog* 9(4):366-73,1993) have demonstrated an increase of lactate dehydrogenase (LDH), which signified an increase in the cell lysis, correlated with an increase of extracellular sialidase activity in CHO

perfusion cultures. Gu et al (Biotechnol Bioeng 55(2):390-8, 1997) also illustrate a remarkable loss of terminal sialic acids of interferon- γ (IFN- γ) along with decrease in CHO cell viability and concomitant increase of dead cells throughout long-term batch cultivation.

5 Consequently, It is essential to delay the onset of cell death and improve cell viability to reduce or avoid this degradation effect

 In general, protein expression levels in mammalian cell culture-based systems are considerably lower than in microbial expression systems, for example, bacterial or yeast expression systems. However, bacterial and
10 yeast cells are limited in their ability to optimally express high molecular weight protein products, to properly fold a protein having a complex steric structure, and/or to provide the necessary post-translational modifications to mature an expressed glycoprotein, thereby affecting the immunogenicity and clearance rate of the product.

15 As a consequence of the limitations of the culturing of animal or mammalian cells, particularly animal or mammalian cells which produce recombinant products, the manipulation of a variety of parameters has been investigated, including the employment of large-scale culture vessels; altering basic culture conditions, such as incubation temperature, dissolved oxygen
20 concentration, pH, and the like; the use of different types of media and additives to the media; and increasing the density of the cultured cells. In addition, process development for mammalian cell culture would benefit from advances in the ability to extend run times to increase final product concentration while maintaining high product quality. An important product
25 quality parameter is the degree and completeness of the glycosylation structure of a polypeptide product, with sialic acid content commonly used as a measure of glycoprotein quality.

 Run times of cell culture processes, particularly non-continuous processes, are usually limited by the remaining viability of the cells, which
30 typically declines over the course of the run. The maximum possible extension of high cell viabilities is therefore desired. Product quality concerns also offer a motivation for minimizing decreases in viable cell density and

maintaining high cell viability, as cell death can release sialidases to the culture supernatant, which may reduce the sialic acid content of the protein expressed. Protein purification concerns offer yet another motivation for minimizing decreases in viable cell density and maintaining high cell viability.

- 5 The presence of cell debris and the contents of dead cells in the culture can negatively impact on the ability to isolate and/or purify the protein product at the end of the culturing run. By keeping cells viable for a longer period of time in culture, there is thus a concomitant reduction in the contamination of the culture medium by cellular proteins and enzymes, e.g., cellular proteases and
- 10 sialidases that can cause degradation and ultimate reduction in quality of the desired glycoprotein produced by the cells.

- Various parameters have been investigated to achieve high cell viability in cell cultures. One parameter involved a single lowering of the culture temperature following initial culturing at 37°C (for example, Roessler et
- 15 al., 1996, *Enzyme and Microbial Technology*, 18:423-427; U.S. Patent Nos. 5,705,364 and 5,721,121 to T. Etcheverry et al., 1998; U.S. Patent No. 5,976,833 to K. Furukawa et al., 1999; U.S. Patent No. 5,851,800 to L. Adamson et al.; WO 99/61650 and WO 00/65070 to Genentech, Inc.; WO 00/36092 to Biogen, Inc.; and U.S. Patent No. 4,357,422 to Girard et al.).

- 20 Other parameters investigated involved the addition of components to the culture. The growth factor inhibitor suramin was shown to prevent apoptosis during exponential growth of CHO K1:CycE cells (Zhang et al., *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 319-325). However, suramin did not protect against apoptosis during the death phase. As a result, suramin was capable
- 25 of maintaining high viability during the growth phase, but did not allow for an extension of culture longevity. The same authors report that for the CHO 111-10PF cell line, dextran sulfate and polyvinyl sulfate could, similarly to suramin, increase day 3 viable cell density and viability relative to the control culture. The effect of dextran sulfate or polyvinyl sulfate during the death phase was
- 30 however not reported. Suramin, dextran sulfate and polyvinyl sulfate were also reported to be effective at preventing cell aggregation.

The effects of supplementing insect cell culture media with dexamethasone or N-acetylmannosamine on complex glycosylation of proteins, including the addition of terminal sialic acid residues to N-linked oligosaccharides, prepared via baculovirus expression vector system (BEVS) is disclosed in U. S. Patent No. 6,472,175 to Boyce Thompson Institute For Plant Research, Inc. (Ithaca, NY), 2002.

Protein therapeutics are inherently heterogeneous owing to their size, complexity of structure, and the nature of biological production (Chirino and Mire-Sluis, *Nat Biotechnol.* 2004; 22:1383-1391). Even in the "pure" protein solution, there will be some percentage of low molecular weight fragments, high molecular weight species, and various degrees of chemical modifications. The formation of high molecular weight species is usually due to protein aggregation, which is a common issue encountered during manufacture of biologics. Typically, the presence of aggregates is considered to be undesirable because of the concern that the aggregates may lead to an immunogenic reaction or may cause adverse events on administration (Cromwell et al, *AAPS J.* 2006; 8:E572-579). Although some types of aggregates of biologics may function normally, it is still important to maintain consistency in product quality since product consistency is a prerequisite for regulatory approval.

Aggregates of proteins may arise from several mechanisms and occur at each stage during the manufacturing process. In cell culture, secreted proteins may be exposed to the conditions that are unfavorable for protein stability; but more often, accumulation of high amounts of protein may lead to intracellular aggregation owing to either the interactions of unfolded protein molecules or to inefficient recognition of the nascent peptide chain by molecular chaperones responsible for proper folding (Cromwell et al, *AAPS J.* 2006; 8:E572-579). In the endoplasmic reticulum (ER) of cells, disulfide bond of newly synthesized protein is formed in an oxidative environment. Under normal condition, protein sulfhydryls are reversibly oxidized to protein disulfides and sulfenic acids, but the more highly oxidized states such as the sulfinic and sulfonic acid forms of protein cysteines are irreversible (Thomas

and Mallis, *Exp Gerontol.* 2001; 36:1519-1526). Hyper-oxidized proteins may contain incorrect disulfide bonds or have mixed disulfide bonds with other luminal ER proteins; in either case it leads to protein improper folding and aggregation. It is therefore crucial to maintain a properly controlled oxidative environment in the ER. In this regard, Cuozzo and Kaiser (*Nat Cell Biol.* 1999;1:130-135) initially demonstrated that in yeasts glutathione buffered against ER hyperoxidation and later on Chakravarthi and Bulleid (*J Biol Chem.* 2004; 279:39872-39879) confirmed that in mammalian cells glutathione was also required to regulate the formation of native disulfide bonds within proteins entering the secretory pathway.

With increasing product concentration in the culture, it can be observed in cell culture processes that the product quality decreases, as determined by the measured sialic acid content of the oligosaccharide glycostructure. Usually, a lower limit for an acceptable sialic acid content exists as determined by drug clearance studies. High abundance of a protein produced by cells in culture is optimally accompanied by high quality of the protein that is ultimately recovered for an intended use.

Recombinantly produced protein products that are properly glycosylated are increasingly becoming medically and clinically important for use as therapeutics, treatments and prophylactics. Therefore, the development of reliable cell culture processes that economically and efficiently achieve an increased final protein product concentration, in conjunction with a high level of product quality, such as is determined by sialic acid content, fulfills both a desired and needed goal in the art.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides new processes for the production of proteins, preferably recombinant protein products, more preferably glycoprotein products, by animal or mammalian cell cultures. These new processes achieve increased viable cell density at the late phase, cell viability, productivity and sialic acid content and decreased protein aggregation.

One aspect of this invention concerns the addition of glucocorticoid to the media. In this aspect, cell culture processes of this invention can

advantageously achieve an enhanced specific productivity, e.g., glycoprotein, as well as an enhanced sialic acid content of the glycoprotein produced by the cultured cells. More specifically, in accordance with this invention, addition of glucocorticoid during the cell culturing period sustains a high cell viability of the cells in the culture and can provide a high quantity and quality of produced product throughout an entire culture run. Also, according to one aspect of the invention, addition of glucocorticoid to the culturing processes can advantageously allow for an extension of the production phase of the culture. During the extended production phase, the titer of the desired product is increased; the product quality, as characterized by sialic acid content, is maintained at a high level; protein aggregation level is maintained at lower level and cell viability is also maintained at a high level. In addition, the extended production phase associated with the culturing processes of the invention allows for the production of product beyond that which is produced during a standard production phase.

In one particular aspect, the present invention provides a process (or method) in which the specific productivity is enhanced, the protein aggregation level was reduced and the sialic acid content of the produced glycoprotein is higher, by the addition of glucocorticoid. Glucocorticoid compound preferably is dexamethasone. In accordance with this particular aspect, the addition of glucocorticoid sustains a high cell viability of the culture, thereby enabling an extended production phase during which the titer of product, preferably recombinant product, is increased and the product quality, as characterized by sialic acid content, is maintained at high level. The addition of glucocorticoid can minimize the prevailing trade-off between protein titer and sialic acid content in the production of product during the cell culture process. Thus, the addition of glucocorticoid provides a positive effect on enhancing an important performance parameter of the culturing process, i.e., the mathematical product of "end (i.e., final) titer" x "end (i.e., final) sialic acid" X "monomer content" ("end titer x end sialic acid" x "end monomer content").

In one aspect of this invention, glucocorticoid compound is added to a culture at the time of inoculation or at a time after inoculation that is before the beginning of the initial death phase, or is during the initial growth phase, or is during the second half of the initial growth phase, or is on or about the end of the initial growth phase. In accordance with this aspect of the invention, the growth phase is extended and/or the onset of the death phase is delayed for a period of time, such as several days.

In another preferred aspect of this invention and as further described herein, the newly developed cell culture processes involving the addition of a glucocorticoid compound, are especially suitable for the production of soluble CTLA4 molecules and soluble CTLA4 mutant molecule, such as CTLA4Ig and L104EA29YIg, by host cells genetically engineered to express and produce these proteins. Preferred embodiments of the present invention encompass the culturing of cells producing CTLA4Ig and L104EA29YIg involving the addition of a glucocorticoid compound during the culturing run to achieve large amounts of high quality CTLA4Ig and L104EA29YIg products, as determined by sialic acid measurement and/or low protein aggregation of the final products.

Further aspects, features and advantages of the present invention will be appreciated upon a reading of the detailed description of the invention and a consideration of the drawings/figures.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS/FIGURES

Fig. 1 shows the expressions of β 1,4-galactosyltransferase (1A) and α 2,3-sialyltransferase (1B) generally increase with dexamethasone (DEX) concentration in the DEX treated CHO cells as described in Example 1. DEX was added on the 2nd day after inoculation to the cultures at concentrations from 0.1 to 10 μ M. On the fifth day after inoculation, cell samples were collected and whole cell lysates were prepared, separated on a 4-15% gradient gel and probed with the antibody for each glycotransferase. The blot was then reprobed with the beta-actin antibody to assess equal loading.

Fig. 2 shows the cell protective effect of DEX resulting in reduced sialidase activity in the culture supernatant as described in Example 1. Cell viability (2A) and absorbance of supernatant sialidase activity assay (2B) profiles along the culture period between DEX treated and untreated cultures.

5 DEX treatments at concentrations of 1 μ M were initiated on day 2. Values reflect the mean and standard deviation of data from five experiments.

Fig. 3 shows improvements in glycoprotein sialylation in the cultures treated with glucocorticoid analogs, hydrocortisone (HYC) and prednisolone (PRD) as described in Example 1. Normalized total sialic acid content (3A) and normalized N-linked sialylated species fraction (3B) of cultures treated with DEX, HYC and PRD, respectively. Treatment was initiated on the second day after inoculation in a concentration of 0.1, 1 and 10 μ M in the medium for each compound. Values of each parameter are reported as average $\pm$ difference/2 (n=2)

15 **Fig. 4** shows that the enhancement of sialylation by DEX was blocked by glucocorticoid antagonist RU-486 as described in Example 1. Normalized total sialic acid content (4A) and normalized N-linked sialylated species fraction (4B) in the presence and absence of RU-486. RU-486, at 0 or 1 μ M, was introduced into cell culture suspension 48 hours after inoculation. 0.1, 1 and 10 μ M of DEX was then added into the cultures 24 hours later. Values of each parameter are reported as average $\pm$ difference/2 (n=2).

Fig. 5 shows that fed-batch cultures of DEX treated CHO cells in 5-L bioreactors resulted in increased sialic acid content and sialylated species fractions as described in Example 1. Normalized total sialic acid content (5A) and normalized N-linked sialylated species fraction (5B) of untreated and treated cultures throughout the cultivations. Values of each parameter are reported as average $\pm$ standard deviation (n=3). The normalized value is the actual value divided by an arbitrary value.

Fig. 6 shows the capability of DEX to improve glycoprotein sialylation at 7, 10, and 20-L scale bioreactors as described in Example 1. Normalized final total sialic acid molar ratio versus normalized sialylated fraction of DEX

treated and untreated cultures from different runs are summarized. The normalized value is the actual value divided by an arbitrary value.

Fig. 7 shows the reduced percentage of high molecular weight (HMW) species in the IgG-fusion proteins produced by CHO cells treated with dexamethasone (DEX) as described in Example 2. 7A, all cells were initially cultured together in the same shake flask for two days and then divided into two groups, with half of them receiving a single dose of DEX at the final concentration of 1 μ M in basal medium. The supernatants were collected on Day 10 and purified before SEC-HPLC analysis to determine percentages of HMW species. Data points are means ($\pm$ S.D.) of the results from five shake flasks in a single experiment. $**P < 0.01$ as compared to the control (CON). 7B, DEX at various concentrations was added to the CHO cell cultures on day 2 and supernatants were collected on day 10. Data points are means of the results obtained from duplicate flasks. 7C, all the cultures were initiated at the same time, but 1 μ M DEX was added on different day, giving different incubation time as indicated, when the cells were harvested at the same time on day 10. Data points are means of the results from duplicate flasks.

Fig.8 shows the increased expression of glutathione reductase in the CHO cells treated with dexamethasone (DEX) as described in Example 2. DEX at various concentrations was added to the cell cultures on the inoculation day and cell samples were collected on day 5. Whole cell lysates were separated on a 4-15% gradient gel. After detection of glutathione reductase, the same blot was used to detect β -actin for sample loading comparison.

Fig. 9 shows the reduced percentage of HMW species in the IgG-fusion proteins incubated with GSH *in vitro* as described in Example 2. Reduced glutathione (GSH) at 0, 1 and 3 mM final concentrations was added to Tris-acetate buffered (pH 7.5) solution of purified IgG-fusion proteins, and the mixture of GSH and proteins was incubated at 37°C for 1 h before SEC-HPLC analysis. Data points are means ($\pm$ S.D.) of four determinations from two experiments. $*P < 0.05$ as compared to the control (0 mM GSH).

Fig. 10 shows the attenuated effects of dexamethasone (DEX) in the presence of glucocorticoid receptor antagonist RU-486 as described in Example 2. **10A**, whole cell lysates were prepared from untreated HepG-2 and CHO cells and separated on a 4-15% gradient gel. HepG-2 sample was used as human origin control for primary antibody validation purpose. **10B**, RU-486 at 1 μ M was introduced into the culture one day after the inoculation (day 1) and RU-486-pretreated CHO cells were divided on day 2, with half of them receiving a single dose of DEX at the final concentration of 0.1 μ M in basal medium. Cell samples were collected on day 10; all the other procedures were the same as those in Fig. 2. **10C**, RU-486 at 1 μ M was introduced into the cultures on day 1 and DEX was then added to RU-486-pretreated cultures at the final concentration of either 0.1 μ M or 1 μ M on day 2. Supernatants were collected on day 10. Data points are means of the results from duplicate flasks.

Fig. 11 shows that cell death is inhibited by DEX in cultures of CHO cells in serum free medium as described in Example 3. Dose-response curves of the effect of DEX on viable cell density (**11A**) and viability (**11B**) with treatments initiated on day 2. Time-course curves of the effect of DEX on viable cell density (**11C**) and viability (**11D**) with 1 μ M treatment concentration. Each value is the mean of data obtained from the experiments done in duplicate.

Fig. 12 shows CHO cell specific growth rate is reduced while cell specific productivity is increased by DEX as described in Example 3. The effects of DEX on CHO cell specific growth rate (**12A**), normalized volumetric productivity (**12B**) and normalized cell specific productivity (**12B**). DEX treatments were initiated on day 2. Values reflect the mean and standard deviation of data from five experiments. The normalized value is the actual value divided by an arbitrary value.

Fig. 13 shows the upregulation of anti-apoptotic gene GILZ in the DEX-treated CHO cells was confirmed by qRT-PCR and western blot analysis, as described in Example 3. (**13A**) DEX was added into the triplicate cultures on the 2nd day after inoculation in the final concentration of 0 and 1 μ M,

respectively. mRNA samples was extracted on 5th and 8th after inoculation. Values of each parameter are reported as average $\pm$ standard deviation (n=3). (13B) DEX was added into the triplicate cultures on the 2nd day after inoculation in the final concentration of 0, and 1 μ M, respectively. Cell
5 samples were collected and whole cell lysates were prepared on 5th and 8th after inoculation.

Fig.14 shows the death-suppression action of dexamethasone involves GILZ and glucocorticoid receptor, as described in Example 3 The percent increase (compared with no DEX treatment) of final viability (14A), the
10 fold change of GILZ gene expression (14B) and GILZ protein expression induced by DEX (14C) in the presence and absence of RU-486. RU-486, at 0 or 1 μ M, was introduced into cell culture suspension 48 hours after inoculation, 0, 0.1 and 1 μ M of DEX was then added into the cultures 24 hours later. Cells were collected for viability, qRT-PCR and western blotting
15 analysis. Each value reported in panel A is the mean of data obtained from the duplicate experiments. Each value reported in panel B is the mean and standard deviation of data obtained from the triplicate experiments.

Fig. 15 shows fed-batch cultures of DEX treated CHO cells in 10-L bioreactors result in an improved VCD, viability, titer and sialic acid molar ratio
20 as described in Example 3. Viable cell density (15A), viability (15B) and normalized titer (15C) profiles of untreated culture and treated cultures with DEX treatment initiated on day 2 and day 7. The normalized value is the actual value divided by an arbitrary value.

Fig. 16 shows the effects of DEX on the cell growth of CHO cell culture with CTLA4Ig secretion. Dose-response curves of the effect of DEX on viable
25 cell density (16A) and viability (16B) treated with DEX in the final concentration of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 μ M, respectively. Treatment was initiated on the second day after inoculation and each value is the mean of data obtained from the experiments done in duplicate.

30 **Fig. 17** shows the effects of DEX on sialic acid molar ratio and HMW level of CTLA4Ig. The figure shows final total sialic acid molar ratio (17A) and HMW species (17B) of cultures treated with DEX in the final concentration of

0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 μ M, respectively. Treatment was initiated on the second day after inoculation and each value is the mean of data obtained from the experiments done in duplicate. Values reported in panel A are normalized values, which are the actual value divided by an arbitrary value.

5 **Fig. 18** shows the feasibility of including DEX in the large scale recombinant glycoprotein production, as described in Example 5. The figure shows the viable cell density (18A), viability (18B), normalized titer(18C) and normalized sialic acid content (18D) of the recombinant glycoprotein produced at 7-L (n=16) and 500-L (n=6) and 5000-L (n=3) scales, respectively. Values
10 reflect the mean and standard deviation of data from multiple experiments at each scale. The normalized value is the actual value divided by an arbitrary value. The same divisor was utilized for normalization in all scales.

FIG. 19 depicts a nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) and encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of a CTLA4Ig having a signal peptide, a
15 wild type amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 to aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124, and an Ig region.

FIG.20 depicts a nucleotide sequence (SEQ ID NO:3) and encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:4) of a CTLA4 mutant molecule
20 (L104EA29YIg) having a signal peptide, a mutated extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 and ending at aspartic acid at position +124, and an Ig region.

FIG. 21 depicts the nucleic acid sequence (SEQ ID NO:5) and
25 encoded complete amino acid sequence (SEQ ID NO:6) of human CTLA4 receptor (referred to as "wild type" CTLA4 herein) fused to the oncostatin M signal peptide (position -26 to -2). (U.S. Patent Nos. 5,434,131 and 5,844,095).

30

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention describes new processes for the production of proteins, preferably recombinant protein products, more preferably glycoprotein products, in mammalian or animal cell culture. These processes achieve increased viable cell density, cell viability, productivity and sialic acid content and decreased protein aggregation.

In one embodiment, the invention is directed to a cell culturing process comprising: culturing host cells which express a protein of interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture.

Glucocorticoid compounds include, but are not limited to, hydrocortisone (available from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), prednisone (available from Sigma-Aldrich), prednisolone (available from Sigma-Aldrich), methylprednisolone (available from Sigma-Aldrich), dexamethasone (available from Sigma-Aldrich), betamethasone (available from Sigma-Aldrich), triamcinolone (available from Sigma-Aldrich), fludrocortisone acetate (available from Sigma-Aldrich). The compounds are readily available from the listed sources, or readily obtainable through means known to one of skill in the art.

Preferred glucocorticoid compounds include but not limited to hydrocortisone, prednisolone, betamethasone and dexamethasone. Most preferred is dexamethasone.

In one embodiment of the invention, glucocorticoid compound is added at inoculation or may be a component of the basal medium. Inoculation takes place on day 0.

In one embodiment of the invention, glucocorticoid compound is added at a time after inoculation, i.e. it is not present in the basal medium and not present at inoculation. Preferably, the glucocorticoid compound is added on day 1 of the culture or later

In accordance with the invention, glucocorticoid compound may be added to the cell culture one time, two times, three times, or any number of times during the specified time period. One or more glucocorticoid compounds may be used in conjunction. That is, any given single addition of a glucocorticoid compound may include the addition of one or more other

glucocorticoid compounds. Similarly, if there is more than one addition of a glucocorticoid compound, different glucocorticoid compounds may be added at the different additions. Additional compounds and substances, including glucocorticoid compounds, may be added to the culture before, with or after
5 the addition of glucocorticoid compound – either during or not during the specified time period. In a preferred embodiment, there is a single, i.e. one time, addition of glucocorticoid compound. In a preferred embodiment, one glucocorticoid compound is added.

In accordance with the invention, glucocorticoid compound may be
10 added to the cell culture by any means. Means of adding glucocorticoid compound include, but are not limited to, dissolved in DMSO, dissolved in organic solvent, dissolved in water, dissolved in culture medium, dissolved in feed medium, dissolved in a suitable medium, in the form in which it is obtained or any combination thereof.

15 Preferably, DEX is added as a solution where the DEX is dissolved in ethanol that is then diluted with water for further use (i.e. such as adding DEX to the feed medium).

In accordance with the invention, glucocorticoid compound is added to bring the concentration in the culture to an appropriate level. As non-limiting
20 examples, glucocorticoid compound is added to a concentration of 1nM – 1mM. Preferably glucocorticoid compound is added to a concentration of 1nM – 0.1 μ M or 0.1 μ M - 10 μ M; more preferably about 5nM - 15nM or 0.5 μ M - 5 μ M; more preferably about 10nM or 1 μ M target amounts.

In accordance with the invention, the culture may be run for any length
25 of time after addition of glucocorticoid compound. The culture run time may be determined by one of skill in the art, based on relevant factors such as the quantity and quality of recoverable protein, and the level of contaminating cellular species (e.g. proteins and DNA) in the supernatant resulting from cell lysis, which will complicate recovery of the protein of interest.

30 In particular embodiments of the cell culturing process and method of increasing cell viability of the invention, glucocorticoid compound is added at a time after inoculation that is before the beginning of the initial death phase.

Preferably, glucocorticoid compound is added at a time after inoculation that is during the initial growth phase. More preferably, glucocorticoid compound is added during the second half the initial growth phase. More preferably, glucocorticoid compound is added on or about the end of the initial growth
5 phase.

The initial growth phase refers to the growth phase that is observed in the absence of the specified addition of glucocorticoid compound. The initial death phase refers to the death phase that is observed in the absence of the specified addition of glucocorticoid compound.

10 The initial growth phase may end when the initial death phase begins, or there may be a stationary phase of any length between the initial growth phase and the initial death phase.

For example, in a cell culture in which the initial growth phase is from day 0 to day 6 and the initial death phase begins on day 7, in a particular
15 embodiment glucocorticoid compound is added at a time after inoculation and before day 7. In a specific embodiment, glucocorticoid compound is added after inoculation and by day 6. In a specific embodiment, glucocorticoid compound is added between days 1 and 6. In another specific embodiment, glucocorticoid compound is added with the feed medium on days 3-6. In other
20 specific embodiments, glucocorticoid compound is added on about day 2, or on day 2.

It has been found (see Example 3) that when carrying the present invention the viability of the cell culture is prolonged. A condition, such as addition of glucocorticoid compound, causes prolonged cell viability if cell
25 viability in the culture is higher for a period of time in the presence of the condition than in the absence of the condition.

Thus, in other embodiments, the invention is directed to (1) a cell culturing process, and (2) a method of prolonging cell viability in a culture comprising: culturing host cells which express a protein of interest; and adding
30 glucocorticoid compound to the cell culture; wherein the cell viability of the cell culture is prolonged.

It has been found (see Example 3), that when glucocorticoid compound is added at a time after inoculation and before the beginning of the initial death phase, the death rate of the death phase may be reduced, less than that of the death phase observed in the absence of the addition of
5 glucocorticoid compound.

Thus, in other embodiments, the invention is directed to (1) a cell culturing process, and (2) a process for reducing the death rate of the death phase of a cell culture comprising: culturing host cells which express a protein of interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture at a time
10 after inoculation that is before the beginning of the initial death phase; wherein the death rate of the death phase is reduced. In more particular embodiments, the invention is directed to (1) a cell culturing process, and (2) a process for reducing the death rate of the death phase of a cell culture comprising: culturing host cells which express a protein of interest; and adding
15 glucocorticoid compound to the cell culture at a time after inoculation that is during the initial growth phase; wherein the death rate of the death phase is delayed. In more particular embodiments the invention is directed to (1) a cell culturing process, and (2) a process for reducing the death rate of the death phase of a cell culture comprising: culturing host cells which express a protein
20 of interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture during the second half of the initial growth phase; wherein the death rate of the death phase is reduced. In other particular embodiments the invention is directed to a process for reducing the death rate of the death phase of a cell culture comprising: culturing host cells which express a protein of interest; and adding
25 glucocorticoid compound to the cell culture on or about the end of the initial growth phase; wherein the death rate of the death phase is delayed.

Example 3 also demonstrates that hydrocortisone (HYC), prednisolone (PRD) and dexamethasone (DEX) all show a dose-dependent cell protective effect in treated cell cultures when compared with untreated cell cultures.
30 However, higher concentrations of HYC and PRD was required to achieve the same level of cell protective effect, which is consistent with their potency differences (i.e. HYC and PRD are only 5% and 20% as potent as DEX)

Run times of cell culture processes, particularly non-continuous processes, are usually limited by the remaining viable cell density, which decreases during the death phase. Longer run times may allow higher product titers to be achieved. Product quality concerns also offer a motivation
5 for reducing death rate, as cell death can release sialidases to the culture supernatant, which may reduce the sialic acid content of the protein expressed. Protein purification concerns offer yet another motivation for delaying or arresting the death phase. The presence of cell debris and the contents of dead cells in the culture can negatively impact on the ability to
10 isolate and/or purify the protein product at the end of the culturing run.

It has been found (see Example 2), that addition of glucocorticoid compound to the cell culture reduces the aggregation of the proteins of interest.

Thus, in other embodiments, the invention is directed to (1) a cell
15 culturing process, and (2) a process for reducing the percentage of protein aggregation comprising: culturing host cells which express a protein of interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture; wherein the percentage of high molecular weight species is decreased.

It has been found (see Example 1), that addition of glucocorticoid
20 compound to the cell culture improves sialylation of the proteins of interest by enhancing total sialic acid content and increasing percentage of sialylated species.

Example 1 also demonstrates that hydrocortisone (HYC), prednisolone (PRD) and dexamethasone (DEX) all show a dose-dependent sialylation
25 improvement in treated cell cultures when compared with untreated cell cultures. However, a higher concentration of HYC and PRD was required to achieve the same level of improvement, which is consistent with their potency differences.

Thus, in other embodiments, the invention is directed to (1) a cell
30 culturing process, and (2) a process for increasing the percentage of sialylated species comprising: culturing host cells which express a protein of

interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture; wherein the percentage of sialylated species is increased.

Thus, in other embodiments, the invention is directed to (1) a cell culturing process, and (2) a process for increasing total sialic acid content comprising: culturing host cells which express a glycoprotein of interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture; wherein the total sialic acid content is increased.

Thus, in other embodiments, the invention is directed to (1) a cell culturing process, and (2) a process for reducing de-sialylation rate of glycoproteins in cell culture comprising: culturing host cells which express a glycoprotein of interest; and adding glucocorticoid compound to the cell culture; wherein the de-sialylation rate is decreased.

Techniques and procedures relating to glycoprotein purification and analysis

In the culturing methods encompassed by the present invention, the protein produced by the cells is typically collected, recovered, isolated, and/or purified, or substantially purified, as desired, at the end of the total cell culture period using isolation and purification methods as known and practiced in the art. Preferably, protein that is secreted from the cultured cells is isolated from the culture medium or supernatant; however, protein can also be recovered from the host cells, e.g., cell lysates, using methods that are known and practiced in the art, and as further described below.

The complex carbohydrate comprising the glycoprotein produced by the processes of this invention can be routinely analyzed, if desired, by conventional techniques of carbohydrate analysis. For example, techniques such as lectin blotting, well-known in the art, reveal proportions of terminal mannose, or other sugars such as galactose. Termination of mono-, bi-, tri-, or tetra-antennary oligosaccharide by sialic acids can be confirmed by release of sugars from the protein using anhydrous hydrazine or enzymatic methods and fractionation of oligosaccharides by ion-exchange chromatography, size exclusion chromatography, or other methods that are well-known in the art.

The pI of the glycoprotein can also be measured, before and after treatment with neuraminidase, to remove sialic acids. An increase in pI

following neuraminidase treatment indicates the presence of sialic acids on the glycoprotein. Carbohydrate structures typically occur on the expressed protein as N-linked or O-linked carbohydrates. The N-linked and O-linked carbohydrates differ primarily in their core structures. N-linked glycosylation refers to the attachment of the carbohydrate moiety via GlcNAc to an asparagine residue in the peptide chain. The N-linked carbohydrates all contain a common Man1-6(Man1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -R core structure, where R in this core structure represents an asparagine residue. The peptide sequence of the protein produced will contain an asparagine-X-serine, asparagine-X-threonine, and asparagine-X-cysteine, wherein X is any amino acid except proline.

In contrast, O-linked carbohydrates are characterized by a common core structure, which is GalNAc attached to the hydroxyl group of a threonine or serine. Of the N-linked and O-linked carbohydrates, the most important are the complex N- and O-linked carbohydrates. Such complex carbohydrates contain several antennary structures. The mono-, bi-, tri-, and tetra-, outer structures are important for the addition of terminal sialic acids. Such outer chain structures provide for additional sites for the specific sugars and linkages that comprise the carbohydrates of the protein products.

The resulting carbohydrates can be analyzed by any method known in the art. Several methods are known in the art for glycosylation analysis and are useful in the context of the present invention. These methods provide information regarding the identity and the composition of the oligosaccharide attached to the produced peptide. Methods for carbohydrate analysis useful in connection with the present invention include, but are not limited to, lectin chromatography; HPAEC-PAD, which uses high pH anion exchange chromatography to separate oligosaccharides based on charge; NMR; Mass spectrometry; HPLC; GPC; monosaccharide compositional analysis; and sequential enzymatic digestion.

In addition, methods for releasing oligosaccharides are known and practiced in the art. These methods include 1) enzymatic methods, which are commonly performed using peptide-N-glycosidase F/endo- β -galactosidase; 2)

β elimination methods, using a harsh alkaline environment to release mainly O-linked structures; and 3) chemical methods using anhydrous hydrazine to release both N-and O-linked oligosaccharides. Analysis can be performed using the following steps: 1. Dialysis of the sample against deionized water to remove all buffer salts, followed by lyophilization. 2. Release of intact oligosaccharide chains with anhydrous hydrazine. 3. Treatment of the intact oligosaccharide chains with anhydrous methanolic HCl to liberate individual monosaccharides as O-methyl derivatives. 4. N-acetylation of any primary amino groups. 5. Derivatization to yield per-O-trimethylsilyl methyl glycosides. 6. Separation of these derivatives by capillary gas-liquid chromatography (GLC) on a CP-SIL8 column. 7. Identification of individual glycoside derivatives by retention time from the GLC and mass spectroscopy, compared to known standards. 8. Quantification of individual derivatives by FID with an internal standard (13-O-methyl-D-glucose).

Neutral and amino sugars can be determined by high performance anion-exchange chromatography combined with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD Carbohydrate System; Dionex Corp.). For instance, sugars can be released by hydrolysis in 20% (v/v) trifluoroacetic acid at 100°C for 6 hours. Hydrolysates are then dried by lyophilization or with a Speed-Vac (Savant Instruments). Residues are then dissolved in 1% sodium acetate trihydrate solution and analyzed on an HPLC-AS6 column (as described by Anumula et al., 1991, *Anal. Biochem.*, 195:269-280).

Alternatively, immunoblot carbohydrate analysis can be performed. In this procedure protein-bound carbohydrates are detected using a commercial glycan detection system (Boehringer), which is based on the oxidative immunoblot procedure described by Haselbeck et al. (1993, *Glycoconjugate J.*, 7:63). The staining protocol recommended by the manufacturer is followed except that the protein is transferred to a polyvinylidene difluoride membrane instead of a nitrocellulose membrane and the blocking buffers contain 5% bovine serum albumin in 10 mM Tris buffer, pH 7.4, with 0.9% sodium chloride. Detection is carried out with anti-digoxigenin antibodies linked with an alkaline phosphate conjugate (Boehringer), 1:1000 dilution in Tris buffered

saline using the phosphatase substrates, 4-nitroblue tetrazolium chloride, 0.03% (w/v) and 5-bromo-4 chloro-3-indoyl-phosphate 0.03% (w/v) in 100 mM Tris buffer, pH 9.5, containing 100 mM sodium chloride and 50 mM magnesium chloride. The protein bands containing carbohydrate are usually
5 visualized in about 10 to 15 minutes.

Carbohydrate associated with protein can also be analyzed by digestion with peptide-N-glycosidase F. According to this procedure the residue is suspended in 14 μ L of a buffer containing 0.18% SDS, 18 mM beta-mercaptoethanol, 90 mM phosphate, 3.6 mM EDTA, at pH 8.6, and heated at
10 100°C for 3 minutes. After cooling to room temperature, the sample is divided into two equal parts. One part, which is not treated further, serves as a control. The other part is adjusted to about 1% NP-40 detergent followed by the addition of 0.2 units of peptide-N-glycosidase F (Boehringer). Both samples are warmed at 37°C for 2 hours and then analyzed by SDS-
15 polyacrylamide gel electrophoresis.

In addition, the sialic acid content of the glycoprotein product is assessed by conventional methods. For example, sialic acid can be separately determined by a direct colorimetric method (Yao et al., 1989, *Anal. Biochem.*, 179:332-335), preferably using triplicate samples. Another method
20 of sialic acid determination involves the use of thiobarbaturic acid (TBA), as described by Warren et al. (1959, *J. Biol. Chem.*, 234:1971-1975). Yet another method involves high performance chromatography, such as described by H.K. Ogawa et al. (1993, *J. Chromatography*, 612:145-149).

Illustratively, for glycoprotein recovery, isolation and/or purification, the
25 cell culture medium or cell lysate is centrifuged to remove particulate cells and cell debris. The desired polypeptide product is isolated or purified away from contaminating soluble proteins and polypeptides by suitable purification techniques. The following procedures provide exemplary, yet nonlimiting purification methods for proteins: separation or fractionation on
30 immunoaffinity or ion-exchange columns; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on a resin, such as silica, or cation exchange resin, e.g., DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation;

gel filtration using, e.g., Sephadex G-75, Sepharose; protein A sepharose chromatography for removal of immunoglobulin contaminants; and the like. Other additives, such as protease inhibitors (e.g., PMSF or proteinase K) can be used to inhibit proteolytic degradation during purification. It will be

5 understood by the skilled practitioner that purification methods for a given polypeptide of interest may require modifications which allow for changes in the polypeptide expressed recombinantly in cell culture. Those purification procedures that can select for carbohydrates and enrich for sialic acid are particularly preferred, e.g., ion-exchange soft gel chromatography, or HPLC

10 using cation- or anion-exchange resins, in which the more acidic fraction(s) is/are collected.

Cells, proteins and cell cultures

In the cell culture processes or methods of this invention, the cells can

15 be maintained in a variety of cell culture media. i.e., basal culture media, as conventionally known in the art. For example, the methods are applicable for use with large volumes of cells maintained in cell culture medium, which can be supplemented with nutrients and the like. Typically, "cell culturing medium" (also called "culture medium") is a term that is understood by the practitioner

20 in the art and is known to refer to a nutrient solution in which cells, preferably animal or mammalian cells, are grown and which generally provides at least one or more components from the following: an energy source (usually in the form of a carbohydrate such as glucose); all essential amino acids, and generally the twenty basic amino acids, plus cysteine; vitamins and/or other

25 organic compounds typically required at low concentrations; lipids or free fatty acids, e.g., linoleic acid; and trace elements, e.g., inorganic compounds or naturally occurring elements that are typically required at very low concentrations, usually in the micromolar range. Cell culture medium can also be supplemented to contain a variety of optional components, such as

30 hormones and other growth factors, e.g., insulin, transferrin, epidermal growth factor, serum, and the like; salts, e.g., calcium, magnesium and phosphate, and buffers, e.g., HEPES; nucleosides and bases, e.g., adenosine, thymidine,

hypoxanthine; and protein and tissue hydrolysates, e.g., hydrolyzed animal protein (peptone or peptone mixtures, which can be obtained from animal byproducts, purified gelatin or plant material); antibiotics, e.g., gentamycin; and cell protective agents, e.g., a Pluronic polyol (Pluronic F68). Preferred is
5 a cell nutrition medium that is serum-free and free of products or ingredients of animal origin.

As is appreciated by the practitioner, animal or mammalian cells are cultured in a medium suitable for the particular cells being cultured and which can be determined by the person of skill in the art without undue
10 experimentation. Commercially available media can be utilized and include, for example, Minimal Essential Medium (MEM, Sigma, St. Louis, MO); Ham's F10 Medium (Sigma); Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma); RPMI-1640 Medium (Sigma); HyClone cell culture medium (HyClone, Logan, UT); and chemically-defined (CD) media, which are formulated for particular
15 cell types, e.g., CD-CHO Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA). To the foregoing exemplary media can be added the above-described supplementary components or ingredients, including optional components, in appropriate concentrations or amounts, as necessary or desired, and as would be known and practiced by those having in the art using routine skill.

20 In addition, cell culture conditions suitable for the methods of the present invention are those that are typically employed and known for batch, fed-batch, or continuous culturing of cells, with attention paid to pH, e.g., about 6.5 to about 7.5; dissolved oxygen (O₂), e.g., between about 5-90% of air saturation and carbon dioxide (CO₂), agitation and humidity, in addition to
25 temperature. As an illustrative, yet nonlimiting, example, a suitable cell culturing medium for the fed-batch processes of the present invention comprises a modified CD-CHO Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA). A feeding medium can also be employed, such as modified eRDF medium (Invitrogen, Carlsbad, CA). Preferred is a feeding medium also containing glucocorticoid,
30 e.g. dexamethasone.

Animal cells, mammalian cells, cultured cells, animal or mammalian host cells, host cells, recombinant cells, recombinant host cells, and the like,

are all terms for the cells that can be cultured according to the processes of this invention. Such cells are typically cell lines obtained or derived from mammals and are able to grow and survive when placed in either monolayer culture or suspension culture in medium containing appropriate nutrients and/or growth factors. Growth factors and nutrients that are necessary for the growth and maintenance of particular cell cultures are able to be readily determined empirically by those having skill in the pertinent art, such as is described, for example, by Barnes and Sato, (1980, *Cell*, 22:649); in *Mammalian Cell Culture*, Ed. J.P. Mather, Plenum Press, NY, 1984; and in U.S. Patent No. 5,721,121.

Numerous types of cells can be cultured according to the methods of the present invention. The cells are typically animal or mammalian cells that can express and secrete, or that can be molecularly engineered to express and secrete, large quantities of a particular protein, more particularly, a glycoprotein of interest, into the culture medium. It will be understood that the glycoprotein produced by a host cell can be endogenous or homologous to the host cell. Alternatively, and preferably, the glycoprotein is heterologous, i.e., foreign, to the host cell, for example, a human glycoprotein produced and secreted by a Chinese hamster ovary (CHO) host cell. Also preferably, mammalian glycoproteins, i.e., those originally obtained or derived from a mammalian organism, are attained by the methods the present invention and are preferably secreted by the cells into the culture medium.

Examples of mammalian glycoproteins that can be advantageously produced by the methods of this invention include, without limitation, cytokines, cytokine receptors, growth factors (e.g., EGF, HER-2, FGF- α , FGF- β , TGF- α , TGF- β , PDGF, IGF-1, IGF-2, NGF, NGF- β); growth factor receptors, including fusion or chimeric proteins. Other nonlimiting examples include growth hormones (e.g., human growth hormone, bovine growth hormone); insulin (e.g., insulin A chain and insulin B chain), proinsulin; erythropoietin (EPO); colony stimulating factors (e.g., G-CSF, GM-CSF, M-CSF); interleukins (e.g., IL-1 through IL-12); vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGF-R); interferons (e.g., IFN- α , β , or γ); tumor

necrosis factor (e.g., TNF- α and TNF- β) and their receptors, TNFR-1 and TNFR-2; thrombopoietin (TPO); thrombin; brain natriuretic peptide (BNP); clotting factors (e.g., Factor VIII, Factor IX, von Willebrands factor, and the like); anti-clotting factors; tissue plasminogen activator (TPA), e.g., urokinase
 5 or human urine or tissue type TPA; follicle stimulating hormone (FSH); luteinizing hormone (LH); calcitonin; CD proteins (e.g., CD3, CD4, CD8, CD28, CD19, etc.); CTLA proteins (e.g., CTLA4); T-cell and B-cell receptor proteins; bone morphogenic proteins (BNPs, e.g., BMP-1, BMP-2, BMP-3, etc.); neurotrophic factors, e.g., bone derived neurotrophic factor (BDNF);
 10 neurotrophins, e.g., 3-6; renin; rheumatoid factor; RANTES; albumin; relaxin; macrophage inhibitory protein (e.g., MIP-1, MIP-2); viral proteins or antigens; surface membrane proteins; ion channel proteins; enzymes; regulatory proteins; antibodies; immunomodulatory proteins, (e.g., HLA, MHC, the B7 family); homing receptors; transport proteins; superoxide dismutase (SOD);
 15 G-protein coupled receptor proteins (GPCRs); neuromodulatory proteins; Alzheimer's Disease associated proteins and peptides, (e.g., A-beta), and others as known in the art. Fusion proteins and polypeptides, chimeric proteins and polypeptides, as well as fragments or portions, or mutants, variants, or analogues of any of the aforementioned proteins and polypeptides
 20 are also included among the suitable proteins, polypeptides and peptides that can be produced by the methods of the present invention.

Nonlimiting examples of animal or mammalian host cells suitable for harboring, expressing, and producing proteins for subsequent isolation and/or purification include Chinese hamster ovary cells (CHO), such as CHO-K1
 25 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; and Kolkekar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909), CHO-K1 Tet-On cell line (Clontech), CHO designated ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clone 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clone B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designated ECACC 93061607 (CAMR,
 30 Salisbury, Wiltshire, UK), RR-CHOK1 designated ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), dihydrofolate reductase negative CHO cells (CHO/-DHFR, Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216), and

dp12.CHO cells (U.S. Patent No. 5,721,121); monkey kidney CV1 cells transformed by SV40 (COS cells, COS-7, ATCC CRL-1651); human embryonic kidney cells (e.g., 293 cells, or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); baby hamster
5 kidney cells (BHK, ATCC CCL-10); monkey kidney cells (CV1, ATCC CCL-70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); mouse sertoli cells (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL-2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL-34); human lung cells (W138, ATCC CCL-
10 75); human hepatoma cells (HEP-G2, HB 8065); mouse mammary tumor cells (MMT 060562, ATCC CCL-51); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL-1442); TRI cells (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); MCR 5 cells; FS4 cells. Preferred are CHO cells, particularly, CHO/-DHFR cells.

The cells suitable for culturing in the methods and processes of the
15 present invention can contain introduced, e.g., via transformation, transfection, infection, or injection, expression vectors (constructs), such as plasmids and the like, that harbor coding sequences, or portions thereof, encoding the proteins for expression and production in the culturing process. Such expression vectors contain the necessary elements for the transcription
20 and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to and practiced by those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding the produced proteins and polypeptides, as well as the appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA
25 techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described in J. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. and in F.M. Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

30 Control elements, or regulatory sequences, are those non-translated regions of the vector, e.g., enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions, that interact with host cellular proteins to carry out transcription and

translation. Such elements can vary in their strength and specificity.

Depending on the vector system and host cell utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. In mammalian cell systems, promoters from
5 mammalian genes or from mammalian viruses are preferred. The constructs for use in protein expression systems are designed to contain at least one promoter, an enhancer sequence (optional, for mammalian expression systems), and other sequences as necessary or required for proper transcription and regulation of gene expression (e.g., transcriptional initiation
10 and termination sequences, origin of replication sites, polyadenylation sequences, e.g., the Bovine Growth Hormone (BGH) poly A sequence).

As will be appreciated by those skilled in the art, the selection of the appropriate vector, e.g., plasmid, components for proper transcription, expression, and isolation of proteins produced in eukaryotic (e.g.,
15 mammalian) expression systems is known and routinely determined and practiced by those having skill in the art. The expression of proteins by the cells cultured in accordance with the methods of this invention can be placed under the control of promoters such as viral promoters, e.g., cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV), phosphoglycerol kinase (PGK), thymidine
20 kinase (TK), or the α -actin promoter. Further, regulated promoters confer inducibility by particular compounds or molecules, e.g., the glucocorticoid response element (GRE) of mouse mammary tumor virus (MMTV) is induced by glucocorticoids (V. Chandler et al., 1983, *Cell*, 33:489-499). Also, tissue-specific promoters or regulatory elements can be used (G. Swift et al., 1984,
25 *Cell*, 38:639-646), if necessary or desired.

Expression constructs can be introduced into cells by a variety of gene transfer methods known to those skilled in the art, for example, conventional gene transfection methods, such as calcium phosphate co-precipitation, liposomal transfection, microinjection, electroporation, and infection or viral
30 transduction. The choice of the method is within the competence of the skilled practitioner in the art. It will be apparent to those skilled in the art that one or more constructs carrying DNA sequences for expression in cells can

be transfected into the cells such that expression products are subsequently produced in and/or obtained from the cells.

In a particular aspect, mammalian expression systems containing appropriate control and regulatory sequences are preferred for use in protein
5 expressing mammalian cells of the present invention. Commonly used eukaryotic control sequences for use in mammalian expression vectors include promoters and control sequences compatible with mammalian cells such as, for example, the cytomegalovirus (CMV) promoter (CDM8 vector) and avian sarcoma virus (ASV), (π LN). Other commonly used promoters
10 include the early and late promoters from Simian Virus 40 (SV40) (Fiers et al., 1973, *Nature*, 273:113), or other viral promoters such as those derived from polyoma, Adenovirus 2, and bovine papilloma virus. An inducible promoter, such as hMTII (Karin et al., 1982, *Nature*, 299:797-802) can also be used.

Examples of expression vectors suitable for eukaryotic host cells
15 include, but are not limited to, vectors for mammalian host cells (e.g., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, pCMV vectors, pSG5 vectors (Stratagene), retroviral vectors (e.g., pFB vectors (Stratagene)), pcDNA-3 (Invitrogen), adenoviral vectors; Adeno-associated virus vectors,
20 baculovirus vectors, yeast vectors (e.g., pESC vectors (Stratagene)), or modified forms of any of the foregoing. Vectors can also contain enhancer sequences upstream or downstream of promoter region sequences for optimizing gene expression.

A selectable marker can also be used in a recombinant vector (e.g., a
25 plasmid) to confer resistance to the cells harboring (preferably, having stably integrated) the vector to allow their selection in appropriate selection medium. A number of selection systems can be used, including but not limited to, the Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HSV TK), (Wigler et al., 1977, *Cell*, 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT),
30 (Szybalska and Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy et al., 1980, *Cell*, 22:817) genes, which can be employed in tk-, hgprt-, or aprt- cells (APRT), respectively.

Anti-metabolite resistance can also be used as the basis of selection for the following nonlimiting examples of marker genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357; and O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan and Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G418 (*Clinical Pharmacy*, 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy*, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science*, 260:926-932; Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-21; May, 1993, *TIB TECH*, 11(5):155-215; and hygromycin (Santerre et al., 1984, *Gene*, 30:147). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology can be routinely applied to select the desired recombinant cell clones, and such methods are described, for example, in Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981. *J. Mol. Biol.*, 150:1, which are incorporated by reference herein in their entireties.

In addition, the expression levels of an expressed protein molecule can be increased by vector amplification (for a review, see Bebbington and Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning", Vol. 3, Academic Press, New York, 1987). When a marker in the vector system expressing a protein is amplifiable, an increase in the level of inhibitor present in the host cell culture will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the protein-encoding gene, production of the protein will concomitantly increase (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.*, 3:257).

Vectors which harbor glutamine synthase (GS) or dihydrofolate reductase (DHFR) encoding nucleic acid as the selectable markers can be

amplified in the presence of the drugs methionine sulfoximine or methotrexate, respectively. An advantage of glutamine synthase based vectors is the availability of cell lines (e.g., the murine myeloma cell line, NSO) which are glutamine synthase negative. Glutamine synthase
5 expression systems can also function in glutamine synthase expressing cells (e.g., CHO cells) by providing additional inhibitor to prevent the functioning of the endogenous gene.

Vectors that express DHFR as the selectable marker include, but are not limited to, the pSV2-dhfr plasmid (Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1:854
10 (1981). Vectors that express glutamine synthase as the selectable marker include, but are not limited to, the pEE6 expression vector described in Stephens and Cockett, 1989, *Nucl. Acids. Res.*, 17:7110. A glutamine synthase expression system and components thereof are detailed in PCT publications: W087/04462; W086/05807; W089/01036; W089/10404; and
15 W091/06657 which are incorporated by reference herein in their entireties. In addition, glutamine synthase expression vectors that can be used in accordance with the present invention are commercially available from suppliers, including, for example, Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH).

In a particular embodiment, a nucleic acid sequence encoding a
20 soluble CTLA4 molecule or a soluble CTLA4 mutant molecule can be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in a eukaryotic host. The regulatory elements of the vector can vary according to the particular eukaryotic host. Vectors which express the soluble CTLA4 or soluble CTLA4 mutant in eukaryotic host cells can include enhancer sequences for optimizing
25 protein expression.

Types of cell cultures

For the purposes of understanding, yet without limitation, it will be appreciated by the skilled practitioner that cell cultures and culturing runs for
30 protein production can include three general types; namely, continuous culture, batch culture and fed-batch culture. In a continuous culture, for example, fresh culture medium supplement (i.e., feeding medium) is provided

to the cells during the culturing period, while old culture medium is removed daily and the product is harvested, for example, daily or continuously. In continuous culture, feeding medium can be added daily and can be added continuously, i.e., as a drip or infusion. For continuous culturing, the cells can
5 remain in culture as long as is desired, so long as the cells remain alive and the environmental and culturing conditions are maintained.

In batch culture, cells are initially cultured in medium and this medium is neither removed, replaced, nor supplemented, i.e., the cells are not "fed" with new medium, during or before the end of the culturing run. The desired
10 product is harvested at the end of the culturing run.

For fed-batch cultures, the culturing run time is increased by supplementing the culture medium one or more times daily (or continuously) with fresh medium during the run, i.e., the cells are "fed" with new medium ("feeding medium") during the culturing period. Fed-batch cultures can
15 include various feeding regimens and times, for example, daily, every other day, every two days, etc., more than once per day, or less than once per day, and so on. Further, fed-batch cultures can be fed continuously with feeding medium.

The desired product is then harvested at the end of the
20 culturing/production run. The present invention preferably embraces fed-batch cell cultures in which a glucocorticoid compound is added at a time after inoculation.

According to the present invention, cell culture can be carried out, and glycoproteins can be produced by cells, under conditions for the large or small
25 scale production of proteins, using culture vessels and/or culture apparatuses that are conventionally employed for animal or mammalian cell culture. As is appreciated by those having skill in the art, tissue culture dishes, T-flasks and spinner flasks are typically used on a laboratory scale. For culturing on a larger scale, (e.g., 500 L, 5000 L, and the like, for example, as described in
30 commonly-assigned U.S. Patent No. 7,541,164, U.S. Patent No. 7,332,303, and U.S. Application Serial No. 12/086786, filed December 19, 2006, the contents of which are incorporated by reference herein in their entirety)

procedures including, but not limited to, a fluidized bed bioreactor, a hollow fiber bioreactor, roller bottle culture, or stirred tank bioreactor systems can be used. Microcarriers may or may not be used with the roller bottle or stirred tank bioreactor systems. The systems can be operated in a batch, 5 continuous, or fed-batch mode. In addition, the culture apparatus or system may or may not be equipped with a cell separator using filters, gravity, centrifugal force, and the like.

Phases of cell culture and associated parameters

10 The term "inoculation" refers to the addition of cells to starting medium to begin the culture.

The "growth phase" of a culture is the phase during which the viable cell density at any time point is higher than at any previous time point.

The "stationary phase" of a culture is the phase during which the viable 15 cell density is approximately constant (i.e. within measuring error) over a time period of any length.

The "death phase" of a culture is the phase that comes after the growth phase or after the growth phase and the stationary phase, and during which the viable cell density at any time point is lower than at any previous time 20 point during that phase.

In a "growth-associated" culture process, such as cases where a glucocorticoid compound causes an extended growth phase, the production phase may start during the extended growth phase.

In a "non-growth" associated culture process, the production phase of 25 cell culture may be the stationary phase.

Preferably, the culture medium is supplemented ("fed") during the production phase to support continued protein production, particularly in an extended production phase, and to attain ample quantities of high quality glycoprotein product (as exemplified and/or determined by a high level of end 30 sialic acid content upon protein recovery). Feeding can occur on a daily basis, or according to other schedules to support cell viability and protein production.

The culturing process according to the present invention may result in more viable cell survival until the end of the culturing period. Accordingly, in some embodiments, the more cells that survive, the more cells that are producing the desired product. This, in turn, results in a greater accumulated amount of the product at the end of the culturing process, with the rate of protein production by individual cells, i.e., cell specific productivity, remaining the same. Cell specific productivity or cell specific rate, as known in the art, typically refers to the specific expression rate of product produced per cell, or per measure of cell mass or volume. Cell specific productivity is measured in grams of protein produced per cell per day, for example, and can be measured according to an integral method involving the following formulae:

$$dP/dt = q_p X, \text{ or}$$

$$P = q_p \int_0^t X dt$$

15

where q_p is the cell specific productivity constant; X is the number of cells or cell volume, or cell mass equivalents; and dP/dt is the rate of protein production. Thus, q_p can be obtained from a plot of product concentration versus time integral of viable cells ($\int_0^t X dt$ "viable cell days"). According to this formula, when the amount of glycoprotein product produced is plotted against the viable cell days, the slope is equivalent to the cell specific rate. Viable cells can be determined by several measures, for example, biomass, O_2 uptake rate, lactase dehydrogenase (LDH), packed cell volume or turbidity. (e.g., U.S. Patent No. 5,705,364 to T. Etcheverry et al.)

25 Production of soluble CTLA4 molecules and soluble CTLA4 mutant molecules by the culturing methods of the present invention

In other embodiments encompassed by the present invention, the cell culture methods of the invention are utilized to produce a soluble CTLA4 molecule or a soluble CTLA4 mutant molecule, as described below. A soluble CTLA4 molecule is preferably a CTLA4 fusion protein, preferably a CTLA4Ig. More preferred is CTLA4Ig that comprises amino acids -1 to 357 or +1 to 357 as shown in FIG. 19. A soluble CTLA4 mutant molecule is preferably

30

L104EA29YIg that comprises amino acids -1 to 357 or +1 to 357 as shown in FIG. 20. The cell culture methods involving extended production phases for protein product are especially suitable for generating high quality and large amounts of soluble CTLA4 molecules and soluble CTLA4 mutant molecules,
5 by their host cells in culture.

In a preferred embodiment, CTLA4Ig is produced by recombinantly engineered host cells. The CTLA4Ig fusion protein can be recombinantly produced by CHO cells transfected with a vector containing the DNA sequence encoding CTLA4Ig. (See, U.S. Patent No. 5,844,095 to P.S.
10 Linsley et al). The CTLA4Ig fusion protein is produced in high quantity and is appropriately sialylated when cultured in accordance with the processes of this invention. The invention affords the production of high levels of recoverable protein product, e.g., sialylated CTLA4Ig protein product. In another preferred embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecule
15 L104EA29YIg that comprises amino acids -1 to 357 or +1 to 357 as shown in FIG. 20 is produced by the cell culture methods of the present invention.

A ligand for CTLA4 is a B7 molecule. As used herein, "ligand" refers to a molecule that specifically recognizes and binds another molecule. The interaction of a molecule and its ligand can be regulated by the products of
20 the culturing processes of this invention. For example, CTLA4 interaction with its ligand B7 can be blocked by the administration of CTLA4Ig molecules. As other examples, the interaction of Tumor Necrosis Factor (TNF) with its ligand, TNF receptor (TNFR), can be blocked by administration of etanercept or other TNF/TNFR blocking molecules.

25 Wild type CTLA4 or "non-mutated CTLA4" has the amino acid sequence of naturally occurring, full length CTLA4 as shown in FIG. 20 (and also as described in U.S. Patent Nos. 5,434,131, 5,844,095, and 5,851,795, incorporated herein by reference in their entirety), or any portion thereof that recognizes and binds a B7 molecule, or interferes with a B7 molecule, so that
30 binding to CD28 and/or CTLA4 (e.g., endogenous CD28 and/or CTLA4) is blocked. Wild type CTLA4 comprises particular portions, including, for example, the extracellular domain of wild type CTLA4 beginning with

methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124, or the extracellular domain of wild type CTLA4 beginning with alanine at position -1 and ending at aspartic acid at position +124 as shown in FIG. 21.

5 The naturally occurring wild type CTLA4 is a cell surface protein having an N-terminal extracellular domain, a transmembrane domain, and a C-terminal cytoplasmic domain. The extracellular domain binds to a target molecule, such as a B7 molecule. In a cell, the naturally occurring, wild type CTLA4 protein is translated as an immature polypeptide, which includes a signal peptide at the amino, or N-terminal, end. The immature polypeptide
10 undergoes post-translational processing, which includes cleavage and removal of the signal peptide to generate a CTLA4 cleavage product having a newly generated N-terminal end that differs from the N-terminal end in the immature form. One skilled in the art will appreciate that additional post-translational processing may occur, which removes one or more of the amino
15 acids from the newly generated N-terminal end of the CTLA4 cleavage product. The mature CTLA4 protein may start at methionine at position +1 or alanine at position -1. The mature form of the CTLA4 molecule includes the extracellular domain or any portion thereof, which binds to B7.

A CTLA4 mutant molecule, as used herein, refers to a molecule
20 comprising wild type CTLA4 as shown in FIG. 21, or any portion or derivative thereof that has a mutation, or multiple mutations, in the wild type CTLA4 sequence, preferably in the extracellular domain of wild type CTLA4, and binds B7. A CTLA4 mutant molecule has a sequence that it is similar, but not identical, to the sequence of wild type CTLA4 molecule, but still binds B7.
25 The mutations can include one or more amino acid residues substituted with an amino acid having conservative (e.g., a leucine substituted for an isoleucine) or non-conservative (e.g., a glycine substituted with a tryptophan) structure or chemical properties, amino acid deletions, additions, frameshifts, or truncations.

CTLA4 mutant molecules can include a non-CTLA4 molecule therein or
30 attached thereto, i.e., CTLA4 mutant fusion proteins. The mutant molecules can be soluble (i.e., circulating) or they can be bound to a cell surface (membrane-bound). CTLA4 mutant molecules include L104EA29Ylg and

those described in U.S. Application Serial Numbers 60/214,065 and 60/287,576; in WO 01/92337 A2; in U.S. Patent Numbers 6,090,914, 5,844,095, 7,094,874 and 5,773,253; and as described in R.J. Peach et al., 1994, *J Exp Med*, 180:2049-2058.) CTLA4 mutant molecules can be
5 synthetically or recombinantly produced.

CTLA4Ig is a soluble fusion protein comprising an extracellular domain of wild type CTLA4, or a portion thereof that binds B7, joined to an immunoglobulin (Ig) molecule, or a portion thereof. The extracellular domain of CTLA4 or portion thereof is joined to an Ig moiety comprising all or a
10 portion of an immunoglobulin molecule, preferably all or a portion of an immunoglobulin constant region such as all or a portion of IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) or IgC ϵ (IgC ϵ), rendering the fusion molecule soluble. The Ig
15 moiety can include the hinge, CH2 and CH3 domains, or the CH1, hinge, CH2 and CH3 domains, of the aforementioned constant regions or other constant regions. Preferably, the Ig moiety is human or monkey and comprises the hinge, CH2 and CH3 domains. Most preferably the Ig moiety comprises the hinge, CH2 and CH3 domains of human IgC γ 1, or consists of the hinge, CH2
20 and CH3 domains of human IgC γ 1. In an Ig moiety of CTLA4Ig, the Ig constant region or portion thereof can be mutated, thus resulting in a reduction of its effector functions (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,637,481, 5,844,095 and 5,434,131). As used herein, the terms Ig moiety, Ig constant region, Ig C(constant) domain, IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2),
25 IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) or IgC ϵ (IgC ϵ), include both native sequences and sequences that have been mutated, such as, for example, sequences having mutations in the constant region that reduce effector function.

30 A particular embodiment related to CTLA4 comprises the extracellular domain of wild type CTLA4 starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 to aspartic

acid at position +124; a junction amino acid residue glutamine at position +125; and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357, as shown in FIG. 19. DNA encoding this CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991, in the American Type Culture
5 Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, under the provisions of the Budapest Treaty, and has been accorded ATCC accession number ATCC 68629; P. Linsley et al., 1994, *Immunity* 1:793-80. A CHO cell line expressing CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 in ATCC under identification number CRL-10762. The soluble CTLA4Ig molecules
10 produced according to the methods described herein may or may not include a signal (leader) peptide sequence. FIGS. 19 and 20 include an illustration of a signal (leader) peptide sequence. Typically, the molecules do not include a signal peptide sequence.

L104EA29YIg is a fusion protein that is a soluble CTLA4 mutant
15 molecule comprising an extracellular domain of wild type CTLA4 with amino acid changes A29Y (a tyrosine amino acid residue substituting for an alanine at position 29) and L104E (a glutamic acid amino acid residue substituting for a leucine at position +104) joined to an Ig tail. FIG. 20 illustrates L104EA29YIg. The amino acid sequence of L104EA29YIg comprises alanine
20 at amino acid position -1 to lysine at amino acid position +357 as shown in FIG. 20. Alternatively, the amino acid sequence of L104EA29YIg comprises methionine at amino acid position +1 to lysine at amino acid position +357 as shown in FIG. 20. L104EA29YIg comprises a junction amino acid residue glutamine at position +125 and an Ig portion encompassing glutamic acid at
25 position +126 through lysine at position +357. DNA encoding L104EA29YIg was deposited on June 20, 2000, in the American Type Culture Collection (ATCC) under the provisions of the Budapest Treaty, and has been accorded ATCC accession number PTA-2104. 104EA29Y-Ig is described in co-pending U.S. Patent Application Serial Numbers 09/579,927, 60/287,576 and
30 60/214,065, and in WO/01/923337 A2, which are incorporated by reference herein in their entireties. The soluble L104EA29YIg molecules produced by the culturing methods of this invention may or may not include a signal

(leader) peptide sequence. Typically, the molecules produced according to the invention do not include a signal peptide sequence.

As used herein, the term "soluble" refers to any molecule, or fragment thereof, not bound or attached to a cell, i.e., circulating. For example, CTLA4, can be made soluble by attaching an Ig moiety to the extracellular domain of CTLA4.. Alternatively, a molecule such as CTLA4 can be rendered soluble by removing its transmembrane domain. Typically, the soluble molecules produced according to the invention do not include a signal (or leader) sequence.

10 A soluble CTLA4 molecule refers to a non-cell-surface-bound (i.e., circulating) molecule comprising wild type CTLA4, or any portion or derivative that binds B7, including, but not limited to, soluble CTLA4 fusion proteins; soluble CTLA4 fusion proteins such as CTLA4Ig fusion proteins (e.g., ATCC 68629), wherein the extracellular domain of CTLA4 is fused to an Ig moiety
15 that is all or a portion of an Ig molecule, preferably all or a portion of an Ig constant region, such as all or a portion of IgC γ 1 (IgCgamma1), IgC γ 2 (IgCgamma2), IgC γ 3 (IgCgamma3), IgC γ 4 IgCgamma4), IgC μ (IgCmu), IgC α 1 (IgCalpha1), IgC α 2 (IgCalpha2), IgC δ (IgCdelta) or IgC ϵ (IgCepsilon), rendering the fusion molecule soluble; soluble CTLA4 fusion proteins in which
20 the extracellular domain is fused or joined with a portion of a biologically active or chemically active protein such as the papillomavirus E7 gene product (CTLA4-E7), melanoma-associated antigen p97 (CTLA4-p97) or HIV env protein (CTLA4-env gp120), as described in U.S. Patent No. 5,844,095, herein incorporated by reference in its entirety; hybrid (chimeric) fusion
25 proteins such as CD28/CTLA4Ig as described in U.S. Patent No. 5,434,131, herein incorporated by reference in its entirety; CTLA4 molecules with the transmembrane domain removed to render the protein soluble (See, e.g., M.K. Oaks et al., 2000, *Cellular Immunology*, 201:144-153, herein incorporated by reference in its entirety); the soluble CTLA4 mutant molecule
30 L104EA29YIg.

A soluble CTLA4 molecule can also be a soluble CTLA4 mutant molecule. The soluble CTLA4 molecules produced according to this invention

may or may not include a signal (leader) peptide sequence. The signal peptide can be any sequence that will permit secretion of the molecule, including the signal peptide from oncostatin M (Malik et al., 1989, *Molec. Cell. Biol.*, 9:2847-2853), or CD5 (N.H. Jones et al., 1986, *Nature*, 323:346-349), or the signal peptide from any extracellular protein. The soluble CTLA4 molecule produced by the culturing processes of the invention can include the oncostatin M signal peptide linked at the N-terminal end of the extracellular domain of CTLA4. Typically, in the invention the molecules do not include a signal peptide sequence.

10 "CTLA4 fusion protein" as used herein refers to a molecule comprising the extracellular domain of wild type CTLA4, or portion thereof that binds to B7, fused to a non-CTLA4 moiety that renders the CTLA4 molecule soluble, such as an Ig moiety. For example, a CTLA4 fusion protein can include the extracellular domain of CTLA4 fused to all or a portion of an Ig constant region.

15 Examples of Ig constant domains (or portions thereof) that may be fused to CTLA4 include all, but are not limited to those listed hereinabove. A CTLA4 fusion protein can also be a CTLA4 mutant molecule.

As used herein, "non-CTLA4 moiety" refers to a molecule or portion thereof that does not bind CD80 and/or CD86 and does not interfere with the binding of CTLA4 to its ligand. Examples include, but are not limited to, an Ig moiety that is all or a portion of an Ig molecule, a portion of a biologically active or chemically active protein such as the papillomavirus E7 gene product (CTLA4-E7), melanoma-associated antigen p97 (CTLA4-p97) or HIV env protein (CTLA4-env gp120) (as described in U.S. Serial No. 5,844,095, herein incorporated by reference in its entirety). Examples of Ig moieties include all or a portion of an immunoglobulin constant domain, such as IgC γ 1 (IgCgamma1), IgC γ 2 (IgCgamma2), IgC γ 3 (IgCgamma3), IgC γ 4 (IgCgamma4), IgC μ (IgCmu), IgC α 1 (IgCalpha1), IgC α 2 (IgCalpha2), IgC δ (IgCdelta) or IgC ϵ (IgCepsilon). The Ig moiety can include the hinge, CH2 and CH3 domains, or the CH1, hinge, CH2 and CH3 domains of the aforementioned constant regions or other constant regions. Preferably, the Ig moiety is human or monkey and includes the hinge, CH2 and CH3 domains. Most preferably the

Ig moiety includes the hinge, CH2 and CH3 domains of human IgCγ1, or is the hinge, CH2 and CH3 domains of human IgCγ1. In an Ig moiety, the Ig constant region or portion thereof can be mutated so as to reduce its effector functions (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,637,481, 5,844,095 and 5,434,131).

5 The extracellular domain of CTLA4 refers to any portion of wild type CTLA4 that recognizes and binds B7. For example, an extracellular domain of CTLA4 comprises methionine at position +1 to aspartic acid at position +124 (FIG. 21). For example, an extracellular domain of CTLA4 comprises alanine at position -1 to aspartic acid at position +124 (FIG.21).

10 As used herein, the term “mutation” refers to a change in the nucleotide or amino acid sequence of a wild type molecule, for example, a change in the DNA and/or amino acid sequences of the wild type CTLA4 extracellular domain. A mutation in the DNA may change a codon leading to a change in the encoded amino acid sequence. A DNA change may include
15 substitutions, deletions, insertions, alternative splicing, or truncations. An amino acid change may include substitutions, deletions, insertions, additions, truncations, or processing or cleavage errors of the protein. Alternatively, mutations in a nucleotide sequence may result in a silent mutation in the amino acid sequence, as is well understood in the art. As is also understood,
20 certain nucleotide codons encode the same amino acid. Examples include nucleotide codons CGU, CGG, CGC, and CGA which encode the amino acid, arginine (R); or codons GAU, and GAC which encode the amino acid, aspartic acid (D).

25 Thus, a protein can be encoded by one or more nucleic acid molecules that differ in their specific nucleotide sequence, but still encode protein molecules having identical sequences. The mutant molecule may have one, or more than one, mutation. For guidance, the amino acid coding sequence is as follows:

Amino Acid	S ymbol	One Letter Symbol	Codons
Alanine	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cysteine	Cys	C	UGU, UGC

Amino Acid	S ymbol	One Letter Symbol	Codons
Aspartic Acid	Asp	D	GAU, GAC
Glutamic Acid	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUU, UUC
Glycine	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidine	His	H	CAU, CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Leucine	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Methionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAU, AAC
Proline	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Arginine	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serine	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonine	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valine	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU, UAC

As used herein, a “fragment or portion” is any part or segment of a molecule. For CTLA4 or CD28, a fragment or portion is preferably the extracellular domain of CTLA4 or CD28, or a part or segment thereof, that recognizes and binds B7 or interferes with a B7 so that it blocks binding to CD28 and/or CTLA4. Also, as used herein, “corresponding” means sharing sequence identity.

As used herein, a "derivative" is a molecule that shares sequence similarity and activity of its parent molecule. For example, a derivative of CTLA4

includes a soluble CTLA4 molecule having an amino acid sequence at least 70% similar to the extracellular domain of wildtype CTLA4, and which recognizes and binds B7 e.g. CTLA4Ig or soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg. A derivative means any change to the amino acid sequence and/or chemical
5 quality of the amino acid e.g., amino acid analogs.

As used herein, to "regulate an immune response" is to activate, stimulate, up-regulate, inhibit, block, reduce, attenuate, down-regulate or modify the immune response. A variety of diseases, e.g., autoimmune diseases, may be treated by regulating an immune response, e.g., by regulating functional
10 CTLA4- and/or CD28- positive cell interactions with B7-positive cells. For example, a method of regulating an immune response comprises contacting B7-positive cells with a soluble CTLA4 molecule, such as those produced according to this invention, to form soluble CTLA4/B7 complexes, wherein the soluble CTLA4 molecule interferes with the reaction of an endogenous CTLA4
15 and/or CD28 molecule with the B7 molecule. To "block" or "inhibit" a receptor, signal or molecule, as referred to herein, means to interfere with the activation of the receptor, signal or molecule, as detected by an art-recognized test. Blockage or inhibition can be partial or total.

As used herein, "blocking B7 interaction" refers to interfering with the
20 binding of B7 to its ligands, such as CD28 and/or CTLA4, thereby obstructing T-cell and B7-positive cell interactions. Examples of agents that block B7 interactions include, but are not limited to, molecules such as an antibody (or portion thereof) that recognizes and binds to the any of CTLA4, CD28 or B7 molecules (e.g., B7-1, B7-2); a soluble form (or portion thereof) of the
25 molecules such as soluble CTLA4; a peptide fragment or other small molecule designed to interfere with the cell signal through a CTLA4/CD28/B7-mediated interaction. In a preferred embodiment, the blocking agent is a soluble CTLA4 molecule, such as CTLA4Ig (ATCC 68629) or L104EA29YIg (ATCC PTA-2104); a soluble CD28 molecule, such as CD28Ig (ATCC 68628); a
30 soluble B7 molecule, such as B7-Ig (ATCC 68627); an anti-B7 monoclonal antibody (e.g., ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 and monoclonal antibodies as described in U.S. Patent

No. 6,113,898 or in Yokochi et al., 1982, *J. Immunol.*, 128(2):823-827); an anti-CTLA4 monoclonal antibody (e.g., ATCC HB-304, and monoclonal antibodies as described in references 82-83); and/or an anti-CD28 monoclonal antibody (e.g. ATCC HB 11944 and MAb 9.3, as described in
 5 Hansen et al., 1980, *Immunogenetics*, 10: 247-260, or Martin et al., 1984, *J. Clin. Immunol.*, 4(1):18-22). Blocking B7 interactions can be detected by art-recognized tests such as determining reduction of immune disease (e.g., rheumatic disease) associated symptoms, by determining a reduction in T-cell/B7-cell interactions, or by determining a reduction in the interaction of B7
 10 with CTLA4/CD28. Blockage can be partial or total.

As used herein, an effective amount of a molecule refers to an amount that blocks the interaction of the molecule with its ligand. For example, an effective amount of a molecule that blocks the interaction of B7 with CTLA4 and/or CD28 is the amount of the molecule that, when bound to B7 molecules
 15 on B7-positive cells, inhibits B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and CD28. Alternatively, an effective amount of a molecule that blocks the interaction of B7 with CTLA4 and/or CD28 is the amount of the molecule that, when bound to CTLA4 and/or CD28 molecules on T cells, inhibits B7 molecules from binding endogenous ligands such as CTLA4 and
 20 CD28. The inhibition or blockage can be partial or complete.

For clinical protocols, it is preferred that the Ig moiety of a fusion protein, such as CTLA4Ig or mutant CTLA4Ig, does not elicit a detrimental immune response in a subject. The preferred moiety is all or a portion of the Ig constant region, including human or non-human primate Ig constant
 25 regions. Examples of suitable Ig regions include IgC γ 1 (IgCgamma1), IgC γ 2 (IgCgamma2), IgC γ 3 (IgCgamma3), IgC γ 4 (IgCgamma4), IgC μ (IgCmu), IgC α 1 (IgCalpha1), IgC α 2 (IgCalpha2), IgC δ (IgCdelta) or IgC ϵ (IgCepsilon), including the hinge, CH2 and CH3 domains, or the CH1, hinge, CH2 and CH3 domains, which are involved in effector functions such as binding to Fc
 30 receptors, complement-dependent cytotoxicity (CDC), or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The Ig moiety can have one or more mutations therein, (e.g., in the CH2 domain to reduce effector functions such

as CDC or ADCC) where the mutation modulates the capability of the Ig to bind its ligand by increasing or decreasing the capability of the Ig to bind to Fc receptors. For example, mutations in the Ig moiety can include changes in any or all of its cysteine residues within the hinge domain. For example, the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine. The Ig moiety can also include the proline at position +148 substituted with a serine. Further, mutations in the Ig moiety can include having the leucine at position +144 substituted with phenylalanine; leucine at position +145 substituted with glutamic acid; or glycine at position +147 substituted with alanine.

EXAMPLES

The following Examples set forth specific aspects of the invention to illustrate the invention and provide a description of the present methods for those of skill in the art. The Examples should not be construed as limiting the invention, as the Examples merely provide specific methodology and exemplification that are useful in the understanding and practice of the invention and its various aspects.

Examples 1-5 as set forth below describe experiments relating to cell culture processes involving addition of glucocorticoids during the culture run.

EXAMPLE 1

In this study, the intracellular effects of dexamethasone (DEX) on the CHO cell glycosylation process, and the extracellular effects due to sialidase activity were studied. Here it is demonstrated for the first time that DEX was capable of improving the sialylation of a recombinant fusion glycoprotein produced by CHO. The net effects of DEX in promoting increased sialylation tested in shake flask cultures were then successfully confirmed in controlled bioreactors, and resulted in enhanced sialic acid content as well as reduced de-sialylation rates in the fed-batch cultures.

Cell line and medium

The CHO cell line used in this study was originally subcloned from DG44 parental cells and cultured in a proprietary protein-free growth medium.

Shake flask experiments

The experiments were carried out in 250-mL shake flasks (VWR international) with starting volumes of 100 mL and initial cell densities of 6×10^5 cells/mL. The cultures were placed on a shaker platform (VWR international) at 150 rpm and maintained at 37°C and 6% CO₂ for ten days. The cultures were sampled daily and the pH was adjusted as needed using 1M sodium carbonate and fed with glucose and glutamine every two days in order to maintain them at adequate levels. Cell density and viability were measured offline using a Cedex automated cell counter (Innovatis AG, Bielefeld, Germany). Culture pH and concentrations for glucose and glutamine were measured off-line using a Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).

Bioreactor operation

Bioreactor experiments were performed in 5-L bioreactors (Sartorius AG, Goettingen, Germany) with initial working volumes of 1.5 L. Agitation, pH, and dissolved oxygen were controlled at 150 rpm, 7.05, and 50% air saturation, respectively. Temperature was initially controlled at 37°C, but was shifted to a lower temperature during the culture to extend culture viability. The bioreactors were operated in fed-batch mode and were fed daily starting on day 3 with the proprietary feed medium to maintain adequate concentrations for glucose and other nutrients. Samples were taken during the cell culture process and analyzed for cell density, cell viability, substrates and metabolites.

Western blot analysis of α 2,3-sialyltransferase (α 2,3-ST) and β 1,4-galactosyltransferase (β 1,4-GT)

Approximately 10^7 CHO cells were washed with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS), lysed with 1 mL of Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), then denatured at 90°C for 5 minutes. The whole cell lysates were separated on a 4-15% SDS-polyacrylamide gel, blotted to 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA), and probed with primary and secondary antibodies. The primary antibodies were anti-human α 2,3-ST rabbit polyclonal antibodies and anti-human β 1,4-GT rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The secondary antibody was horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The membranes were stripped and re-probed with β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and an HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody. Immunodetection was performed using an enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (GE Healthcare) and visualized with a VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Measurement of sialidase activity in supernatant

Sialidase activity was analyzed using the Amplex Red Neuraminidase (Sialidase) Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, neuraminidase in the sample is used to desialylate fetuin. This assay utilizes Amplex Red to detect H_2O_2 generated by oxidation of the desialylated galactose residues on the fetuin by galactose oxidase. The H_2O_2 , in the presence of HRP, reacts stoichiometrically with Amplex Red reagent to generate the red-fluorescent oxidation product, resorufin 5, which is then analyzed either fluorometrically or spectrophotometrically. In each assay, 50 μ L of working solution (100 μ M Amplex Red, 0.2 U/mL HRP, 4 U/mL galactose oxidase and 500 μ g/mL fetuin) was added into each microplate well containing 50 μ L of diluted cell culture supernatant. After 30 minutes incubation at 37°C, samples were analyzed for absorbance at 560 nm using a microplate reader.

Sialic acid assay

The sialic acid to recombinant protein molar ratio was calculated by determining the sialic acid and recombinant protein concentrations. Sialic acid (SA), including N-Acetylneuraminic (Neu5Ac) and N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), was released by partial acid hydrolysis. The derivatives were then separated by reversed-phase HPLC to determine sialic acid content. The protein concentrations were determined by UV absorbance at 280 nm. Sialic acid content is reported as molar ratios, which is the total moles of

Neu5Ac and Neu5Gc per mole of recombinant glycoprotein. Sialic acid contents are reported as normalized values, which are the actual values divided by an arbitrary value. The same divisor was used to normalize all sialic acid content data in the studies reported here.

5 **N-linked oligosaccharides measurement**

High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was used for the profiling of N-linked oligosaccharides (Basa and Spellman 1990; Townsend and Hardy 1991) to provide information on site-specific N-linked glycosylation. N-linked
10 oligosaccharides were cleaved from protein and separated on HPAEC-PAD into four domains based on the amount of sialic acid present. Domain I represents the asialo species. Domains II, III, and IV are sialylated species and represent monosialylated, disialylated, and tri- and tetrasialylated species, respectively. N-linked sialylated species fraction is reported as the
15 percentage of N-linked sialylated species within the total N-linked oligosaccharides species, which includes both asialo and sialylated species. N-linked sialylated species fractions are reported as normalized values, which are the actual values divided by an arbitrary value. The same divisor was used to normalize all N-linked sialylated species fraction data in the studies
20 reported here.

O-linked oligosaccharides measurement

O-linked glycosylation was characterized by intact mass analysis of a reference standard and Protein-A purified samples of the fusion protein (Reference). Samples were diluted in 100 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 7.6 and
25 incubated with PNGase F overnight to enzymatically remove all N-linked oligosaccharides. Samples were then injected for intact mass analysis after mixing with an internal standard of insulin. O-linked sialic acid content is reported as molar ratios, which is the moles of O-linked sialic acid per mole of recombinant glycoprotein.

30

Results

Dexamethasone enhances sialic acid content and percentage of sialylated species in N-linked oligosaccharides

The CHO DG44 cell line expressing the fusion glycoprotein was treated with various levels of DEX to assess whether DEX affected sialic acid content and the percentages of the different sialylated species. This study was performed in duplicate 250-mL shake flasks using the culture conditions as described above. On the second day after inoculation, DEX was added to CHO cell cultures at final concentrations ranging from 0.01 to 10 μ M DEX. Cultures were harvested on day 10, and the fusion protein was purified using a protein A column and analyzed for total sialic acid content, O-linked sialic acid content and the N-linked profile. Sialylation increased in the DEX-treated cultures in a concentration-dependent manner (Table 1).

Table 1

DEX treatment (μ M)	Percent increase of SA (%)	Percent increase of N-link asialo- (%)	Percent increase of N-link- Mono- (%)	Percent increase of N-link- Di- (%)	Percent increase of N-link- Tri and tetra- (%)	Percent increase of O-link SA (%)
0.01	9.3	-8.6	6.6	13.9	4.5	0.0
0.1	13.0	-9.6	7.3	13.9	13.6	0.5
1.0	13.0	-10.0	4.3	19.4	15.9	0.9
10	20.4	-15.6	7.3	24.3	20.5	0.0

15

DEX concentrations from 0.01 μ M to 10 μ M resulted in 9.3% to 20.4% increase in the sialic acid content, with a maximal effect at 10 μ M. Compared with the control, the N-linked oligosaccharide chromatographs for cultures with DEX treatment showed enhanced monosialylated, disialylated and the tri-plus tetra sialylated fractions of 4.3% to 7.3%, 13.9 % to 24.3% and 4.5% to 20.5%, respectively. Conversely, there was a 8.5% to 15.6% reduction compared to the control in asialo fractions in the oligosaccharide distributions for the DEX-supplemented cultures. The N-linked chromatograms also

20

showed the maximum effect at 10 μ M DEX. These results indicate improved sialylation in the DEX treated cultures. However, no significant changes were observed in the O-linked sialic acid molar ratios from the DEX treated samples.

5 **DEX promotes β 1,4-galactosyltransferase (β 1,4-GT) and α 2,3-sialyltransferase (α 2,3-ST) expression**

Western blotting was employed to elucidate potential mechanisms of DEX on sialylation by studying the expression of two enzymes, β 1,4-GT and α 2,3-ST, which are involved in the sialic acid addition pathways. In this
10 experiment, DEX was added on the second day after inoculation to cultures at concentrations from 0.1 μ M to 10 μ M and the cells were harvested for Western blot analysis after three days. The housekeeper protein β -actin was used to compare sample loading. As shown in Figs. 1A and 1B, the expression of β 1,4-GT and α 2,3-ST levels increased substantially in the DEX
15 treated cultures compared to cultures without DEX treatment. Expression intensity for both enzymes generally increased with the DEX concentration. These results demonstrated that DEX was capable of stimulating expression of the sialyltransferases β 1,4-GT and α 2,3-ST in CHO cells.

20 **Cell protective effect of DEX results in reduced sialidase activity in the culture supernatant**

In Example 3, DEX treatment was shown to increase expression of the anti-apoptotic protein GILZ resulting in enhanced viability of the CHO cell cultures. To determine whether the improvement in cell viability due to DEX could lessen the degradative effect of sialidases on the recombinant fusion
25 protein, a shake flask study was initiated to compare cell viability and supernatant sialidase activity profiles from cultures with and without 1 μ M DEX. As shown in Fig. 2A and Fig. 2B, increased sialidase activity was associated with the decreased cell viabilities in both the DEX-treated and untreated cultures. Cell viability decreased from $98.0 \pm 0.1\%$ on day 4 to $85.0 \pm 2.7\%$ on day 10 in the DEX treated cultures compared to a day 10 viability
30 of $70.2 \pm 4.6\%$ for the control. The absorbance measurement of sialidase activity increased from 0.006 ± 0.002 on day 4 to 0.024 ± 0.003 on day 10 in

the DEX treated cultures compared to a day 10 value of 0.047 ± 0.004 in the control. Thus, the rate at which the cultures both declined in cell viability as well as increased in sialidase activity were significantly slower in the DEX-treated cultures. These results suggest that DEX was capable of inhibiting sialidase release through its cell protective effect.

Comparison of dexamethasone with other two glucocorticoids, hydrocortisone and prednisolone

Additional glucocorticoid compounds, hydrocortisone (HYC) and prednisolone (PRD) were also evaluated to determine whether the effect of DEX on increasing sialylation in CHO cells could be extended to other glucocorticoid compounds. DEX, HYC and PRD were added into cell culture medium on the second day after inoculation at the final concentrations of 0, 0.1, 1 and 10 μM . Fig 3A and Fig 3B show the normalized total sialic acid content and normalized N-linked sialylated species fraction after the 10-day culture for the different glucocorticoid conditions. The total sialic acid content at glucocorticoid concentrations between 0.1 to 10 μM were 12.4 ± 0.4 to 14.0 ± 0.5 for DEX, 11.2 ± 0.1 to 13.0 ± 0.2 for HYC, and 11.8 ± 0.2 to 13.4 ± 0.8 for PRD, compared to 10.2 ± 0.2 for the control. The N-linked sialylated species fraction at glucocorticoid concentrations between 0.1 to 10 μM were 85.6 ± 1.6 to 88.8 ± 0.9 for DEX, 79.8 ± 1.6 to 89.6 ± 0.1 for HYC, and 83.7 ± 0.1 to 89.0 ± 0.2 for PRD compared to 77.1 ± 0.7 for the control. Thus, similar to DEX, both HYC and PRD also showed increases in sialylation and the maximum effect was observed at 10 μM for all three glucocorticoid compounds within the studied concentration range. However, higher concentrations of HYC and PRD were required to achieve the same level of sialylation enhancement as DEX.

Mechanism for sialylation enhancement by dexamethasone involves the glucocorticoid receptor.

In order to determine whether the sialylation improvement from DEX addition was mediated through the glucocorticoid receptor (GR), the GR antagonist mifepristone (RU-486) was added to cell culture medium before DEX treatment. Specifically, 1 μM of RU-486 was added 48 hours after

inoculation and DEX, at concentrations of 0.1, 1 and 10 μM , was then added 24 hours later. DEX was also added to cultures without RU-486 as controls. For conditions with and without RU-486, the normalized total sialic acid content and normalized N-linked sialylated species fraction induced by DEX are shown in Fig. 4A and Fig. 4B, respectively. The ability of DEX to enhance product sialylation was substantially reduced in the presence of 1 μM of RU-486 and was most evident for the 0.1 μM DEX condition. The total sialic acid content and N-linked sialylated species fraction for the 0.1 μM DEX conditions decreased from 15.1 ± 0.1 and 92.2 ± 2.0 (without RU-486) to 12.7 ± 0.1 and 81.5 ± 0.8 (with 1 μM RU-486), respectively. These results indicate that the mechanism through which DEX increased sialylation was GR-dependent, since RU-486 competes with DEX for the ligand-binding domain of the GR (Raux-Demay et al. 1990).

Application of DEX in fed batch bioreactor culture

The effect of DEX to increase sialylation of fusion protein found in shake flasks was then tested in fed-batch cultures using controlled 5-L bioreactors. The bioreactors were operated as described in the methods section. Higher total sialic acid content (Fig. 5A) and N-linked sialylated species fraction (Fig. 5B) were observed in the cultures with 1 μM DEX bolus addition. The total sialic acid content with DEX was 16.5 ± 0.1 compared to 14.2 ± 0.1 for the control (16.2% increase). Similarly, the N-linked sialylated species fraction with DEX was 90.2 ± 1.3 compared to 77.9 ± 1.6 for the control (15.8% increase). In agreement with the observation in shake flask sialidase activity studies (Figs. 3A and 3B), the total sialic contents decreased between days 8 to 14 from 17.9 ± 0.1 to 16.5 ± 0.1 (-7.8%) with DEX compared 16.3 ± 0.1 to 14.2 ± 0.1 (-12.9%) for the control. Similarly, the percentage of the sialylated fraction between days 8 to 14 decreased from 97.7 ± 0.9 to 90.2 ± 1.3 (-7.7%) with DEX compared to 91.3 ± 0.9 to 77.9 ± 1.6 (-14.7%) for the control.

The increase in glycoprotein sialylation by DEX was further confirmed at various bioreactor scales. The normalized final sialic acid content, and normalized percentage of sialylated fractions from different runs are summarized in Figure 6. Within these runs, the DEX condition included runs

with DEX added as a bolus or included in the feed medium. As indicated in Figure 6, DEX showed significant sialylation improvement with enhanced final sialic acid content (p value < 0.001 by t-test) and final sialylated species fraction (p value < 0.001 by t-test).

5 Conclusion

The addition of dexamethasone to a CHO culture producing a recombinant fusion glycoprotein resulted in improved sialylation. This study was the first to demonstrate that dexamethasone was capable of increasing expression of the glycosyltransferases α 2,3-ST and β 1,4-GT and that the
10 effect of dexamethasone was mediated through the glucocorticoid receptors. Overall the effect of dexamethasone in improving sialylation involved both intracellular effects through the glycosyltransferases as well as extracellular effects through extending culture viability which decreased the presence of sialidases released into the culture supernatant through cell lysis.
15 Dexamethasone was found to be a convenient method for improvement of sialylation.

Example 2

Cell line and medium

20 The CHO cell line used in this study was originally subcloned from DG44 parental cells and cultured in a protein-free proprietary growth medium. The host cells were genetically engineered to secrete an IgG-fusion protein under the control of CMV promoter.

Shake flask experiments

25 The experiments were carried out in 250-mL shake flasks (VWR international) with starting volumes of 100 mL and initial cell densities of 6×10^5 cells/mL. Shake flasks were placed on a shaker platform (VWR international) at 150 rpm rotating speed. Cells were cultured under standard humidified condition at 37°C and 6% CO₂, for a ten-day duration with daily pH
30 adjustment using 1M sodium carbonate, and fed with glucose and glutamine every two days in order to maintain them at certain level. Cell density, cell viability and substrates/metabolites were offline-analyzed by an automated

cell counting system Cedex (Innovatis AG, Bielefeld, Germany) and a Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). Supernatant from each culture harvest was collected for SEC analysis.

Size-Exclusion Chromatography (SEC)

5 SEC analysis was performed according to the previously published method (Perico et al., 2008) with some modifications. Briefly, the Protein-A purified samples were run on an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) on Tosoh Bioscience TSK-Gel G3000 SWxl column (7.8 ID x 30 cm, 5 μ m particles). The mobile phase contained 1 x
10 Phosphate Buffered Saline (PBS) at pH 7.4. The flow rate was 0.5 mL/min, and column temperature was controlled at 25°C. The signal was monitored by absorbance at wavelength of 280 nm.

Western blot analysis of glutathione reductase and glucocorticoid receptor

15 After being washed with 1 x PBS, approximately 10^7 CHO cells were lysed with 1 mL of Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories) and denatured at 90 °C for 5 minutes. The whole cell lysates were separated on a 4-15% SDS-polyacrylamide gel, blotted to 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories), and probed with primary antibodies and secondary
20 antibody. The primary antibody for detection of glutathione reductase was the monoclonal antibody raised against amino acids 391-510 mapping near the C-terminus of glutathione reductase of human origin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Although Chinese hamster origin was not listed by the manufacturer for detection of glutathione reductase using this
25 antibody, a preliminary experiment showed that there was only one band detected in the lysates from both CHO cells and human origin HL60 cells with an identical apparent molecular size on the blot. The primary antibody used for detection of glucocorticoid receptor was anti-human monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The secondary antibody was
30 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Membranes were stripped and re-probed with β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) and HRP-conjugated

secondary antibody. Immunodetection was performed with the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (GE Healthcare) and visualized with VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

Results

5 **Dexamethasone (DEX) reduces aggregation of CHO-produced IgG-fusion proteins at broad range of concentrations**

Figure 7A shows the significantly reduced percentage of high molecular weight (HMW) species in IgG-fusion protein after the CHO cells were treated with DEX at 1 μ M final concentration in culture medium. The
10 main components of HMW species were dimers and trimers formed covalently or non-covalently and categorically considered to be protein aggregates. Considering that a 15% reduction of protein aggregation was obtained under the culture conditions that had been already optimized, the improvement was practically significant in manufacture process. To establish
15 the dose-response curve and time-course for the effects of DEX on protein aggregation, we cultured the cells either at different concentration of DEX or at the same concentration (1 μ M) but with different incubation time. As shown in Figure 7C, DEX time-dependently reduced the rate of protein aggregation, which was consistent with previously observed time-dependency of DEX on
20 the improvement of cell viability and protein glycosylation profiles (Table 1 and Figure 11). However, the concentration-dependency of DEX on reduction of protein aggregation level was not obvious (Figure 7B), which suggests that the anti-aggregation effect was not simply due to the improved cell viability because our previous results demonstrated the viability of CHO cells was
25 increased with the concentration of DEX from 0.01 μ M to 10 μ M in the culture medium

Dexamethasone up-regulates glutathione reductase expression in CHO cells

A Western Blot was performed to detect glutathione reductase
30 expression in the whole cell lysates prepared from the CHO cells treated with various concentrations of DEX. As shown in Fig. 8, DEX increased the expression of glutathione reductase, which could be seen even when the drug

was at 1 nM. Detection of β -actin was used for sample loading comparison to eliminate the possibility that the glutathione reductase band enhancement was due to the coincidentally increased sample loading.

GSH reduces purified IgG-fusion protein aggregation in vitro

5 To determine if GSH itself could affect protein aggregation by directly interacting with the proteins, we did *in vitro* study by adding GSH to Protein-A purified IgG-fusion proteins that were reconstituted in Tris-acetate buffer, and analyzed SEC profiles. As shown in Figure 9, the percentage of high molecular weight species was significantly decreased, with the reduction rate
10 being 15.3% and 27.3% in the presence of 1 and 3 mM GSH respectively. The data clearly demonstrated that GSH could directly inhibit IgG-fusion protein aggregation.

Dexamethasone effects are mediated via glucocorticoid receptors

DEX is a potent glucocorticoid with broad pharmacological actions. To
15 determine if the inhibitory effect of DEX on IgG-fusion protein aggregation was specifically mediated through activation of glucocorticoid receptors, it was first confirmed that there is endogenous expression of glucocorticoid receptors (GR) in the cell line utilized, which is presented in Fig. 10A. Since the antibody used in the Western Blotting was raised against the conserved
20 region of human GR, a whole-cell lysate sample of HepG-2 cells was also loaded as human origin sample for antibody validation purpose. Although the antibody could detect both GR α and GR β , the present analysis only showed a single band. This could be because the molecular weights of these two isoforms (95 kDa vs 90 kDa) were too close to be separated on the 5-15%
25 gradient gel or more likely because there was only one isoform presented in the samples.

Since DEX was found to up-regulate glutathione reductase expression in CHO cells (see Figure 8), a further assessment to determine if this effect was induced by the activation of GR receptors. RU-486 is a GR antagonist
30 and often used as a tool drug in many GR related studies. Our preliminary experiment showed that RU-486 did not affect the CHO cell viability and metabolic parameters if the concentrations were not higher than 1 μ M; at 10

μM, a significant decrease in cell viability and cell growth rate was observed. In the subsequent experiments, RU-486 was therefore used at 1 μM or lower concentrations and it was introduced into the culture to pre-treat CHO cells one day before DEX addition. Fig. 10B shows that in the presence of 1 μM
5 RU-486, the up-regulatory effect of DEX on glutathione reductase expression was attenuated, confirming the involvement of GR.

Finally, the percentages of HMW species in IgG-fusion proteins produced by CHO cells treated with 0.1 μM DEX and its combination with different concentrations of RU-486 was evaluated. Consistent with the result
10 in Fig 7B, the percentage of HMW species was decreased by approximately 17% when the culture was treated with 0.1 μM DEX alone, and this effect was gradually diminished with increasing concentrations of RU-486 (Fig 10C). Under the condition that equal concentration of DEX and RU-486 was used, the inhibition rate of HMW species was about half of the rate obtained from
15 DEX alone, indicating that DEX as an agonist and RU-486 as an antagonist had similar affinities to compete with each other for GR in CHO cells. Thus, taken all three pieces of data in Fig 9 together, the results clearly demonstrated that the inhibition of IgG-fusion protein aggregation was mediated through GR.

20 Conclusion

As an inexpensive but potent glucocorticoid and with its beneficial triad, improving cell viability as described in Example 3 and glycosylation as described in Example 1 and inhibiting protein aggregation as described herein, dexamethasone may provide a simple, cost effective and efficient way
25 to overall enhance cell culture process

Example 3

This study, for the first time, demonstrated that dexamethasone is capable of preventing CHO cell apoptosis in serum-free condition in a
30 concentration- and time-dependent manner. DEX induces CHO cell GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) gene expression. DEX was successfully used in 10-L bioreactor CHO culture to improve cell viability and

Fc-fusion protein productivity and sialic acid content. This study demonstrated the application of DEX in industrial cell culture to improve recombinant protein productivity and glycosylation.

Cell line and medium

- 5 The CHO cell line used in this study was subcloned from DG44 parental cells and cultured in a proprietary chemically-defined growth medium.

Shake flask experiments

- The experiments were carried out in 250-mL shake flasks (VWR international) with starting volumes of 100 mL and initial cell densities of 6×10^5 cells/mL. The cultures were placed on a shaker platform (VWR international) at 150 rpm and maintained at 37°C and 6% CO₂ for ten days. The cultures were sampled daily and the pH adjustment using 1M sodium carbonate, and fed with glucose and glutamine every two days in order to maintain them at certain levels. Cell density and viability were measured off-
- 10 line a Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).

Bioreactor operation

- Bioreactor experiments were performed in 10-L bioreactors (Sartorius Stedim Biotech, France) with starting working volumes of 5 L. Agitation, pH and dissolved oxygen were controlled at 150 rpm, 7.05, and 50% air
- 20 saturation, respectively. Temperature was initially controlled at 37 °C and was shifted to lower temperature during the culture to extend the culture viability. The bioreactors were operated in a batch fed mode and were fed daily starting on day 3 with the proprietary feed medium to maintain adequate concentrations for glucose and other nutrients. Samples were taken during
- 25 the cell culture process and analyzed for cell density, cell viability, substrates and metabolites.

qRT-PCR analysis

- TaqMan® 5'-nuclease real-time quantitative RT-PCR assay was performed to verify the upregulation of GILZ by DEX. Total RNA, purified
- 30 from each triplicate culture with and without 1 µM DEX using the RNeasy® midi kit as described above. Purified RNA was treated with RNasefree DNaseI (Qiagen) and then used as a template to synthesize the first-strand

cDNA using RT² First Strand Kit (SA Biosciences, Frederick, MD).

Expression of GILZ was quantitatively determined using GILZ specific

TaqMan MGB probe (6-FAM-AGAGGACTTCACGTGT) and primers

(Forward: 5-CCTCCCTCATCTGTCCACTGA-3 and Reverse: 5-

- 5 TGGTGGGTTTGGCATTCAA-3). 20 ng of cDNA was amplified using 900 nM primers and 250 nM probe in 1×TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Reactions were run in triplicate on the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System using the universal cycling parameters (20 s 95°C, 40 cycles of 3 s 95 °C, 30 s 60°C). Parallel
10 reactions were set up on the same plate analyzing β-Actin in each sample as an endogenous control. The threshold cycle of each gene was normalized against the threshold cycle of "housekeeping gene" β-Actin. Normalized changes in gene expression with respect to the control were calculated using delta-delta threshold cycle method (Livak and Schmittgen, 2001).

15 **Western blot analysis of GILZ**

Approximately 10⁷ CHO cells were washed with 1X phosphate buffered saline (PBS) solution, lysed with 1 mL of Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and then denatured at 90 °C for 5 minutes. The whole cell lysates were separated on a 4-15% SDS-polyacrylamide gel,
20 blotted to 0.45 μm nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories), and probed with a primary mouse monoclonal antibody directed to GILZ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). Membranes were stripped and re-probed with β-actin
25 antibody (Santa Cruz Biotechnology) and an HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody. Immunodetection was performed with the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and visualized with a VersaDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)..

30 **Titer assay**

Titer was determined by affinity chromatography using an HPLC pump and UV detection (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and Applied

Biosystems Poros A/20 Protein A column (100 x 4.6 mm). The eluted protein was quantified using a 10-level standard curve.

Results

Effect of dexamethasone on CHO cell growth

5 The glucocorticoid dexamethasone (DEX) was added to shake flask cultures at final concentrations between 0.01 to 10 μ M two days after inoculation to assess the effects of glucocorticoids on CHO cell viability and the potential to extend the cell culture period. The viable cell density (VCD) profile in the dose-response study (Fig. 11A) shows increasing inhibition of
10 cell growth occurring one day after DEX treatment in a dose-dependent manner. The peak VCD reached 8.5×10^6 cells/ml in the untreated control culture, whereas the peak VCD was 6.5×10^6 cell/mL in the cultures treated with 10 μ M DEX. Cell viability decreased rapidly after Day 6 (Fig. 11B) and percent viability on day 10 was only 42.1%. In contrast, the final cell viabilities
15 with 0.01 μ M, and 10 μ M DEX were 53.1% and 64.0%, respectively. The loss of viability beginning on day 6 improved in a concentration-dependent manner in the DEX-treated cultures, with a maximal effect at 10 μ M (Figs. 11A and 11B).

A time-course study for the addition of DEX was then performed in
20 shake flask cultures in which DEX was added to a final DEX concentration of 1 μ M and added between the day of inoculation through the sixth day after inoculation. As shown in Figure 11C and 11D, the final VCD and cell viability increased in all DEX-treated cultures, and both VCD and cell viability improved in a time-dependent manner with earlier DEX addition timing. The
25 viability of untreated CHO cell cultures decreased to 50% on day 10, while cultures in which DEX was added on days 0, 2, 4 and 6 were 63, 68, 72 and 74%, respectively.

DEX reduces cell specific growth rate but increases cell specific productivity

30 The specific growth rate, normalized volumetric productivity, and normalized cell specific productivity were quantified and compared between DEX-treated and untreated cells. The data comparing the specific cell growth

rates and normalized productivity profiles with and without 1 μ M DEX are shown in Figure 12A and 12B(n=5). DEX was added on day 2, resulting in approximately a 30% reduction in cell growth rates with DEX compared to control the day after DEX addition. However, this growth inhibition effect decreased with the culture time. At the end of the culture period, cell death rates were slower in cultures with DEX treated cells. Moreover, the early cell growth inhibition induced by DEX did not affect volumetric productivity (6.5 for all cultures); however, cultures with DEX treatment had significantly higher specific productivity than untreated cells, with a maximum specific productivity of $(7.0 \pm 0.6) \times 10^{-9}$.

Upregulation of GILZ by DEX was confirmed by qRT-PCR and western blot analysis

GILZ was analyzed using qRT-PCR to validate the gene expression profiles obtained by microarray analysis. RNA samples from day 5 and 8 for triplicate DEX treated and untreated cultures were applied in TaqMan® qPCR quantification. Parallel reactions were set up on the same plate analyzing β -Actin in each sample as an endogenous control. As shown in Fig. 13A, the normalized expression profile changes of GILZ obtained by qRT-PCR on day 5 and day 8 samples are 7.66 ± 1.08 and 10.48 ± 2.16 , respectively.

Cell lysates from day 5 cultures with and without 1 μ M DEX treatment were analyzed by Western blotting to test the whether GILZ is overexpressed in DEX treated cultures. The blot was also reprobed with the beta-actin antibody as a control to assess equivalent gel loading. As shown in Fig. 13B, the expression of GILZ protein significantly increased in the DEX treated samples compared with untreated samples. In addition, GILZ fold change caused by DEX is slightly higher in day 8 samples than day 5 samples, which is in agreement with the qRT-PCR results.

Comparison of dexamethasone with other two glucocorticoids, hydrocortisone and prednisolone

Experiments in shake flasks then tested whether the protective effect of DEX on CHO cell viability was limited to DEX or could be extended to other glucocorticoid compounds, such as hydrocortisone (HYC) and prednisolone

(PRD). DEX, HYC and PRD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added two days after inoculation at final concentrations of 0, 0.1, 1 and 10 μ M for each of these three compounds. Peak VCD, final VCD and final viability of cultured cells are presented in Table 2.

5

Table 2

	Treatment Concentration (μ M)	Peak VCD ($\times 10^6$ cells/mL)	Final VCD ($\times 10^6$ cells/mL)	Viability (%)
Dexamethasone (DEX)	0.1	7.99	7.64	72.3
	1	9.02	8.40	75.8
	10	7.49	7.38	82.3
Hydrocortisone (HYC)	0.1	10.06	7.86	60.1
	1	9.51	8.15	65.1
	10	8.44	7.80	75.5
Prednisolone (PRD)	0.1	8.99	8.26	69.4
	1	9.25	8.79	76.8
	10	8.05	8.27	77.5
Control	N/A	8.69	7.56	56.6

Similar to DEX, HYC (60.1-75.5% final viability) and PRD (69.4-75.5% final viability) also showed dose-dependent cell protective effects. Viability on day 10 was 56.6% for the control compared to day 10 viabilities with 0.1 and 10 μ M concentrations for DEX of 72.3% and 82.3%; for HYC of 60.1% and 75.5%; and PRD of 69.4% and 77.5%, respectively. Thus all three glucocorticoid compounds improved culture viability with maximum effects at 10 μ M for all three glucocorticoid compounds.

The death-suppression action of dexamethasone involves GILZ and glucocorticoid receptor

In order to determine whether the viability improvement from DEX addition was mediated through GILZ and the glucocorticoid receptor (GR), the GR antagonist mifepristone (RU-486) was added to cell culture medium before DEX treatment. For conditions with and without RU-486, the percent increase of final cell viability induced by DEX is shown in Fig. 14A. The ability of DEX to improve cell viability was substantially reduced in the presence of 1 μ M of RU-486. The percent increase of cell viability induced by 0.1 and 1 μ M DEX decreased from 30.5% and 32.6% (without RU-486) to 4.7% and 5.7% (with 1 μ M RU-486), respectively. In the mean time, qRT-PCR analysis (Fig. 14B) shows that in the presence of 1 μ M RU-486, the upregulation effect of DEX on GILZ expression was significantly attenuated. The fold change induced by 0.1 and 1 μ M DEX decreased from 9.0 ± 1.9 and 11.3 ± 3.0 (without RU-486) to 1.8 ± 0.9 and 2.3 ± 1.0 (with 1 μ M RU-486), respectively. Western Blotting analysis (Fig. 14C) further confirmed the overexpression of GILZ protein was significantly decreased in the presence of 1 μ M RU-486. These results indicate that the mechanism through which DEX increased viability involved GILZ and was GR-dependent, since RU-486 competes with DEX for the ligand-binding domain of the GR

Application of dexamethasone in 10-L fed batch bioreactor culture

Fed-batch cultures in 10-L bioreactors were carried out to determine whether the effect of DEX seen in shake flasks would scale to bioreactors. The overall goal of DEX was to suppress cell death, extend culture longevity and consequently increase glycoprotein production for a process in bioreactors. In this study, three bioreactors were operated using the same conditions described above; with 1 μ M of DEX added to two bioreactors on day 2 or day 7 respectively. Different from shake flask runs, bioreactor runs were extended to 14 days, the culture temperature was shifted to a lower temperature during the late exponential phase of the culture, and a proprietary feeding medium was used instead of feeding only glucose and glutamine.

Bioreactors with DEX added on either day 2 or day 7 reached maximum cell densities of approximately 8.3×10^6 cell/mL on day 8,

compared to 7.8×10^6 cell/mL without DEX (Fig. 15A). DEX addition decreased the cell death rate in the bioreactors. Cell viability was 94% viability for all conditions on day 6 (Fig. 15B). By day 14, the percent viability decreased to 29% without DEX, compared to 55% and 39% with DEX added on days 2 or 7, respectively. The final VCD on day 14 with DEX added on days 2 or 7 were 4.1 and 3.5×10^6 cell/mL respectively, compared to 2.8×10^6 cell/mL without DEX addition. Normalized protein titers were approximately 5.5 on day 7 prior to the maximum VCD (Fig. 15C). Thereafter, protein production during the stationary and death phases of the cultures was higher in the bioreactors with DEX addition. The day 14 harvest normalized titers were 12.5 in both bioreactors with DEX, compared to 10.5 without DEX addition, a 20% increase.

Conclusion

Our effort on medium optimization has led us to unexpectedly discover that glucocorticoids can significantly attenuate the cell viability decline in the fed-batch culture of CHO cells. In the mechanism study of this phenomenon, the involvement of upregulation of anti-apoptotic gene GILZ was identified through qRT-PCR and Western blot analysis. By studying effects of DEX's analogs and antagonist on CHO cell growth, the role of GILZ and glucocorticoid receptor in mediating the action of DEX was determined. Fed-batch bioreactor experiments demonstrates this glucocorticoid analog to be an effective, feasible, and cost-efficient chemical for attenuating the viability decline in cell cultures.

Example 4

In this study, the effects of dexamethasone (DEX) on CHO cell growth, protein sialylation and aggregation were studied on another CHO cell line with different glycoprotein (CTLA4Ig) secretion.

Cell line and medium

The CHO cell line used in this study was originally subcloned from DG44 parental cells and cultured in a proprietary chemical-defined growth medium.

Shake flask experiments

The experiments were carried out in 250-mL shake flasks (VWR international) with starting volumes of 100 mL and initial cell densities of 6×10^5 cells/mL. The cultures were placed on a shaker platform (VWR international) at 150 rpm and maintained at 37°C and 6% CO₂ for ten days. The cultures were sampled daily and the pH was adjusted as needed using 1M sodium carbonate and fed with glucose and glutamine every two days in order to maintain them at adequate levels. The glucocorticoids dexamethasone (DEX) was added at final concentrations between 0.001 – 10 M on day 2. Cell density and viability were measured offline using a Cedex automated cell counter (Innovatis AG, Bielefeld, Germany). Culture pH and concentrations for glucose and glutamine were measured off-line using a Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). Supernatants from culture harvests were collected for analysis of sialic acid content and HMW level.

Sialic acid and HMW content assay

The sialic acid and HMW content assay were performed as described in the previous examples.

Results

Effect of dexamethasone on CHO cell growth

The glucocorticoid dexamethasone (DEX) was added to shake flask cultures at final concentrations between 0.001 to 10 μ M two days after inoculation to assess the effects of DEX on CHO cell viability and the potential to extend the cell culture period. The viable cell density (VCD) profile in the dose-response study (Fig. 16A) shows increasing inhibition of cell growth occurring after DEX treatment, though the concentration dependency is not obvious in the studied range. The peak VCD reached 13.9×10^6 cells/mL in the untreated control culture, whereas the peak VCD ranged from 10.6×10^6 to 12.7×10^6 cells/mL in the cultures treated with 0.001 to 10 μ M DEX. Cell viability for the untreated cultures decreased rapidly after Day 6 (Fig. 16B) and percent viability on day 10 was only 64.5%. In contrast, the final cell

viabilities with 0.001 μ M, and 10 μ M DEX were 75.5% and 82.3%, respectively.

**Dexamethasone (DEX) increases sialylation and reduces HMW
5 level of glycoprotein CTLA4lg**

Besides the cell growth, the effects of DEX on sialic acid content and HMW level were also assessed. Through comparing with untreated cultures, the percent increase of sialic acid content (Fig. 17A) and the percent reduction of HMW species (Fig. 17B) induced by various concentration of
10 DEX are shown in Fig. 17. It is obviously that DEX is capable of increasing the sialylation and reducing the HMW species of glycoprotein, indicating improved protein quality, even at 0.001 μ M concentration. The concentration-dependencies of DEX on sialic acid content and HMW species are not obvious as the concentration of DEX is above 0.01 μ M.

15

These results demonstrated that the actions of DEX on cell viability improvement, glycoprotein sialylation improvement and aggregation reduction are not limited to either single cell cline or medium formulation.

20

Example 5

In this study, the feasibility of utilizing DEX in the cell culture medium for large scale recombinant glycoprotein production is demonstrated in 500-L and 5000-L scale bioreactors.

Cell line and medium

25

The CHO cell line used in this study was subcloned from DG44 parental cells and cultured in a proprietary growth medium.

Bioreactor operation

30

Bioreactor experiments were performed in 7-L, 500-L and 5000-L bioreactors with starting working volumes around 3 L, 300 L and 3000 L, respectively. All the bioreactor runs started at 37 °C and shifted to lower temperature when cells entered production phase in order to extend the cell culture period. pH, and dissolved oxygen were maintained at 7.05, and 50%

air saturation. Agitation rates for 7-L, 500-L and 5000-L scales are 180, 75 and 60 rpm respectively. All the bioreactor experiments were conducted in a fed batch mode with daily feeding of a protein-free medium in order to maintain the glucose and other nutrients at certain levels. Dexamethasone was included in the feed medium at all the production scales for the purpose of increasing cell viability and protein sialylation. Samples were taken during the cell culture process and analyzed for cell density, cell viability, substrates and metabolites.

The titer, sialic acid and HMW content assay were performed as described in the previous examples.

Results

Figures 18A and 18B present the bioreactor performance with respect to cell growth and viability. The cell growth through scale up from 7-L to 5000-L was observed to have similar peak viable cell densities between 12 to 13 x 10⁶ cells/mL with error bars representing the standard deviation of the runs at a particular scale overlapping at every time point. Cell densities peaked on Day 7 at 5000-L scale and at Day 8 for 7-L and 500-L scales. The Day 14 average viabilities of the cultures were 88%, 84%, and 91% at 7-L, 500-L, and 5000-L bioreactor scale, respectively. Figures 18C and 18D present the productivity and sialic acid profiles from 7-L, 500-L and 5000-L bioreactor scales. The Day 14 titers (reported as normalized value) were 13.2, 11.6, and 13.6 at 7, 500, and 5000-L scales, respectively. Peak sialic acid levels (reported as normalized value) were 16.0, 18.0 and 19.0 at increasing scales. The sialic acid dropped by approximately 2.6 units by the end of the runs for all scales.

Conclusion

Overall, with dexamethasone included in the feed medium performed well at all scales, indicating the feasibility of utilizing dexamethasone as medium additives for industrial scale production.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A cell culture process for the production of glycoproteins, comprising: a) culturing host cells which produce a glycoprotein in cell culture
5 under conditions that allow for protein production; and b) adding non-toxic levels of glucocorticoid.
2. The cell culture process of claim 1, wherein sialylation of the glycoprotein is increased compared to sialylation in a culture without
10 glucocorticoid addition.
3. The cell culture process of claim 1, wherein cell death is suppressed compared to cell apoptosis in a culture without glucocorticoid addition.
15
4. The cell culture process of claim 1, wherein cell viability is increased compared to cell viability in a culture without glucocorticoid addition.
5. The cell culture process of claim 1, wherein glycoprotein titer is
20 increased compared to glycoprotein titer in a culture without glucocorticoid addition.
6. The cell culture process of claim 1, wherein glycoprotein aggregation is decreased compared to glycoprotein aggregation in a culture
25 without glucocorticoid addition.
7. The cell culture process of claims 1-6, wherein the glucocorticoid is selected from the group consisting of dexamethasone, betamethasone, fludrocortisone acetate, hydrocortisone, methylprednisolone,
30 prednisolone, prednisone and triamcinolone.

8. The cell culture process of claims 1-6, wherein the host cells are mammalian cells.

9. The cell culture process of claim 8 wherein the mammalian cells
5 are selected from the group consisting of CHO, myeloma, and COS cells.

10. The cell culture process of claims 1-6, wherein the
glucocorticoid level is maintained in the cell culture at a concentration of 1nM
to 1mM.
10

11. The cell culture process of claims 1-6, wherein the
glucocorticoid is added to the basal media, the feed media or as a bolus
anytime during the culture process.

12. The process according to claims 1-6 wherein the glucocorticoid
15 is added at a time after inoculation that is before the beginning of the initial
death phase.

13. The process according to claim 12 wherein the glucocorticoid is
20 added at a time after inoculation that is during the initial growth phase.

14. The process according to claim 13, wherein the glucocorticoid is
added on or about the end of the initial growth phase

15. A cell culture process for the production of a soluble CTLA4
25 molecule, comprising: a) culturing CHO cells which produce a soluble CTLA4
molecule in cell culture under conditions that allow for protein production; and
b) feeding the cells with feeding medium containing dexamethasone.

16. The cell culture process of claim 15, wherein sialylation of the
30 soluble CTLA4 molecule is increased compared to sialylation in a culture
without feeding the cells with feeding medium containing dexamethasone.

17. The cell culture process of claim 15, wherein the soluble CTLA4 molecule is a soluble CTLA4 mutant molecule that comprises the amino acid sequence beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending at aspartic acid at position 124 as shown in SEQ ID NO: 3 joined to an immunoglobulin moiety comprising hinge, CH2 and CH3 domains, wherein dexamethasone is sustained or maintained in the cell culture at a concentration of 0.1 μ M to 10 μ M, and wherein the cell culture volume is at least 500 liters.

10

18. The cell culture process of claim 15, wherein the soluble CTLA4 molecule is a soluble CTLA4 mutant molecule that comprises the amino acid sequence beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending at aspartic acid at position 124 as shown in SEQ ID NO: 3 joined to an immunoglobulin moiety comprising hinge, CH2 and CH3 domains, wherein the cells are fed with a feed medium that contains dexamethasone, and wherein the cell culture volume is at least 500 liters.

19. The cell culture process of claim 15, wherein the soluble CTLA4 molecule comprises the amino acid sequence beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending at aspartic acid at position 124 as shown in SEQ ID NO: 1 joined to an immunoglobulin moiety comprising hinge, CH2 and CH3 domains, wherein dexamethasone is sustained or maintained in the cell culture at a concentration of 1nM to 0.1 μ M, and wherein the cell culture volume is at least 500 liters.

20. The cell culture process of claim 15, wherein the soluble CTLA4 molecule comprises the amino acid sequence beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending at aspartic acid at position 124 as shown in SEQ ID NO: 1 joined to an immunoglobulin moiety comprising hinge, CH2 and CH3 domains, wherein the cells are fed with a feed medium

that contains dexamethasone, wherein the cell culture volume is at least 500 liters.

21. The cell culture process of any one of claims 15, 19 and 20
5 wherein the soluble CTLA4 molecule comprises an amino acid sequence beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending at lysine at position +357 as shown in SEQ ID NO: 1.

22. The cell culture process of any one of claims 17 and 18, wherein the
10 soluble CTLA4 mutant molecule comprises an amino acid sequence beginning with methionine at position +1 or alanine at position -1 and ending at lysine at position +357 as shown SEQ ID NO: 3.

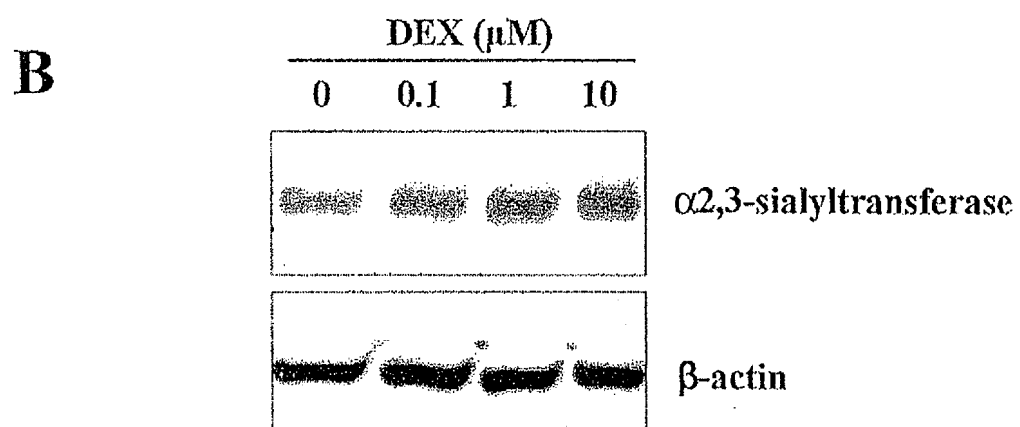
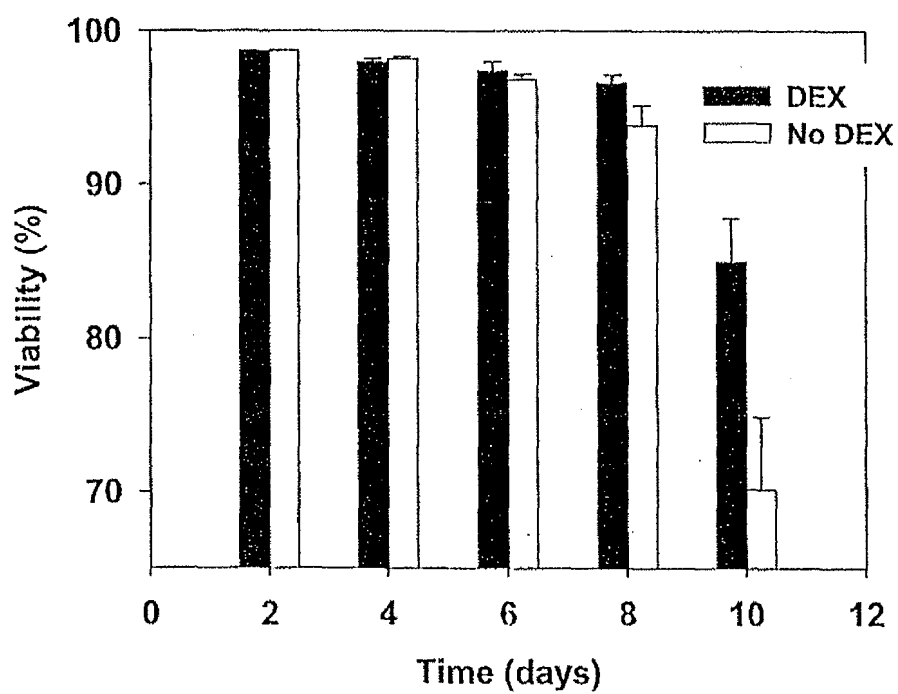


Fig. 2

A



B

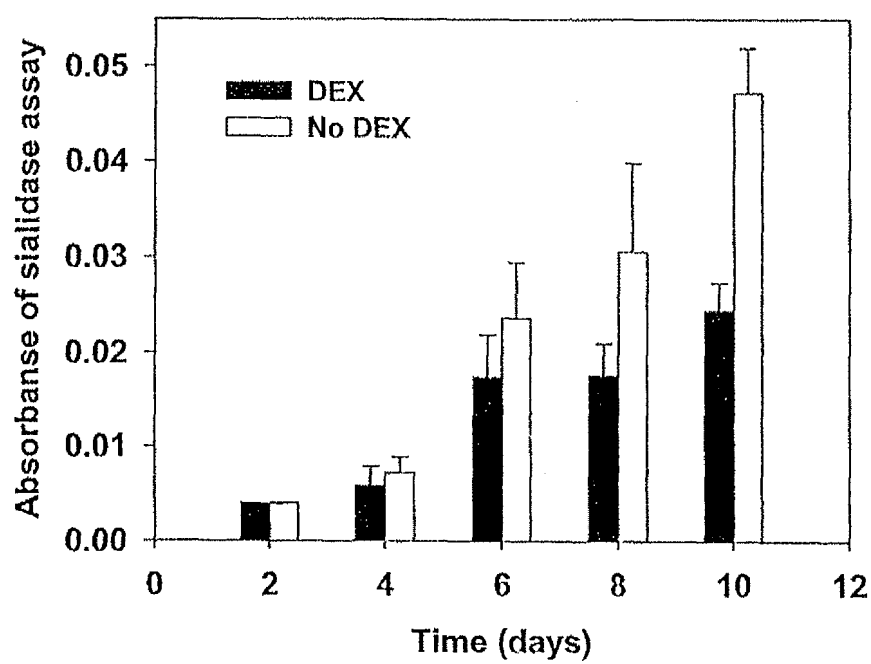
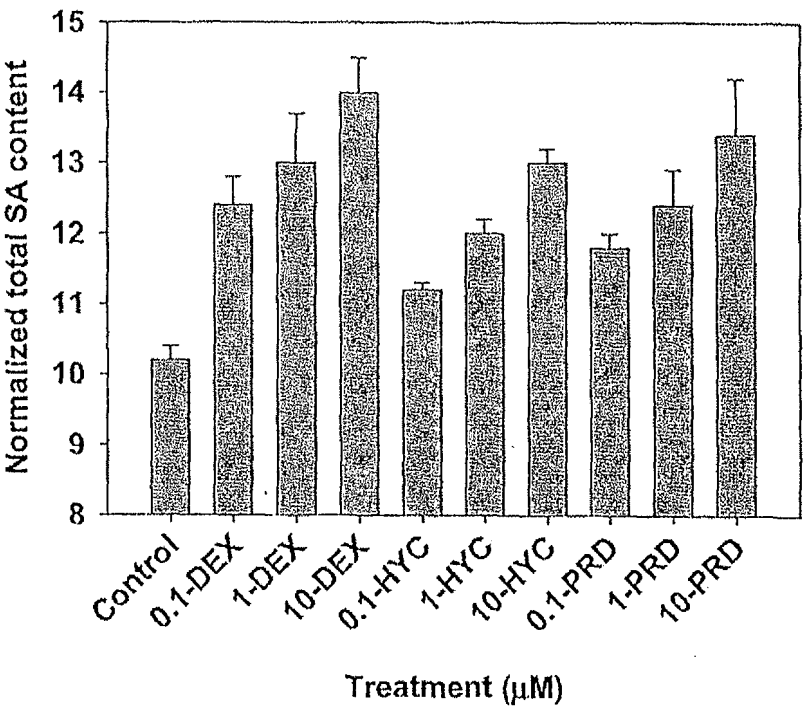


Fig.3

A



B

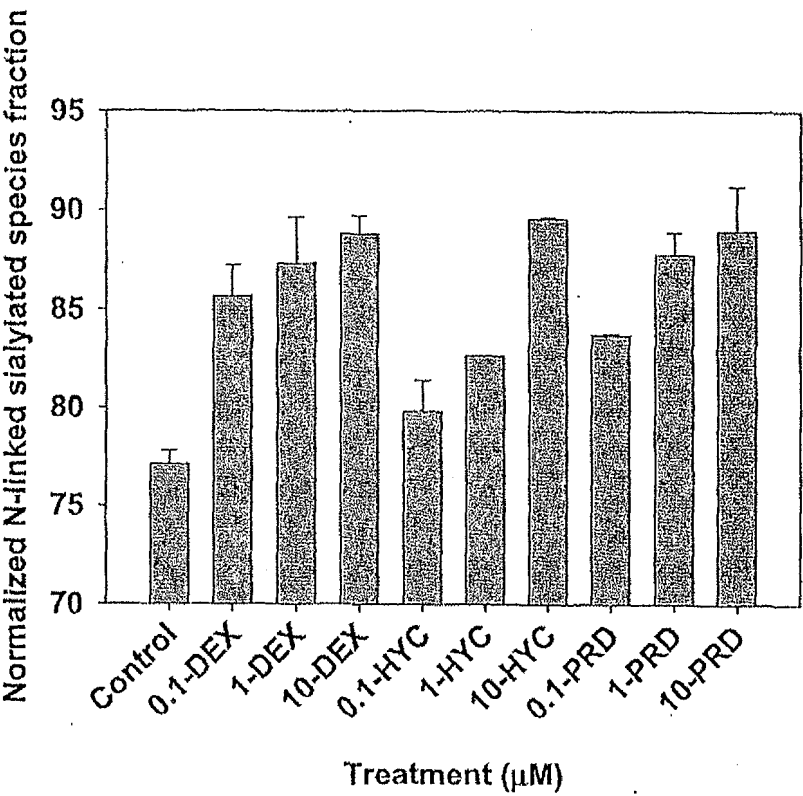
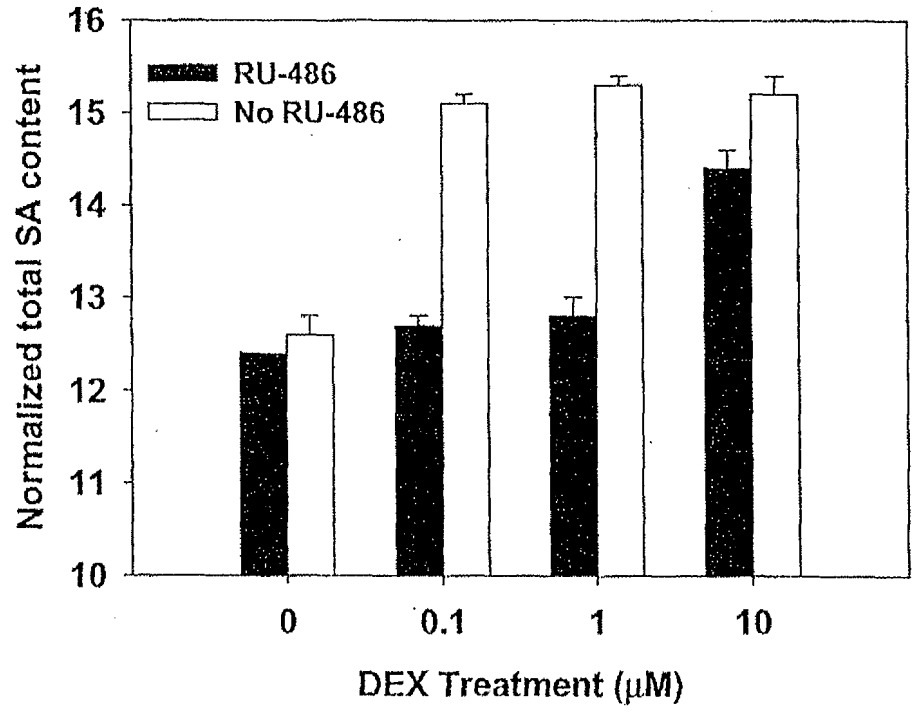


Fig.4

A



B

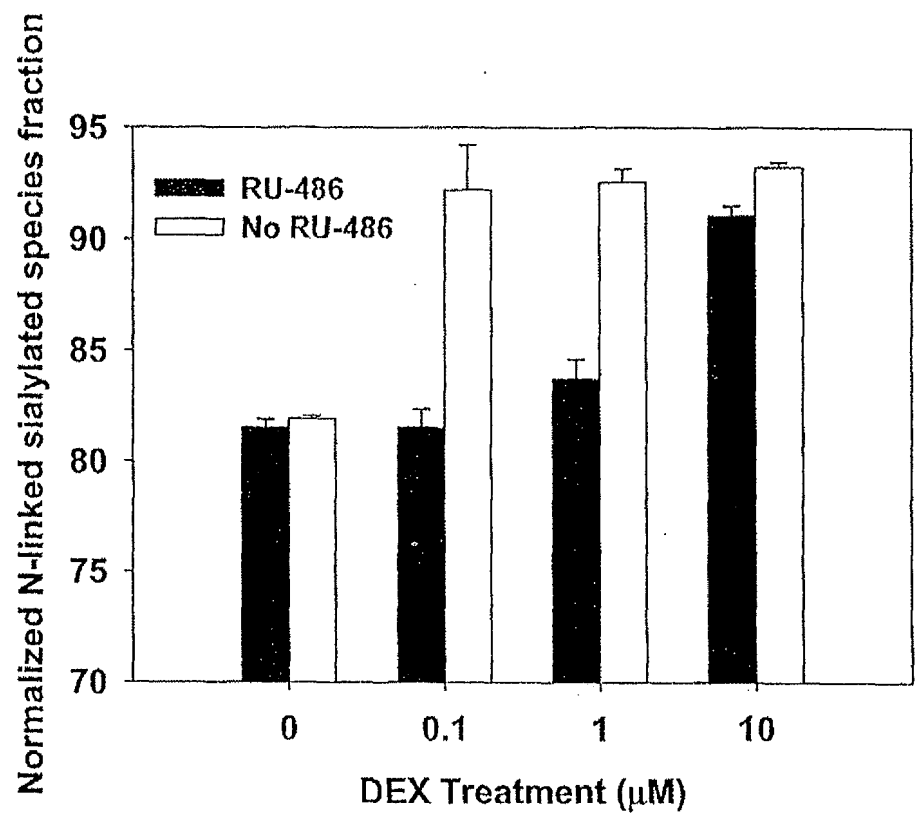
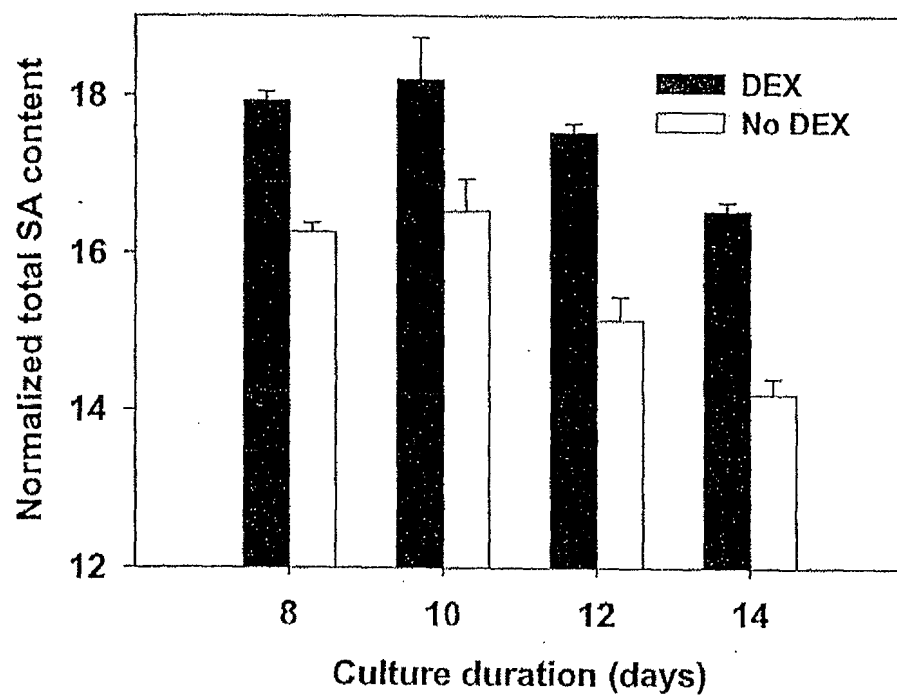


Fig.5

A



B

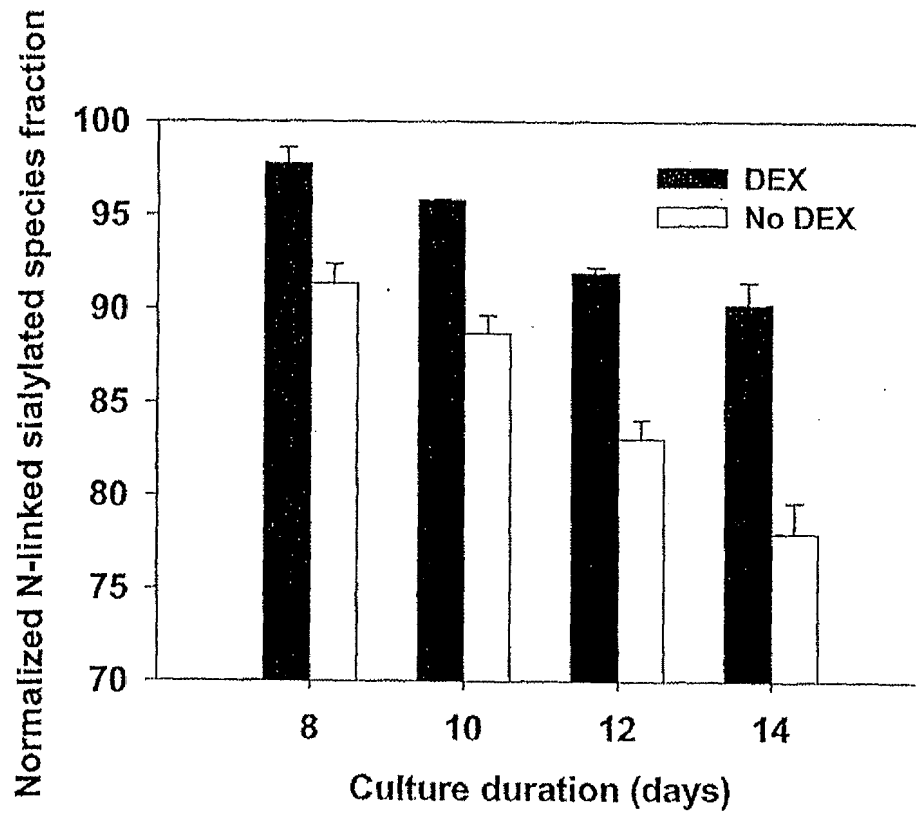
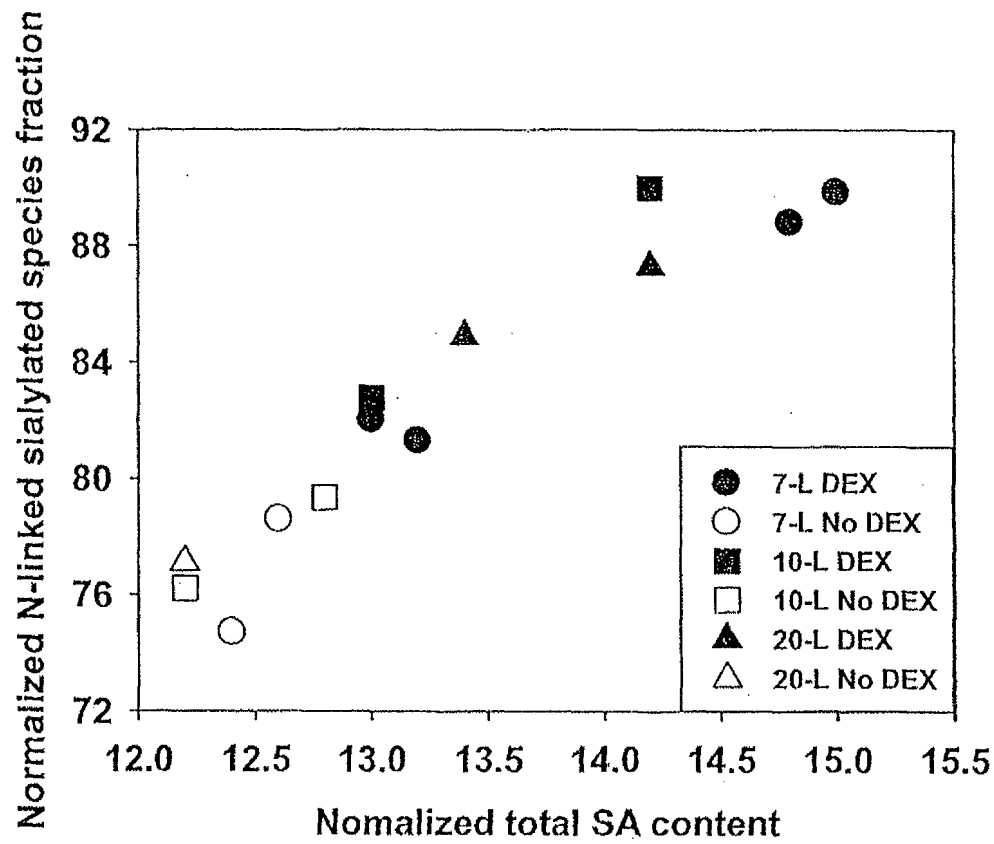


Fig.6



7/22

Fig. 7

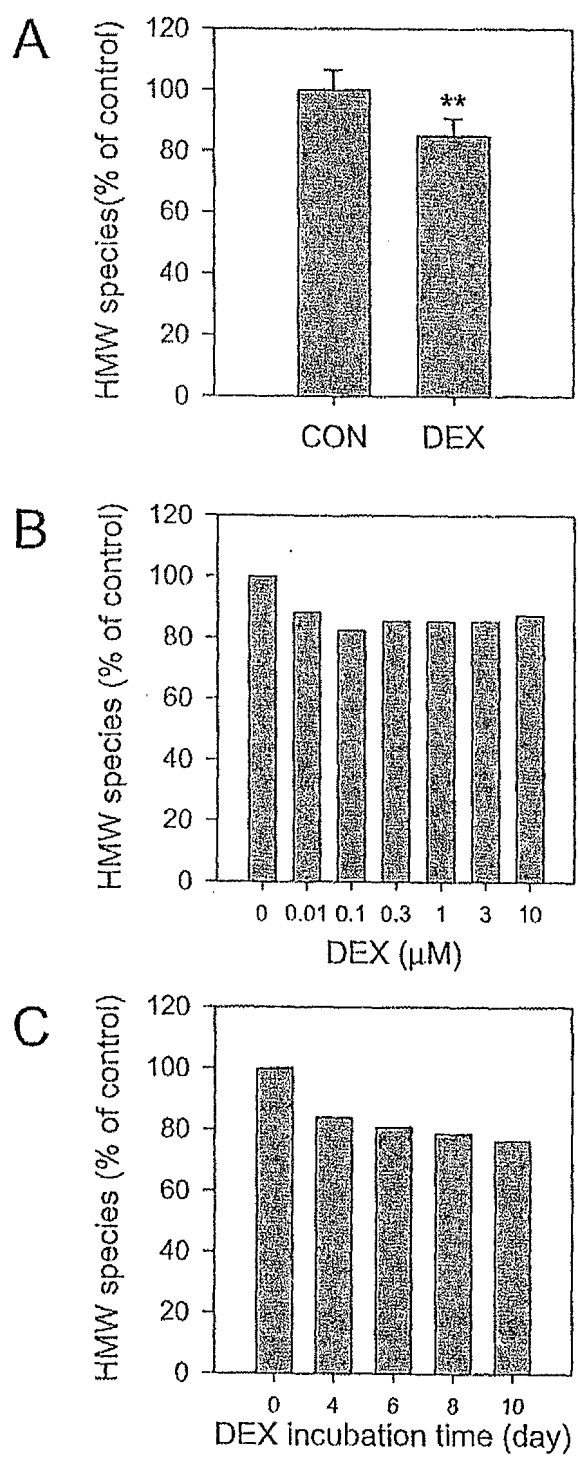


Fig. 8

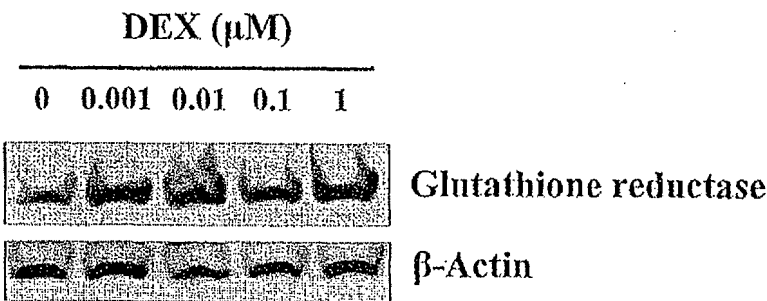


Fig. 9

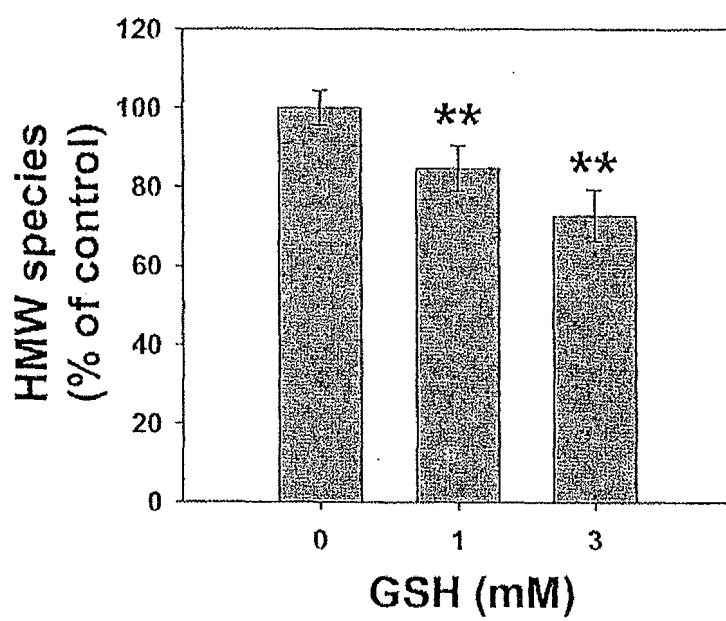
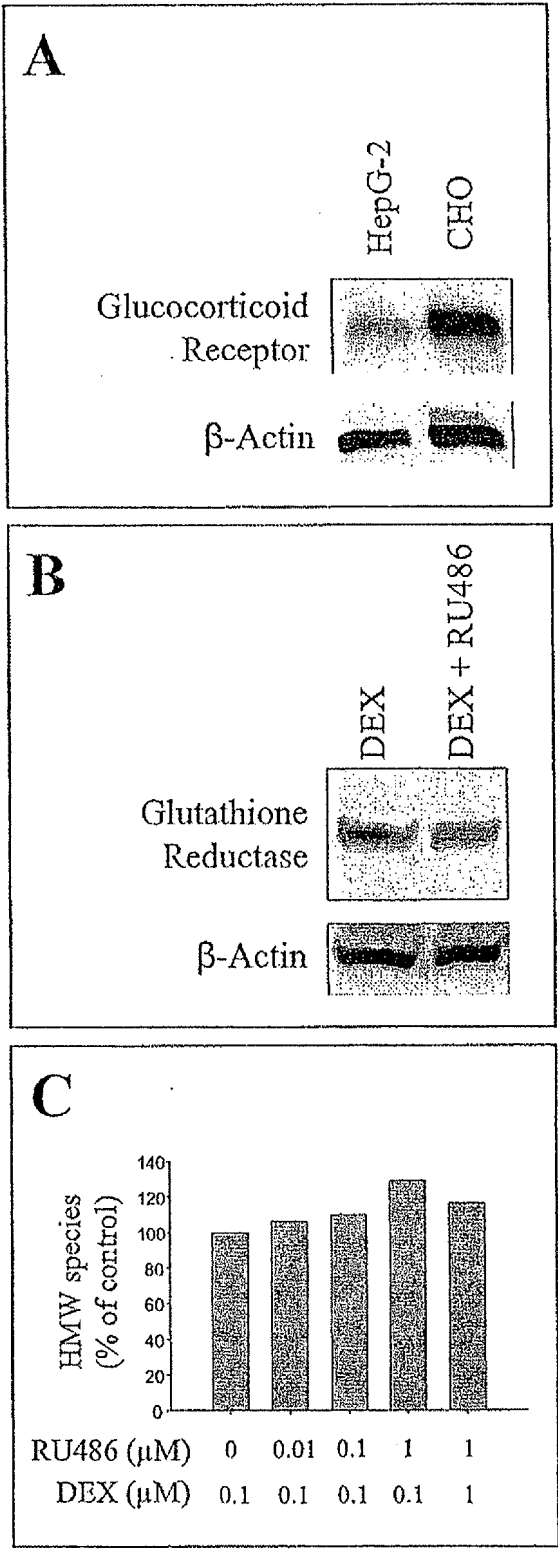
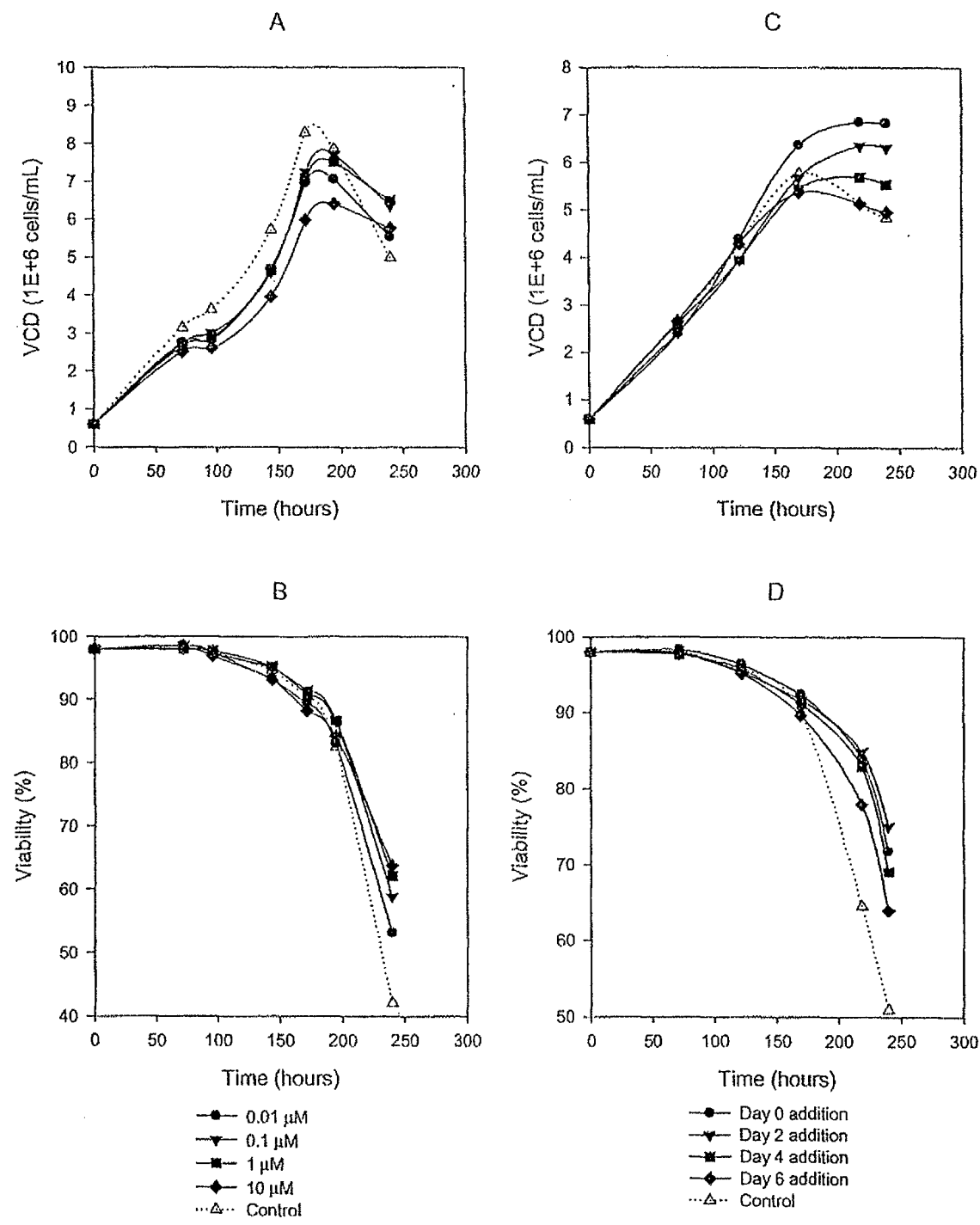


Fig. 10



11/22

Fig. 11



12/22

Fig. 12

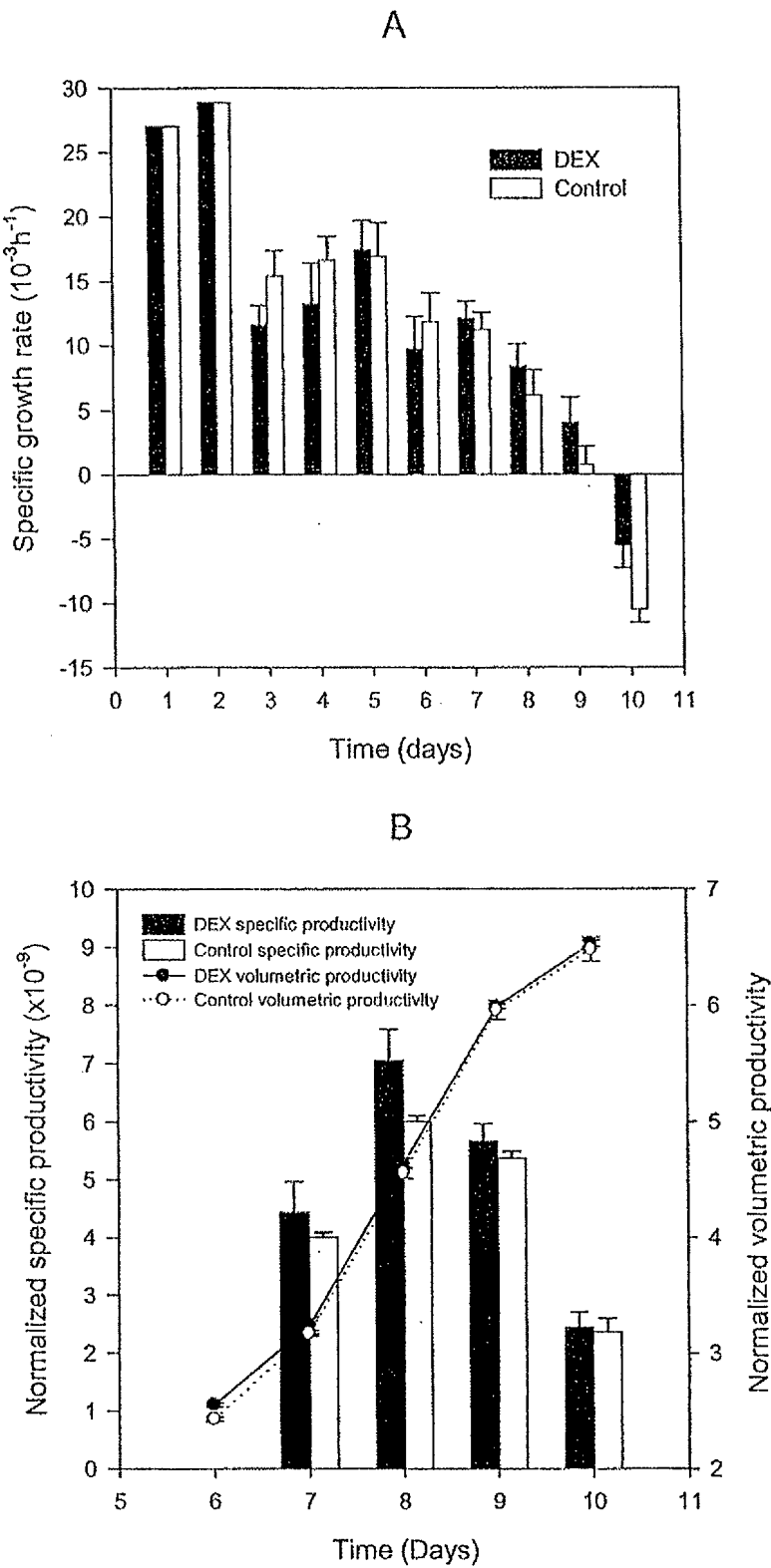
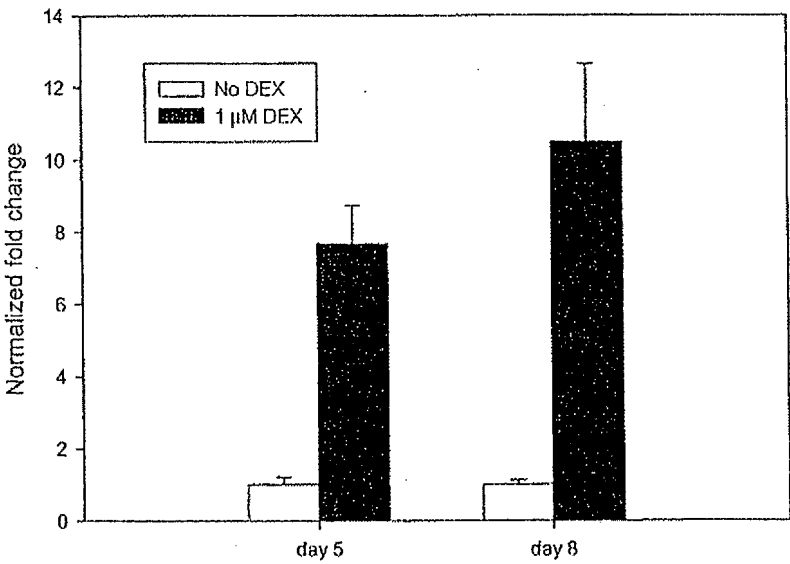


Fig. 13

A



B

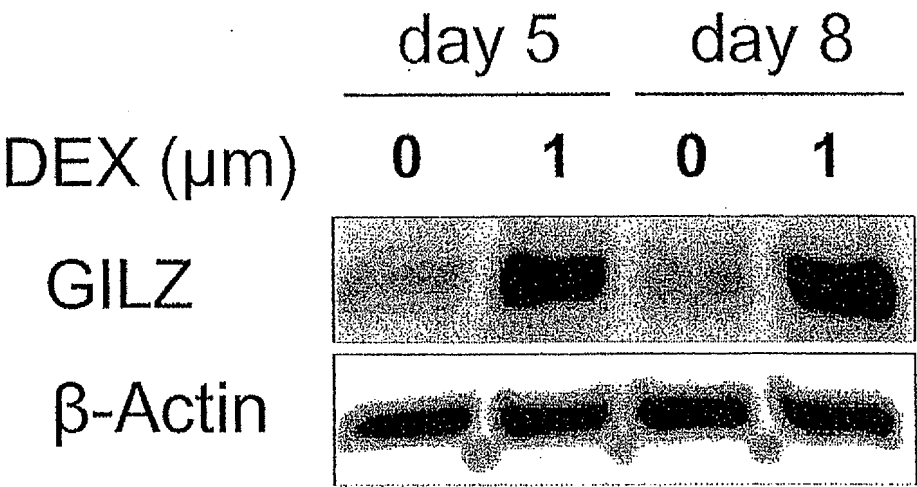
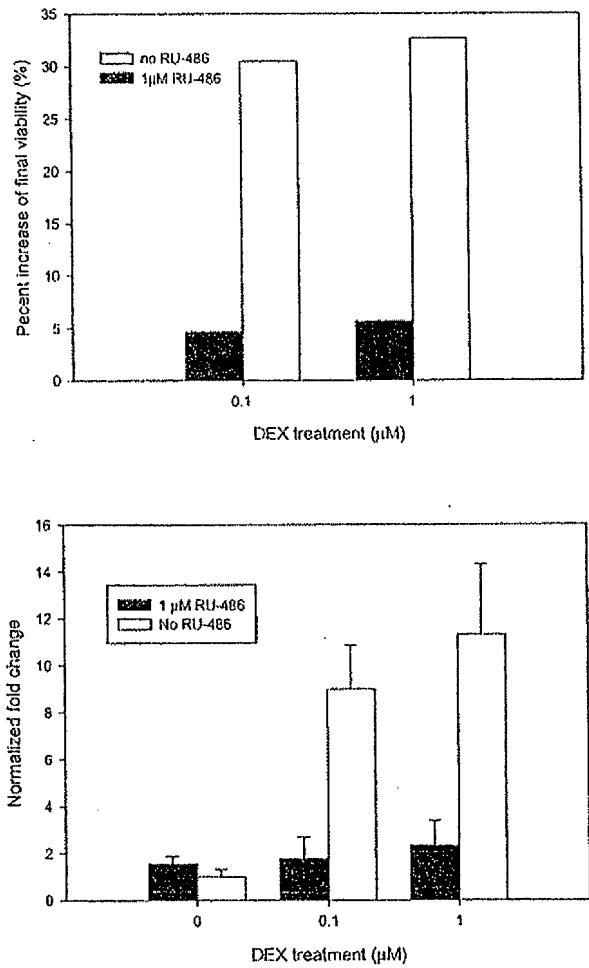


Fig. 14



RU-486 (μM)	0	0	0	1	1	1
DEX (μM)	0	0.1	1	0	0.1	1

GILZ						
β-Actin						

Fig. 15

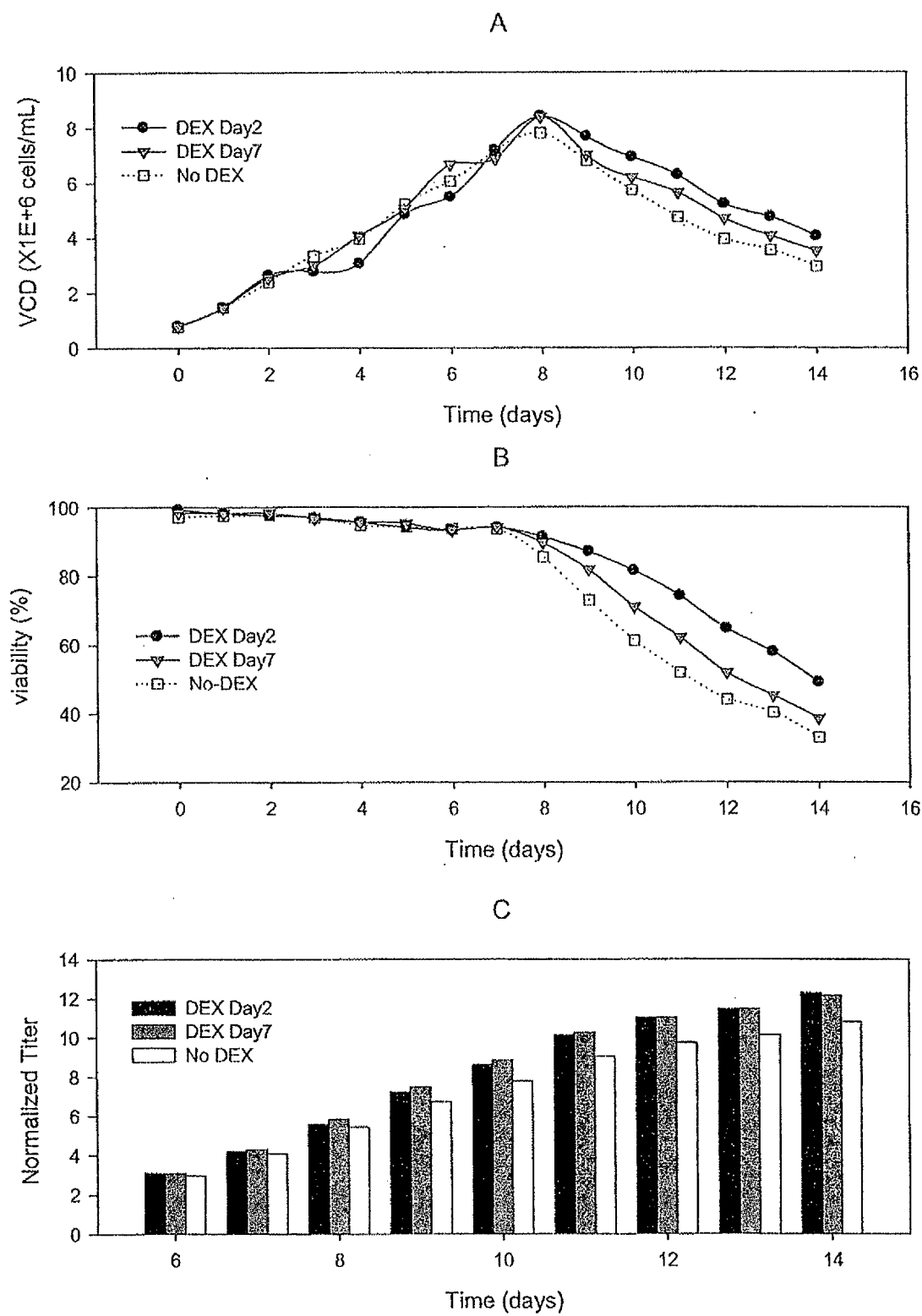


Fig. 16

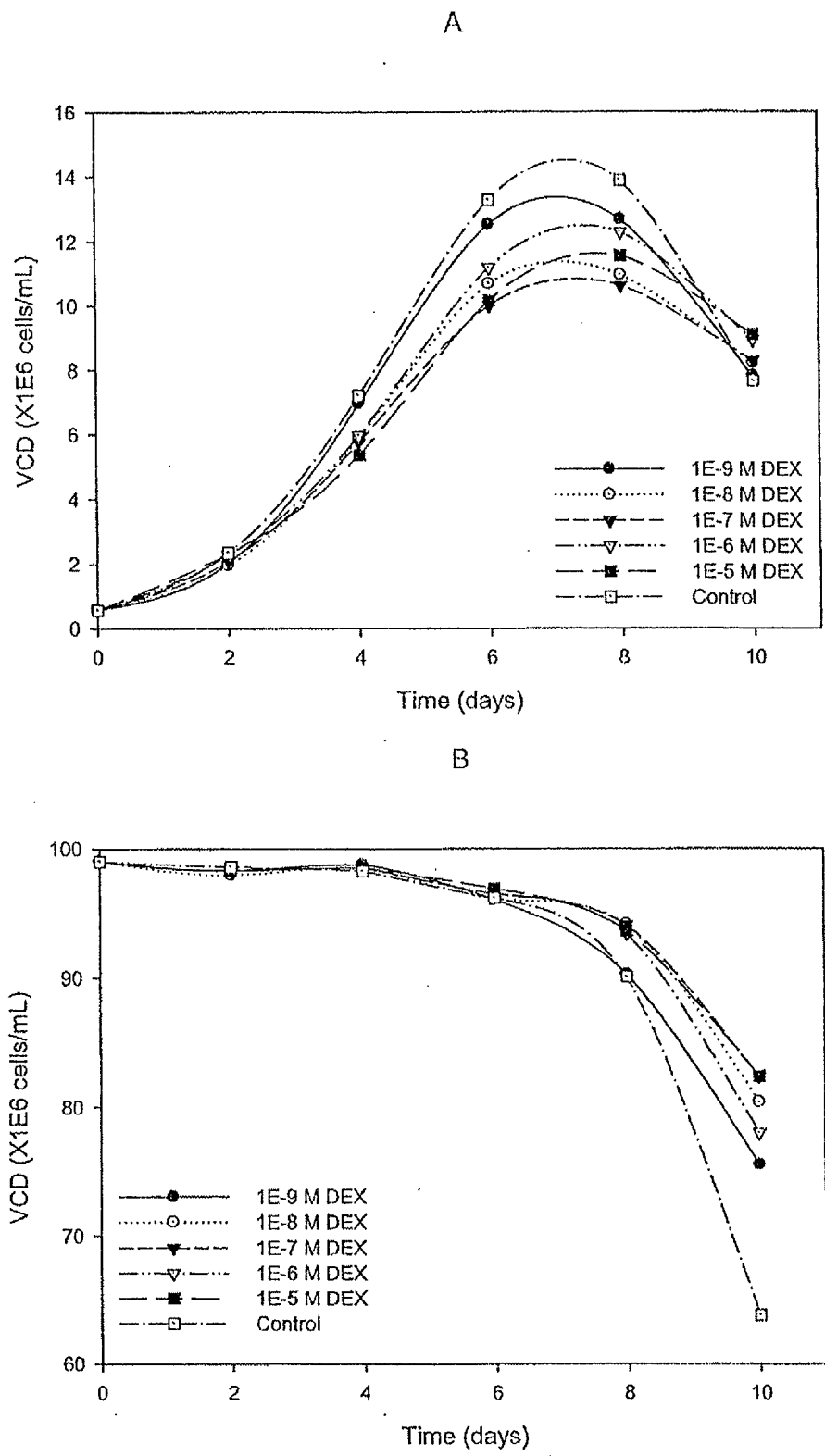


Fig. 17

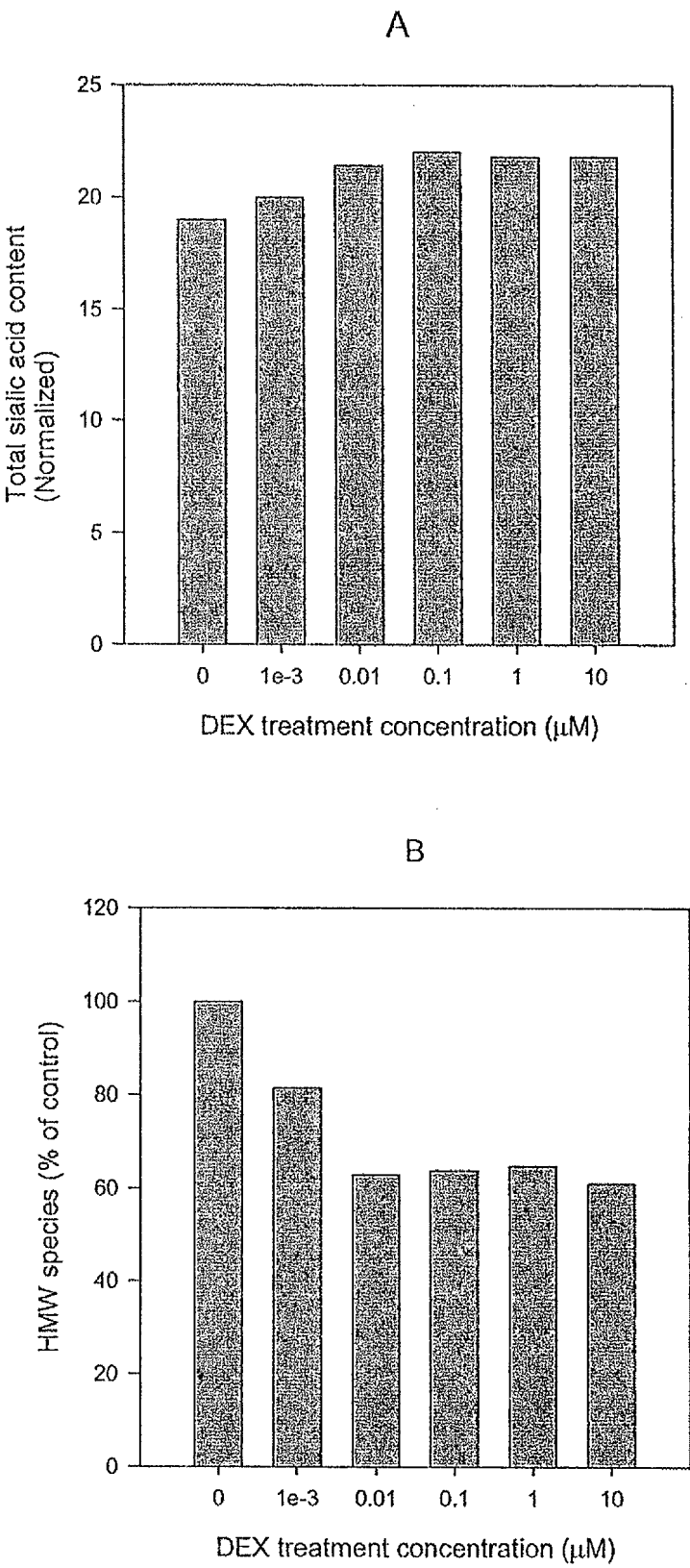
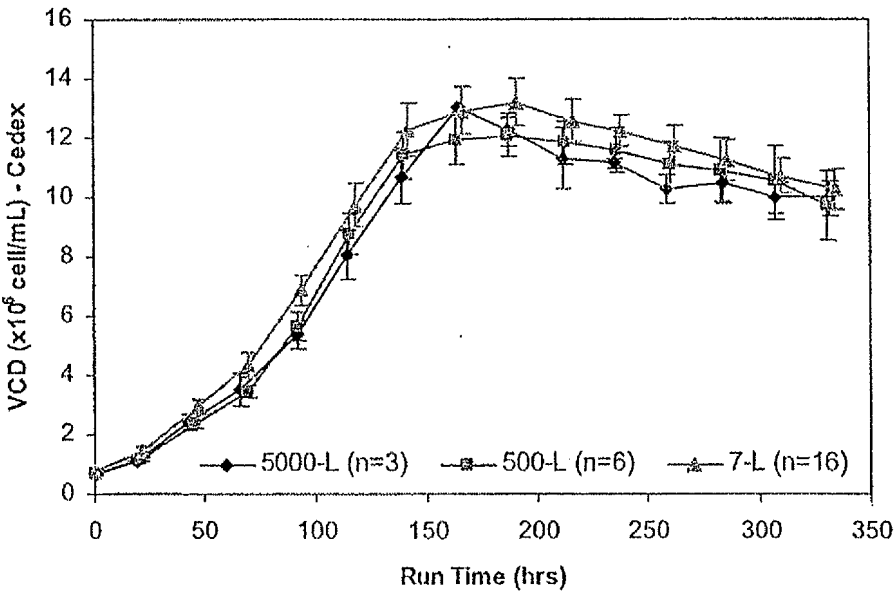
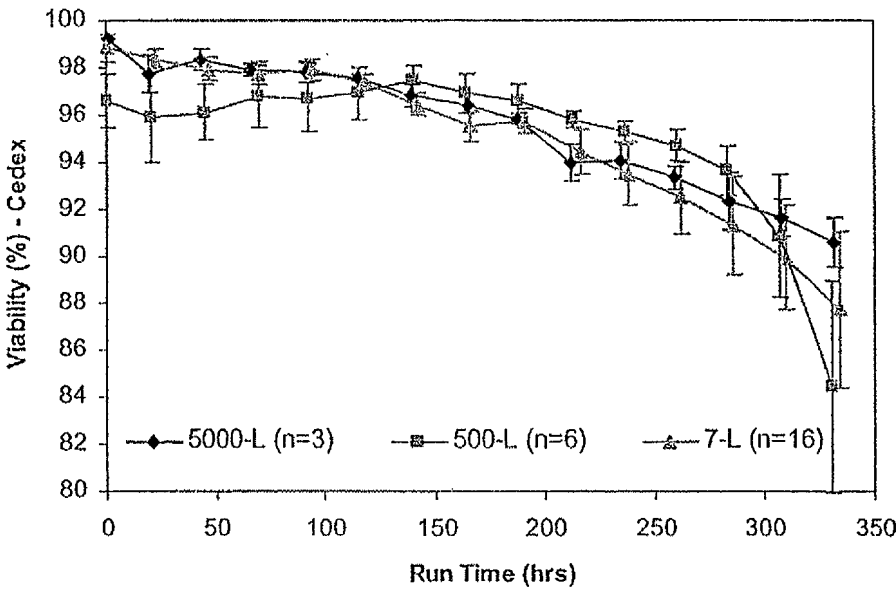


Fig. 18 A/B

A

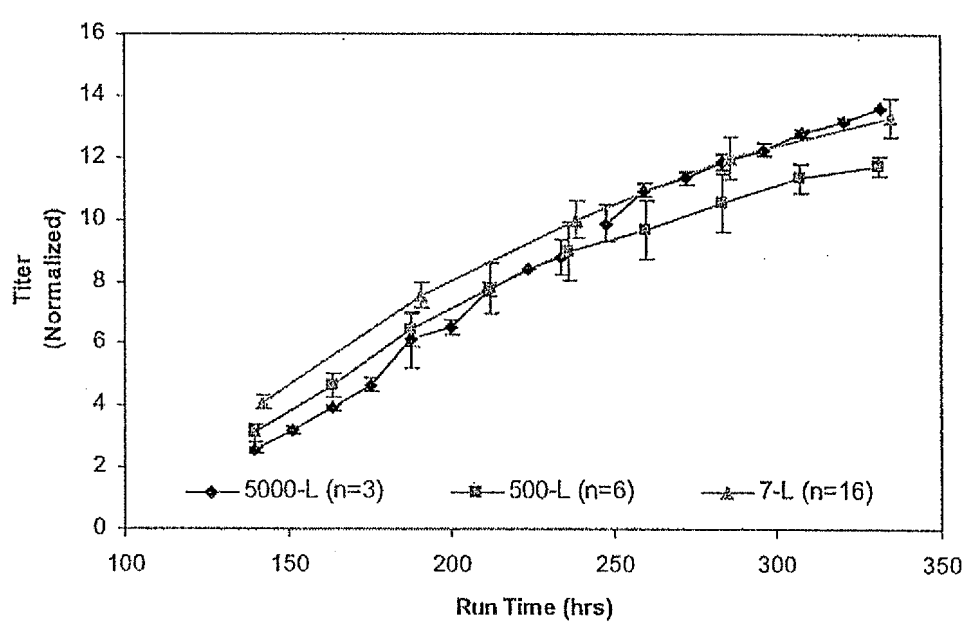


B



C

Fig. 18 C/D



D

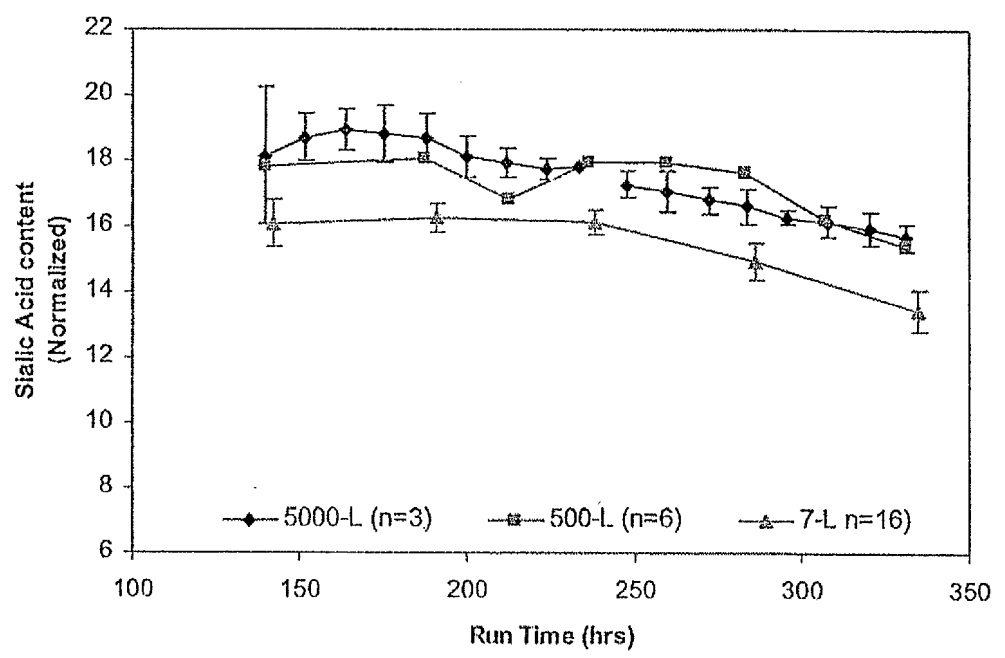


FIG. 19

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCAGGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAACTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCAGGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAANTGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCCTGGTCAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

FIG. 20

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCCTGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGACTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAUUCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--J--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCATT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--R--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

20101006_ST25_11400WOPCT.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Jing Ying

<120> MAMMALIAN CELL CULTURE PROCESSES FOR PROTEIN PRODUCTION

<130> 11400 WO PCT

<150> 61/278,343

>151> 2009/10/06

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1149)

<400> 1

atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca	48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala	
1 5 10 15	

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct	96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro	
20 25 30	

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag	144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu	
35 40 45	

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg	192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg	
50 55 60	

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg	240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met	
65 70 75 80	

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc	288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser	
85 90 95	

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac	336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp	
100 105 110	

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac	384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr	
115 120 125	

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa	432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu	
130 135 140	

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac	480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His	
145 150 155 160	

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggt gga tcg tca gtc	528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val	
165 170 175	

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc	576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	
180 185 190	

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag	624
---	-----

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
		195					200					205					
gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag		672
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
		210				215					220						
aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc		720
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
		225			230					235					240		
gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag		768
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
				245					250					255			
tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc		816
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
			260					265					270				
tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc		864
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
		275					280					285					
cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg		912
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
		290				295					300						
gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat		960
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
		305			310					315					320		
ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc		1008
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
				325					330					335			
gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg		1056
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
			340					345					350				
tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg		1104
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
		355				360						365					
cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggg	aaa	tga		1152
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
		370				375					380						

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Ala		
1				5					10					15			
Leu	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Met	Ala	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro		
			20					25					30				
Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu		
		35					40					45					
Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg		
	50				55					60							
Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met		
65				70					75					80			
Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser		

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

85

90

95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 3

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

<211> 1152
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1149)

<400> 3
 atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30
 gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag 144
 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45
 tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
 Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60
 cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg 240
 Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80
 ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc 288
 Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95
 agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac 336
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110
 acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac 384
 Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125
 tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432
 Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140
 ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac 480
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160
 aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc 528
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175
 ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 576
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190
 cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205
 gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220
 aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 720
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255
 tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

260

265

270

tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	864
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
		275					280					285				
cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	912
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
		290				295					300					
gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	960
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
305					310					315					320	
ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	1008
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				325					330					335		
gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	1056
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			340					345					350			
tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	1104
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
		355				360						365				
cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa	tga	1152
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
	370					375					380					

<210> 4
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 5
<211> 636
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

<400> 5
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15
ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

gct	gtg	gta	ctg	gcc	agc	agc	cga	ggc	atc	gcc	agc	ttt	gtg	tgt	gag	144
Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	
		35					40					45				
tat	gca	tct	cca	ggc	aaa	gcc	act	gag	gtc	cgg	gtg	aca	gtg	ctt	cgg	192
Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	
	50					55					60					
cag	gct	gac	agc	cag	gtg	act	gaa	gtc	tgt	gcg	gca	acc	tac	atg	atg	240
Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	
65					70					75					80	
ggg	aat	gag	ttg	acc	ttc	cta	gat	gat	tcc	atc	tgc	acg	ggc	acc	tcc	288
Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	
				85					90					95		
agt	gga	aat	caa	gtg	aac	ctc	act	atc	caa	gga	ctg	agg	gcc	atg	gac	336
Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	
			100					105					110			
acg	gga	ctc	tac	atc	tgc	aag	gtg	gag	ctc	atg	tac	cca	ccg	cca	tac	384
Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	
		115					120					125				
tac	ctg	ggc	ata	ggc	aac	gga	acc	cag	att	tat	gta	att	gat	cca	gaa	432
Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	
	130					135					140					
ccg	tgc	cca	gat	tct	gac	ttc	ctc	ctc	tgg	atc	ctt	gca	gca	gtt	agt	480
Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Phe	Leu	Leu	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	
145					150					155					160	
tcg	ggg	ttg	ttt	ttt	tat	agc	ttt	ctc	ctc	aca	gct	gtt	tct	ttg	agc	528
Ser	Gly	Leu	Phe	Phe	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	
				165				170						175		
aaa	atg	cta	aag	aaa	aga	agc	cct	ctt	aca	aca	ggg	gtc	tat	gtg	aaa	576
Lys	Met	Leu	Lys	Lys	Arg	Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Gly	Val	Tyr	Val	Lys	
			180					185					190			
atg	ccc	cca	aca	gag	cca	gaa	tgt	gaa	aag	caa	ttt	cag	cct	tat	ttt	624
Met	Pro	Pro	Thr	Glu	Pro	Glu	Cys	Glu	Lys	Gln	Phe	Gln	Pro	Tyr	Phe	
		195					200					205				
att	ccc	atc	aat													636
Ile	Pro	Ile	Asn													
			210													

<210> 6
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

20101006_ST25_11400WOPCT.txt

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
 145 150 155 160

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
 165 170 175

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
 180 185 190

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
 195 200 205

Ile Pro Ile Asn
 210

METODOS DE PRODUCCION DE GLUCOPROTEINAS EN CULTIVOS DE
CELULAS DE MAMIFEROS USANDO GLUCOCORTICOIDES

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos nuevos
para cultivar células de mamíferos que producen un producto
proteico, preferentemente un producto proteico glucosilado.
El llevar a cabo los métodos de cultivo celular da como
resultado una viabilidad celular alta y también puede dar
10 como resultado una calidad de producto y una productividad
alta, una prolongación de la fase de crecimiento y la
reducción de la tasa de muerte en la fase de muerte.

Antecedentes de la Invención

El cultivo de células animales, en particular el
15 cultivo de células de mamíferos, se usa preferentemente para
la expresión de proteínas glucosiladas producidas de forma
recombinante, para aplicaciones terapéuticas y/
profilácticas. Los patrones de glucosilación de
glucoproteínas recombinantes son importantes porque las
20 cadenas laterales de oligosacáridos de las glucoproteínas
afectan a la función proteica, así como a las interacciones
intramoleculares entre diferentes regiones de una proteína.
Dichas interacciones intramoleculares están implicadas en la
conformación proteica y en la estructura terciaria de la
25 glucoproteína. (Véase, por ejemplo, A. Wittwer y col., 1990,

Biochemistry, 29:4175-4180; Hart, 1992, *Curr. Op. Cell Biol.*, 4:1017-1023; Goochee y col., 1991, *Bio/Technol.*, 9:1347-1355; y R.B. Parekh, 1991, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1:750-754). Además, los oligosacáridos pueden actuar dirigiendo un
5 polipéptido particular a determinadas estructuras basadas en receptores de carbohidratos celulares específicos. (M.P. Bevilacqua y col., 1993, *J. Clin. Invest.*, 91:379-387; R.M. Nelson y col., 1993, *J. Clin. Invest.*, 91:1157-1166; K.E. Norgard y col., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1068-
10 1072; e Y. Imai y col., 1993, *Nature*, 361:555-557).

Se sabe que el componente ácido siálico terminal de una cadena lateral de oligosacáridos de una glucoproteína tiene un efecto sobre numerosos aspectos de propiedades de una glucoproteína, incluidos absorción, solubilidad,
15 estabilidad térmica, semivida en suero, eliminación del suero, así como sobre su estructura/comportamiento físico y químico y su inmunogenicidad. (A. Varki, 1993, *Glycobiology*, 3:97-100; R.B. Parekh, *Id.*, Goochee y col., *Id.*, J. Paulson y col., 1989, *TIBS*, 14:272-276 y A. Kobata, 1992, *Eur. J. Biochem.*, 209:483-501; E.Q. Lawson y col., 1983, *Arch. Biochem. Biophys.*, 220:572-575; y E. Tsuda y col., 1990, *Eur. J. Biochem.*, 188:405-411).

La cantidad de ácido siálico en glucoproteínas se ve afectada por dos procesos opuestos: la adición
25 intracelular de ácido siálico mediante la actividad de la

sialiltransferasa y la eliminación extracelular de ácido siálico mediante escisión por sialidasa.

La adición intracelular de ácido siálico es la última etapa del proceso de glucosilación que tiene lugar en el trans-Golgi. Esto implica la transferencia enzimática de ácido siálico desde el precursor de azúcar del nucleótido, CMP-ácido siálico, a una galactosa disponible en la estructura glucano emergente que está unida a una proteína recién sintetizada. Posibles limitaciones de este proceso que pueden causar la sialilación incompleta incluyen la disponibilidad de CMP-ácido siálico, la actividad de la enzima sialiltransferasa, la cantidad de galactosa en la estructura glucano emergente y la actividad de la enzima galactosiltransferasa. Una serie significativa de investigaciones se ha centrado en maximizar la sialilación mediante la sobreexpresión génica y la potenciación de la actividad enzimática de la sialiltransferasa y de la glucosiltransferasa. Zhang y col. (Biochim Biophys Acta 1425(3):1998, 441-52) han indicado que la expresión de α -2,6-sialiltransferasa humana en células CHO con la producción de activador del plasminógeno hístico (tPA, por sus siglas en inglés) potencia la α -2,6-sialilación de tPA. Weikert y col. (Nat Biotechnol 17(11):1999, 1116-21) han reseñado que la coexpresión de α -2,3-sialiltransferasa y β -1,4-galactosiltransferasa se traduce en una sialilación superior

al 90% de TNK-tPA y TNFR-IgG. Además, la suplementación con la cantidad apropiada de manganeso (Mn^{2+}), un cofactor para la β -1,4-galactosiltransferasa, disminuyó en gran medida la cantidad de rHuEPO en la fracción sialilada inferior, aumento
5 la ocupación del sitio carbohidrato y redujo la ramificación del carbohidrato (Zhang y col. 1998) a estructuras biantenarias en dichas especies sialiladas inferiores (Crowell y col. Biotechnol Bioeng 96(3):538-49,2007).

La cantidad de ácido siálico en glucoproteínas se
10 ve afectada también por la eliminación extracelular de ácido siálico mediante escisión por sialidasa. Gramer y Goochee (Biotechnol Prog 9(4):366-73,1993) han demostrado un aumento de lactato deshidrogenasa (LDH), que se traduce en un aumento de la lisis celular, asociado a un aumento de la actividad de
15 sialidasa extracelular in cultivos en perfusión de CHO. Gu y col.(Biotechnol Bioeng 55(2):390-8, 1997) ilustran también una pérdida notable de ácidos siálicos terminales de interferón- γ (IFN- γ) junto con una disminución de viabilidad celular en células CHO y el aumento concomitante de células
20 muertas en todo el cultivo en lotes a largo plazo.

En consecuencia, es esencial retrasar la aparición de muerte celular y mejorar la viabilidad celular para reducir o evitar el efecto de degradación.

En general, los niveles de expresión de proteínas
25 en sistemas basados en cultivos de células de mamíferos son

considerablemente inferiores que en los sistemas de expresión microbiana, por ejemplo, sistemas de expresión bacteriana o de levaduras. No obstante, las células bacterianas y de levadura están limitadas en su capacidad para expresar de
5 forma óptima productos proteicos de alto peso molecular, plegar apropiadamente una proteína que tiene una estructura estérica compleja y/o proporcionar las modificaciones postraduccionales necesarias para madurar una glucoproteína expresada, afectando, por consiguiente, la inmunogenicidad y
10 la tasa de eliminación del producto.

Como consecuencia de las limitaciones del cultivo de células animales o de mamíferos, en particular de células animales o de mamíferos que producen productos recombinantes, se ha investigado la manipulación de una variedad de
15 parámetros, incluidos el empleo de recipientes de cultivo a gran escala, la alteración de las condiciones básicas de cultivo, tales como la temperatura de incubación, la concentración de oxígeno disuelto, el pH y similares, el uso de diferentes tipos de medios y de aditivos de los medios y
20 el aumento de la densidad de las células cultivadas. Además, el desarrollo del método de cultivo de células de mamífero se beneficiaría de los avances en la capacidad para prolongar los tiempos de ejecución para aumentar la concentración final de producto mientras se mantiene una calidad alta de
25 producto. Un parámetro importante de calidad del producto es

el grado y la completación de la estructura de glucosilación de un producto polipeptídico, usándose comúnmente como medida de la calidad de glucoproteínas el contenido en ácido siálico.

- 5 Los tiempos de ejecución de los métodos de cultivo celular, en particular los métodos no continuos, están limitados generalmente por la viabilidad remanente de las células, que disminuye habitualmente con el transcurso del proceso. Se desea, por lo tanto, la máxima prolongación
- 10 posible de las viabilidades celulares altas. Las consideraciones sobre la calidad del producto ofrecen también una motivación para minimizar disminuciones en la densidad celular viable y mantener una viabilidad celular alta, ya que la muerte celular puede liberar sialidasas al sobrenadante
- 15 del cultivo, lo que puede reducir el contenido de ácido siálico de la proteína expresada. Las consideraciones sobre la purificación proteica ofrecen también otra motivación para minimizar disminuciones en la densidad celular viable y mantener una viabilidad celular alta. La presencia de
- 20 desechos celulares y el contenido de células muertas en el cultivo pueden influenciar negativamente en la capacidad para aislar y/o purificar el producto proteico al final del proceso de cultivo. Manteniendo células viables en cultivo durante un periodo más largo, existe, por lo tanto, una
- 25 reducción concomitante de la contaminación del medio de

cultivo debida a proteínas y enzimas celulares, por ejemplo, proteasas y sialidasas celulares que pueden provocar la degradación y la reducción última de la calidad de las glucoproteínas deseadas producidas por las células.

5 Se han investigado diversos parámetros para lograr una viabilidad celular alta en cultivos celulares. Un parámetro implicó una disminución única de la temperatura del cultivo después de un cultivo inicial a 37 °C (por ejemplo, Roessler y col., 1996, *Enzyme and Microbial Technology*,
10 18:423-427; documentos de patente de Estados Unidos N° 5,705,364 y 5,721,121 por T. Etcheverry y col., 1998; documento de patente de Estados Unidos N° 5,976,833 por K. Furukawa y col., 1999; documento de patente de Estados Unidos N° 5,851,800 por L. Adamson y col.; documentos WO 99/61650 y
15 WO 00/65070 por Genentech, Inc.; documento WO 00/36092 por Biogen, Inc.; y documento de patente de Estados Unidos N° 4,57,22 por Girard y col.).

Otros parámetros investigados implicaron la adición de componentes al cultivo. Se demostró que el inhibidor del
20 factor de crecimiento suramina previene la apoptosis durante el crecimiento exponencial de células CHO K1:CycE (Zhang y col., *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 319-325). No obstante, la suramina no protegió frente a la apoptosis durante la fase de muerte. Como resultado, la suramina fue capaz de mantener una
25 viabilidad alta durante la fase de crecimiento, pero no

provocó un prolongamiento de la longevidad del cultivo. Los mismos autores informan que para la línea celular CHO 111-10PF, el sulfato de dextrano y el sulfato de polivinilo podrían, similarmente a la suramina, aumentar la densidad celular viable y la viabilidad relativa al cultivo de control en el día 3. No obstante, no se informó del efecto del sulfato de dextrano o del sulfato de polivinilo durante la fase de muerte. También se informó que la suramina, el sulfato de dextrano y el sulfato de polivinilo son eficaces en la prevención de la agregación celular.

Los efectos de suplementar los medios de cultivo de células de insectos con dexametasona o N-acetilmanosamina sobre proteínas de glucosilación complejas, incluida la adición de residuos terminales de ácido siálico a oligosacáridos unidos a N, preparados mediante el sistema vector de expresión de baculovirus (BEVS, por sus siglas en inglés) se da a conocer en el documento de patente de Estados Unidos N° 6,472,175 por Boyce Thompson Institute For Plant Research, Inc. (Ithaca, NY, EEUU), 2002.

Los productos terapéuticos proteicos son inherentemente heterogéneos debido a su tamaño, complejidad de estructura y la naturaleza de producción biológica (Chirino y Mire-Sluis, *Nat Biotechnol.* 2004; 22:1383-1391). Incluso en el solución proteica "pura", estarán presentes algunos porcentajes de fragmentos de peso molecular bajo,

especies de peso molecular alto y varios grados de modificaciones químicas. La formación de especies de alto peso molecular se debe generalmente a la agregación de proteínas, lo que es un problema común que se presenta
5 durante la fabricación de productos biológicos. Habitualmente, la presencia de agregados se considera no deseable, debido al problema de que los agregados pueden provocar una reacción inmunógena o pueden causar reacciones adversas sobre la administración (Cromwell y col., *AAPS J.*
10 2006; 8:E572-579). Aunque algunos tipos de agregados de productos biológicos pueden actuar con normalidad, es también importante mantener la consistencia en la calidad del producto ya que la consistencia del producto es un prerrequisito para la aprobación regulatoria.

15 Los agregados de proteínas pueden generarse por medio de varios mecanismos y tener lugar en cada etapa durante el método de fabricación. En cultivo celular, las proteínas secretadas pueden exponerse a condiciones desfavorables para la estabilidad proteica, pero más
20 frecuentemente, la acumulación de altas cantidades de proteína puede provocar la agregación intracelular debido bien a las interacciones de proteínas no plegadas o bien al reconocimiento ineficaz de la cadena peptídica incipiente por chaperones responsables del plegamiento apropiado (Cromwell
25 et al, *AAPS J.* 2006; 8:E572-579). En el retículo endoplásmico

(RE) de las células, se forman enlaces disulfuro en proteínas recién sintetizadas en un ambiente oxidante. En condiciones normales, los sulfhidrilos proteicos se oxidan de forma reversible dando disulfuros y ácidos sulfénicos proteicos, pero los estados oxidados más elevados tales como las formas de ácido sulfínico o sulfónico de cisteínas proteicas son irreversibles (Thomas y Mallis, *Exp Gerontol.* 2001; 36:1519-1526). Las proteínas hiperoxidadas pueden contener enlaces disulfuro incorrectos o tener enlaces disulfuro mixtos con otras proteínas RE lumbinales, en cuyo caso provocan el plegamiento inapropiado y la agregación de las proteínas. Por lo tanto, es crucial mantener un ambiente oxidante controlado de forma apropiada en el RE. A este respecto, Cuozzo y Kaiser (*Nat Cell Biol.* 1999;1:130-135) demostraron inicialmente que, en levaduras, el glutatión actuaba como amortiguador frente a la hiperoxidación del RE y más adelante Chakravarthi y Bulleid (*J Biol Chem.* 2004; 279:39872-39879) confirmaron que, en células de mamífero, también se precisaba de glutatión para regular la formación de enlaces disulfuro nativos dentro de proteínas que entran en la ruta de secreción.

Con el aumento de la concentración del producto en el cultivo, puede observarse en los métodos de cultivo celular que la calidad del producto disminuye, tal como se determina por el contenido de ácido siálico medido en la glucoestructura de oligosacáridos. Generalmente, existe un

límite inferior para un contenido en ácido siálico aceptable, tal como determinan los estudios de eliminación de fármacos. Una gran abundancia de una proteína producida por células en cultivo está acompañada óptimamente por una calidad alta de la proteína que se recupera en última instancia para el uso pretendido.

Los productos proteicos producidos de manera recombinante que están apropiadamente glucosilados se están volviendo médica y clínicamente importantes de forma creciente para uso como agentes terapéuticos, de tratamiento y profilácticos. Por lo tanto, el desarrollo de métodos fiables de cultivo celular que logren económica y eficazmente un aumento en la concentración final de producto proteico, junto con un nivel elevado de calidad del producto, tal como se determina por el contenido de ácido siálico, cumple el objetivo deseado y requerido en la técnica.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona métodos nuevos para la producción de proteínas, preferentemente productos proteicos recombinantes, más preferentemente productos glucoproteicos, por medio de cultivos de células animales o de mamífero. Estos métodos nuevos logran aumentar la densidad celular viable en la fase tardía, la viabilidad celular, la productividad y el contenido de ácido siálico y disminuir la agregación de proteínas.

Un aspecto de la presente invención implica la adición de glucocorticoides a los medios. En este aspecto, los métodos de cultivo celular de la presente invención pueden lograr ventajosamente una potenciación de la

5 productividad específica, por ejemplo, glucoproteínas, así como una potenciación del contenido de la glucoproteína producida por las células cultivadas. Mas específicamente, de acuerdo con la presente invención, la adición de glucocorticoides durante el periodo de cultivo celular

10 mantiene una viabilidad celular alta de las células del cultivo y puede proporcionar una cantidad alta y una calidad elevada de producto producido a lo largo de toda la modalidad del cultivo. También, de acuerdo con un aspecto de la invención, la adición de glucocorticoides a los métodos de

15 cultivo puede conducir, ventajosamente, a la prolongación de la fase de producción del cultivo. Durante la fase de producción prolongada, se aumenta la valoración del producto deseado; la calidad del producto, caracterizada por el contenido en ácido siálico, se mantiene a un nivel elevado,

20 el nivel de agregación de proteínas se mantiene a niveles inferiores y la viabilidad celular se mantiene también a un nivel elevado. Además, la fase de producción prolongada asociada a los métodos de cultivo de la presente invención permite una producción de producto que excede lo que se

25 produce durante una fase de producción estándar.

En un aspecto particular, la presente invención proporciona un método en el que se potencia la productividad específica, el nivel de agregación de proteínas se reduce y el contenido en ácido siálico de la glucoproteína producida es superior, mediante la adición de glucocorticoides. El compuesto glucocorticoide es preferentemente dexametasona. De acuerdo con este aspecto particular, la adición de glucocorticoides mantiene una viabilidad celular alta del cultivo, permitiendo, por lo tanto, una fase de producción prolongada, durante la que la valoración del producto, preferentemente el producto recombinante, se aumenta y la calidad del producto, caracterizada por el contenido en ácido siálico, se mantiene a un nivel elevado. La adición de glucocorticoides puede minimizar la relación de correspondencia predominante entre la valoración de las proteínas y el contenido de ácido siálico en la producción de producto durante el proceso de cultivo celular. De este modo, la adición de glucocorticoides proporciona un efecto positivo sobre la potenciación de un parámetro de modalidad importante del método de cultivo, es decir, el producto matemático de "valoración final" x "ácido siálico final" X "contenido en monómeros" ("valoración final x ácido siálico final" x "contenido en monómeros final").

En un aspecto de la presente invención, el compuesto glucocorticoide se añade a un cultivo en el momento

de la inoculación o en un momento posterior a la inoculación anterior al comienzo de la fase de muerte inicial, o durante la fase de crecimiento inicial o durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial, o al final o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial. De acuerdo con este aspecto de la invención, la fase de crecimiento se prolonga y/o la aparición de la fase de muerte se retrasa durante un periodo tal como varios días.

En otro aspecto preferente de la presente invención y tal como se describe posteriormente en el presente documento, los métodos de cultivo celular recién desarrollados que implican la adición de un compuesto corticoide, son especialmente adecuados para producir moléculas CTLA4 solubles y moléculas mutantes de CTLA4 solubles, tales como CTLA4Ig y L104EA29YIg, por células huésped diseñadas genéticamente para expresar y producir estas proteínas. Modalidades preferentes de la presente invención abarcan el cultivo de células que producen CTLA4Ig y L104EA29YIg que implica la adición de un compuesto corticoide durante la modalidad del cultivo para lograr grandes cantidades de productos CTLA4Ig y L104EA29YIg de calidad alta, tal como se determina por la medición de ácido siálico y/o la baja agregación de proteínas en los productos finales.

Otros aspectos, características y ventajas de la

presente invención se apreciarán con una lectura de la descripción detallada de la invención y una observación de las figuras.

Breve Descripción de las figuras

5 Las Figuras 1A y 1B muestran expresiones de β -1,4-galactosiltransferasa (Figura 1A) y α -2,3-sialitransferasa (Figura 1B) aumentadas, en general, con concentración de dexametasona (DEX) en las células CHO tratadas con DEX, tal como se describe en el Ejemplo 1. La DEX se añadió el segundo
10 día después de la incoculación a los cultivos a concentraciones de desde 0.1 a 10 10 μ M. El quinto día después de la inoculación se recogieron muestras celulares y se prepararon lisados celulares completos, se separaron sobre un gel de gradiente 4-15% y se examinaron con el anticuerpo
15 para cada glucotransferasa. La mancha se volvió a examinar con el anticuerpo beta-actina para evaluar la igualdad de carga.

Las Figuras 2A y 2B muestran el efecto citoprotector de DEX que se traduce en una reducción de la
20 actividad de sialidasa en el sobrenadante del cultivo tal como se describe en el Ejemplo 1. La figura 2A muestra la viabilidad celular y la Figura 2B muestra los perfiles de absorbancia del ensayo de actividad de sialidasa en el sobrenadante a lo largo del periodo de cultivo entre cultivos
25 tratados con DEX y cultivos no tratados. Los tratamientos con

DEX a concentraciones 1 μ M se iniciaron el día 2. Los valores reflejan la desviación media y típica de datos de cinco experimentos.

Las Figuras 3A y 3B muestran mejoras en la sialilación de glucoproteínas en los cultivos tratados con análogos de glucocorticoides, hidrocortisona (HYC) y prednisolona (PRD) tal como se describe en el Ejemplo 1. El contenido normalizado de ácido siálico total (Figura 3A) y la fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N (Figura 3B) de cultivos tratados con DEX, HYC y PRD, respectivamente. El tratamiento se inició el segundo día después de la inoculación a una concentración 0.1, 1 y 10 μ M en el medio para cada compuesto. Se dan valores de cada parámetro como media $\pm$ diferencia/2 (n = 2).

Las Figuras 4A y 4B muestran que la potenciación de la sialilación con DEX se bloqueó mediante el antagonista de glucocorticoides RU-486 tal como se describe en el Ejemplo 1. Contenido normalizado de ácido siálico total (Figura 4A) y fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N (Figura 4B) en presencia y ausencia de RU-486. El RU-486, a concentración 0 ó 1 μ M, se introdujo en una suspensión de cultivo celular 48 horas después de la inoculación. Después se añadió DEX a concentración 0.1, 1 y 10 μ M al cultivo 24 horas más tarde. Se dan valores de cada parámetro como media $\pm$ diferencia/2 (n = 2).

Las Figuras 5A y 5B muestran que los cultivos semicontinuos de células CHO tratadas con DEX en biorreactores de 5 litros dieron como resultado un aumento del contenido en ácido siálico y fracciones de especies sialiladas tal como se describe en el Ejemplo 1. Contenido normalizado de ácido siálico total (Figura 5A) y fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N (Figura 5B) de cultivos no tratados y tratados a lo largo de los cultivos. Se dan valores de cada parámetro como media $\pm$ desviación típica ($n = 3$). El valor normalizado es el valor real dividido entre un valor arbitrario.

La Fig. 6 muestra la capacidad de DEX para mejorar la sialilación de glucoproteína en biorreactores de 7, 10 y 20 litros de escala tal como se describe en el Ejemplo 1. Se resume la relación molar de ácido siálico total final normalizada frente a la fracción sialilada normalizada de cultivos tratados con DEX y no tratados de diferentes ejecuciones. El valor normalizado es el valor real dividido entre un valor arbitrario.

Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran el porcentaje reducido de especies de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) en las proteínas de fusión IgG mediante células CHO tratadas con dexametasona (DEX) tal como se describe en el Ejemplo 2. Figura 7A: todas las células se cultivaron inicialmente juntas en el mismo matraz de

agitación durante dos días y después se dividieron en dos grupos, recibiendo la mitad de ellas una dosis única de DEX a una concentración final de 1 μ M en medio basal. Los sobrenadantes se recogieron el día 10 y se purificaron antes
5 del análisis SEC-HPLC para determinar porcentajes de especies HMW. Los puntos de datos son medias ($\pm$ D.T.) de los resultados de cinco matraces de agitación en un único experimento. $**P < 0.01$ en comparación con el control. (CON).
Figura 7B: se añadió DEX a varias concentraciones a los
10 cultivos de células CHO el día 2 y se recogieron sobrenadantes el día 10. Los puntos de datos son medias de los resultados obtenidos de matraces por duplicado. Figura 7C: todos los cultivos se iniciaron al mismo tiempo, pero se añadió DEX 1 μ M en diferente día, dando tiempos de incubación
15 diferentes tal como se ha indicado, cuando las células se recolectaron al mismo tiempo el día 10. Los puntos de datos son medias de los resultados de matraces por duplicado.

Fig.8 muestra el aumento de expresión de glutatión reductasa en las células CHO tratadas con dexametasona (DEX)
20 tal como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió DEX a varias concentraciones a los cultivos celulares el día de la inoculación y las muestras celulares se recolectaron el día 5. Los lisados celulares completos se separaron sobre un gel de gradiente 4-15%. Después de la detección de glutatión

reductasa, se usó la misma mancha para detectar la β -actina para la comparación de carga de muestra.

La Fig. 9 muestra el porcentaje reducido de especies HMW en las proteínas de fusión IgG incubadas con GSH *in vitro* tal como se describe en el Ejemplo 2. Se añadió glutatión reducido (GSH) a concentraciones finales 0.1 y 3 mM a la solución amortiguada Tris-acetato (pH de 7.5) de proteínas de fusión IgG purificadas y la mezcla de GSH y proteínas se incubó a 37 °C durante 1 h antes del análisis SEC-HPLC. Los puntos de datos son medias ($\pm$ D.T.) de cuatro determinaciones a partir de dos experimentos. * $P < 0.05$ en comparación con el control (GSH 0 mM).

Las Figuras 10A, 10B y 10C muestran los efectos atenuados de dexametasona (DEX) en presencia del antagonista del receptor de los glucocorticoides RU-486 tal como se describe en el Ejemplo 2. Figura 10A: se prepararon lisados celulares completos a partir de HepG-2 no tratado y células CHO y se separaron sobre un gel de gradiente 4-15%. La muestra de HepG-2 se usó como control de origen humano con propósitos de validación del anticuerpo primario. Figura 10B: se introdujo RU-486 a concentración 1 μ M en el cultivo un día después de la inoculación (día 1) y las células CHO pretratadas con RU-486 se dividieron el día 2, recibiendo la mitad de las mismas una dosis única de DEX a una

concentración final 0.1 μM en medio basal. Las muestras celulares se recogieron el día 10; todos los otros métodos fueron similares a los de la Fig. 2. Figura 10C: se introdujo RU-486 a concentración 1 μM en el cultivo el día 1 y después
5 se añadió DEX a los cultivos pretratados con RU-486 a una concentración final bien 0.1 μM o bien 1 μM el día 2. Los sobrenadantes se recogieron el día 10. Los puntos de datos son medias de los resultados a partir de recipientes por duplicado.

10 Las Figuras 11A, 11B, 11C y 11D muestran que la muerte celular se inhibe mediante DEX en cultivos de células CHO en medio exento de suero tal como se describe en el Ejemplo 3. Las curvas de dosis-respuesta del efecto de DEX sobre la densidad celular viable (Figura 11A) y la viabilidad
15 (Figura 11B) con tratamientos comenzaron el día 2. Las curvas tiempo-transcurso del proceso del efecto de DEX sobre la densidad celular viable (Figura 11C) y la viabilidad (Figura 11D) con una concentración de tratamiento 1 μM . Cada valor es la media de los datos obtenidos en los experimentos
20 realizados por duplicado.

Las Figuras 12A y 12B muestran que la velocidad de crecimiento específico de células CHO disminuye mientras aumenta la productividad específica celular mediante DEX tal como se describe en el Ejemplo 3. Los efectos de DEX sobre la
25 velocidad de crecimiento específico de células CHO (Figura

12A), la productividad volumétrica normalizada (Figura 12B) y la productividad específica celular normalizada (Figura 12B). Los tratamientos con DEX comenzaron el día 2. Los valores reflejan la media y la desviación típica de datos procedentes de cinco experimentos. El valor normalizado es el valor real dividido entre un valor arbitrario.

Las Figuras 13A y 13B muestran que la regulación al alza del gen GILZ antiapoptótico en las células CHO tratadas con DEX se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de western blot, tal como se describe en el Ejemplo 3. (Figura 13A) Se añadió DEX a los cultivos por triplicado el segundo día después de la inoculación en una concentración final de 0 y 1 μM , respectivamente. Las muestras de ARNm se extrajeron el 5° y 8° día después de la inoculación. Los valores de cada parámetro se dieron como media $\pm$ desviación típica ($n = 3$). (Figura 13B) Se añadió DEX a los cultivos por triplicado el 2° día después de la inoculación a una concentración final de 0 y 1 μM , respectivamente. Las muestras de células se recogieron y los lisados celulares completos se prepararon el 5° y el 8° día después de la inoculación.

Las Figuras 14A, 14B y 14C muestran que la actividad de supresión de muerte de la dexametasona implica a GILZ y la receptor de glucocorticoides, tal como se describe en el Ejemplo 3: El aumento de porcentaje (en comparación con

el tratamiento no DEX) de viabilidad final (Figura 14A), el cambio de pliegue de la expresión del gen GILZ (Figura 14B) y la expresión de proteína GILZ inducida por DEX (Figura 14C) en presencia y ausencia de RU-486. Se introdujo RU-486, 0 ó 1 μM , en la suspensión de cultivo celular 48 después de la inoculación y 24 horas después, se añadió a los cultivos DEX 0, 0.1 y 1 μM . Se recogieron células para los análisis de viabilidad, PCR cuantitativa a tiempo real y de western blot. Cada valor indicado en el panel A es la media de datos obtenidos de experimentos realizados por duplicado. Cada valor indicado en el panel B es la media y la desviación típica de datos obtenidos a partir de experimentos realizados por triplicado.

Las Figuras 15A, 15B y 15C muestran que los cultivos semicontinuos de células CHO tratadas con DEX en biorreactores de 10 litros dieron como resultado una mejora en la VCD, viabilidad, valoración y relación molar de ácido siálico tal como se describe en el Ejemplo 3. Los perfiles de la densidad celular viable (Figura 15A), la viabilidad (Figura 15B), y la valoración normalizada (Figura 15C) de cultivos no tratados y cultivos tratados por tratamiento con DEX comenzaron el día 2 y el día 7. El valor normalizado es el valor real dividido por un valor arbitrario.

Las Figuras 16A y 16B muestran los efectos de DEX sobre el crecimiento celular del cultivo celular CHO con

secreción de CTLA4Ig. Las curvas dosis-respuesta del efecto de DEX sobre la densidad celular viable (Figura 16A) y la viabilidad (Figura 16B) de los cultivos tratados con DEX a una concentración final 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 μ M, respectivamente. El tratamiento se inició el segundo día después de la inoculación y cada valor es la media de datos obtenidos a partir de experimentos realizados por duplicado.

Las Figuras 17A y 17B muestran los efectos de DEX sobre la relación molar de ácido siálico y los niveles HMW de CTLA4Ig. Las figuras muestran la relación molar de ácido siálico total final (Figura 17A) y las especies HMW (Figura 17B) de cultivos tratados con DEX a una concentración final 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 μ M, respectivamente. El tratamiento se inició el segundo día después de la inoculación y cada valor es la media de datos obtenidos a partir de experimentos realizados por duplicado. Los valores indicados en el panel A son valores normalizados, que son el valor real dividido por un valor arbitrario.

Las Figuras 18A, 18B, 18C y 18D muestran la factibilidad de incluir DEX en la producción de glucoproteína recombinante a gran escala, tal como se describe en el Ejemplo 5. Las figuras muestran la densidad celular viable (Figura 18A), la viabilidad (Figura 18B), la valoración normalizada (Figura 18C) y el contenido normalizado de ácido siálico (Figura 18D) de la glucoproteína recombinante

producida a escalas de 7 l (n = 16) y 500 l (n = 6) y 5.000 l (n = 3), respectivamente. Los valores reflejan la media y la desviación típica de datos procedentes de múltiples experimentos realizados a cada escala. El valor normalizado
5 es el valor real dividido por un valor arbitrario. Se utilizó el mismo divisor para la normalización en todas las escalas.

La FIG. 19 representa una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°:1) y una secuencia de aminoácidos codificados (SEQ ID N°:2) de una CTLA4Ig que tiene un péptido de señalización,
10 una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4, que comienza en metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124 o comienza en alanina en la posición -1 hasta ácido aspártico en la posición +124, y una región Ig.

15 La FIG. 20 representa una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°:3) y una secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°:4) de una molécula mutante de CTLA4 (L104EA29YIg) que tiene un péptido de señalización, un dominio extracelular mutante de CTLA4, que comienza en metionina en la posición +1 y termina
20 en ácido aspártico en la posición +124 o comienza en alanina en la posición -1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, y una región Ig.

La FIG. 21 representa una secuencia de ácidos nucleicos (SEQ ID N°:5) y una secuencia de aminoácidos
25 completa codificada (SEQ ID N°:6) del receptor CTLA4 humano

(denominado como CTLA4 de "tipo silvestre" en el presente documento) fusionado con el péptido de señalización de la oncostatina M (posición -26 a -2). (Documentos de patente de Estados Unidos N° 5,434,131 y 5,844,095.

5 **Descripción Detallada de la Invención**

La presente invención describe métodos nuevos para la producción de proteínas, preferentemente productos proteicos recombinantes, más preferentemente productos glucoproteicos, en cultivos de células animales o de mamífero. Estos métodos logran aumentar la densidad celular viable, la viabilidad celular, la productividad y el contenido de ácido siálico y disminuyen la agregación de proteínas.

En una modalidad, la invención está dirigida a un método de cultivo celular que comprende: cultivar células huésped que expresan una proteína de interés y añadir un compuesto glucocorticoide al cultivo celular.

Los compuestos glucocorticoides incluyen, pero sin estar limitados a, hidrocortisona (disponible en Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), prednisona (disponible en Sigma-Aldrich), prednisolona (disponible en Sigma-Aldrich), metilprednisolona (disponible en Sigma-Aldrich), dexametasona (disponible en Sigma-Aldrich), betametasona (disponible en Sigma-Aldrich), triamcinolona (disponible en Sigma-Aldrich), acetato de fludrocortisona (disponible en Sigma-Aldrich). Los

compuestos están fácilmente disponibles en las fuentes enumeradas o se pueden obtener fácilmente por medios conocidos por un experto en la técnica.

Los compuestos glucocorticoides preferentes
5 incluyen, pero no están limitados a, hidrocortisona, prednisolona, betametasona y dexametasona. El más preferente es la dexametasona.

En una modalidad de la invención, el compuesto glucocorticoide se añade en la inoculación o puede ser un
10 componente del medio basal. La inoculación tiene lugar el día 0.

En una modalidad de la invención, el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación, es decir, no está presente en el medio basal y
15 no está presente en la inoculación. Preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade el día 1 del cultivo o posteriormente.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto glucocorticoide puede añadirse al cultivo celular una vez,
20 dos veces, tres veces o cualquier número de veces durante un periodo específico. Pueden usarse conjuntamente uno o más compuestos glucocorticoides. Es decir, cualquier adición única dada de un compuesto glucocorticoide puede incluir la adición de uno o más compuestos glucocorticoides adicionales.
25 De modo similar, si se produce más de una adición de un

compuesto glucocorticoide, pueden añadirse diferentes compuestos glucocorticoides en adiciones diferentes. Pueden añadirse al cultivo compuestos y sustancias adicionales, incluidos compuestos glucocorticoides, antes, con o después
5 de la adición del compuesto glucocorticoide, bien durante o bien fuera del periodo especificado. En una modalidad preferente, se produce una adición única, es decir, una vez, de compuesto glucocorticoide. En una modalidad preferente, se añade un compuesto glucocorticoide.

10 De acuerdo con la invención, puede añadirse el compuesto glucocorticoide al cultivo celular por cualquier medio. Los medios de adición del compuesto glucocorticoide incluyen, pero no están limitados a, disuelto en DMSO, disuelto en un disolvente orgánico, disuelto en agua,
15 disuelto en un medio de cultivo, disuelto en medio nutriente, disuelto en un medio adecuado, en la forma en que se obtiene o en cualquier combinación de los mismos.

Preferentemente, la DEX se añade en forma de una solución en la que la DEX está disuelta en etanol y después
20 se diluye con agua para su uso posterior (es decir, tal como se añade la DEX al medio nutriente).

De acuerdo con la invención, el compuesto glucocorticoide se añade para llevar la concentración en el cultivo a un nivel apropiado. Como ejemplos no limitantes, el
25 compuesto glucocorticoide se añade a una concentración 1 nM -

1 mM. Preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade a una concentración de cantidades objetivo 1 nM - 0.1 μ M ó 0.1 μ M - 10 μ M; de modo más preferentemente aproximadamente 5 nM - 15 nM ó 0.5 μ M - 5 μ M; de modo más preferente
5 aproximadamente 10 nM ó 1 μ M.

De acuerdo con la invención, el cultivo puede realizarse durante un periodo de cualquier longitud después de la adición del compuesto glucocorticoide. El tiempo de ejecución del cultivo puede determinarlo un experto en la
10 técnica, con base en factores relevantes tales como la cantidad y calidad de la proteína recuperable y el nivel de especies celulares contaminantes (por ejemplo proteínas y ADN) en el sobrenadante resultantes de la lisis celular, lo que complicará la recuperación de la proteína de interés.

15 En modalidades particulares del método de cultivo celular y del método de aumento de la viabilidad celular de la invención, el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación, que es anterior al comienzo de la fase de muerte inicial. Preferentemente, el
20 compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación durante la fase de crecimiento inicial. Más preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial. Más preferentemente, el compuesto glucocorticoide se añade en

o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial.

La fase de crecimiento inicial se refiere a la fase de crecimiento que se observa en ausencia de la adición específica del compuesto glucocorticoide. La fase de muerte
5 inicial se refiere a la fase de muerte que se observa en ausencia de la adición específica del compuesto glucocorticoide.

La fase de crecimiento inicial puede finalizar cuando comienza la fase de muerte inicial o existe una fase
10 estacionaria de cualquier longitud entre la fase de crecimiento inicial y la fase de muerte inicial.

Por ejemplo, en un cultivo celular en el que la fase de crecimiento inicial es del día 0 al día 6 y la fase de muerte inicial comienza el día 7. En una modalidad
15 particular el compuesto glucocorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación y antes del día 7. En una modalidad específica, el compuesto glucocorticoide se añade después de la inoculación y alrededor del día 6. En una modalidad específica, el compuesto glucocorticoide se añade
20 entre los días 1 y 6. En otra modalidad específica, el compuesto glucocorticoide se añade con el medio nutriente los días 3 a 6. En otras modalidades específicas, el compuesto glucocorticoide se añade aproximadamente el día 2 ó el día 2.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 3) que cuando se
25 lleva a cabo la presente invención, la viabilidad del cultivo

celular se prolonga. Una condición, tal como la adición de compuesto glucocorticoide, provoca la prolongación de la viabilidad celular si la viabilidad celular en el cultivo es superior durante un periodo en presencia de la condición que
5 en ausencia de la condición.

De este modo, en otras modalidades, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un método para prolongar la viabilidad celular en un cultivo que comprende: cultivar células huésped que expresan una proteína
10 de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se prolonga la viabilidad celular del cultivo celular.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 3) que cuando se añade compuesto corticoide en un momento posterior a la
15 inoculación y anterior al comienzo de la fase de muerte inicial, la tasa de muerte de la fase de muerte puede reducirse, a un nivel inferior que la de la fase de muerte observada en ausencia de la adición de compuesto glucocorticoide.

20 De este modo, en otras modalidades, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un método para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células huésped que expresan una proteína de interés y añadir compuesto
25 glucocorticoide al cultivo celular en un momento posterior a

la inoculación que sea anterior al comienzo de la fase de muerte inicial; en el que se reduce la tasa de muerte de la fase de muerte. En más modalidades particulares, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un

5 método para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células huésped que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular en un momento posterior a la inoculación que sea durante el comienzo de la fase de

10 crecimiento inicial; en el que se retrasa la tasa de muerte de la fase de muerte. En más modalidades particulares, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un método para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células

15 huésped que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular durante la segunda mitad de la fase de crecimiento inicial; en el que se reduce la tasa de muerte de la fase de muerte. En otras modalidades particulares, la invención está dirigida a un

20 método para reducir la tasa de muerte de la fase de muerte de un cultivo celular que comprende: cultivar células huésped que expresan una proteína de interés y añadir compuesto glucocorticoide al cultivo celular al final o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial; en el que se

25 retrasa la tasa de muerte de la fase de muerte.

El Ejemplo 3 también demuestra que la hidrocortisona (HYC), la prednisolona (PRD) y la dexametasona (DEX) muestran todas ellas un efecto citoprotector dependiente de la dosis en cultivos celulares tratados en
5 comparación con cultivos celulares no tratados. No obstante, se precisaron concentraciones superiores de HYC y PRD para alcanzar el mismo nivel de efecto citoprotector, lo que es coherente con sus diferencias de potencia (es decir, la HYC y la PRD tienen solamente el 5% y el 20% de potencia de la
10 DEX).

Los tiempos de ejecución de los métodos de cultivo celular, en particular los métodos no continuos, están limitados, generalmente, por la densidad celular viable remanente, que disminuye durante la fase de muerte. Tiempos
15 de ejecución más largos pueden permitir que se logren valoraciones del producto superiores. Los problemas respecto a la calidad del producto también ofrecen una motivación para reducir la tasa de muerte, ya que la muerte celular puede liberar sialidasas al sobrenadante del cultivo, lo que puede
20 reducir el contenido de ácido siálico de la proteína expresada. Los problemas respecto a la purificación de la proteína ofrecen todavía otra motivación para retrasar o detener la fase de muerte. La presencia de desechos celulares y el contenido en células muertas del cultivo pueden
25 influenciar negativamente la capacidad para aislar y/o

purificar el producto proteico al final del proceso de cultivo.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 2), que la adición del compuesto glucocorticoide al cultivo celular
5 reduce la agregación de las proteínas de interés.

De este modo, en otras modalidades, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un método para reducir el porcentaje de agregación de proteínas que comprende: cultivar células huésped que expresan una
10 proteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se reduce el porcentaje de especies de alto peso molecular.

Se ha encontrado (véase el Ejemplo 1), que la adición del compuesto glucocorticoide al cultivo celular
15 mejora la sialilación de las proteínas de interés potenciando el contenido de ácido siálico total y aumentando el porcentaje de especies sialiladas.

El Ejemplo 1 también demuestra que la hidrocortisona (HYC), la prednisolona (PRD) y la dexametasona
20 (DEX) muestran todas ellas una mejora de la sialilación dependiente de la dosis en cultivos celulares tratados en comparación con cultivos celulares no tratados. No obstante, se precisó una concentración alta de HYC y PRD para lograr el mismo nivel de mejora, lo que es coherente con sus
25 diferencias de potencia.

De este modo, en otras modalidades, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un método para aumentar el porcentaje de especies sialiladas que comprende: cultivar células huésped que expresan una proteína
5 de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se aumenta el porcentaje de especies sialiladas.

De este modo, en otras modalidades, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un
10 método para aumentar el contenido de ácido siálico que comprende: cultivar células huésped que expresan una glucoproteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el que se aumenta el contenido de ácido siálico.

De este modo, en otras modalidades, la invención está dirigida a (1) un método de cultivo celular y (2) un método para reducir la tasa de desialilación de glucoproteínas en cultivos celulares que comprende: cultivar
15 células huésped que expresan una glucoproteína de interés y añadir el compuesto glucocorticoide al cultivo celular; en el
20 que se reduce la tasa de desililación.

Técnicas y métodos relacionados con la purificación y análisis de glucoproteínas

En los métodos de cultivo que abarca la presente
25 invención, la proteína producida por las células,

típicamente, se recoge, recupera, aísla y/o purifica o se purifica sustancialmente, como se desee, al final del periodo de cultivo celular total usando métodos de aislamiento y purificación tal como se conocen y se llevan a la práctica en la técnica. Preferentemente, la proteína que se segrega a partir del cultivo celular se aísla del medio de cultivo o sobrenadante; no obstante, la proteína también puede recuperarse a partir de las células huésped, por ejemplo, lisados celulares, usando métodos que se conocen y se llevan a la práctica en la técnica y que se describen adicionalmente más adelante.

El carbohidrato complejo que comprende la glucoproteína producida mediante los métodos de la invención puede analizarse rutinariamente, si se desea, mediante técnicas convenciones de análisis de carbohidratos. Por ejemplo, técnicas tales como análisis mediante electrotransferencia de lectinas (lectin blotting, por su nombre en inglés), bien conocida en la técnica, revela proporciones de manosa terminal o de otros azúcares tales como la galactosa. La terminación de oligosacáridos bi-, tri- o tetraantenarios mediante ácidos siálicos puede confirmarse por medio de la liberación de azúcares a partir de la proteína usando hidrazina anhidra o métodos enzimáticos y fraccionación de oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño u

otros métodos que son bien conocidos en la técnica.

También puede medirse el pI de la glucoproteína, antes y después del tratamiento con neuraminidasa, para eliminar los ácidos siálicos. Un aumento del pI seguido del
5 tratamiento con neuraminidasa indica la presencia de ácidos siálicos en la glucoproteína. Las estructuras carbohidrato tienen lugar típicamente en las proteínas expresadas en forma de carbohidratos ligados a N o ligados a O. Los carbohidratos ligados a N y ligados a O difieren, principalmente, en sus
10 estructuras de núcleo. La glucosilación ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a través de GlcNAc a un residuo de asparagina en la cadena peptídica. Los carbohidratos ligados a N contienen todos una estructura de núcleo común $\text{Man1-6(Man1-3)Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{-R}$, en la
15 que R en esta estructura de núcleo representa un residuo de asparagina. La secuencia de péptidos de la proteína producida contendrá una asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina.

20 Por el contrario, los carbohidratos ligados a O se caracterizan por una estructura de núcleo común que está unida a través de GalNAc al grupo hidroxilo de una treonina o serina. De los carbohidratos ligados a N y ligados a O, los más importantes son los carbohidratos ligados a N y ligados a
25 O complejos. Tales carbohidratos complejos contienen varias

estructuras antenarias. Las estructuras mono, bi, tri y tetra externas son importantes para la adición de ácidos siálicos terminales. Tales estructuras catenarias externas proporcionan sitios adicionales para los azúcares específicos y enlaces que comprenden los carbohidratos de los productos proteicos.

Los carbohidratos resultantes pueden analizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Se conocen en la técnica varios métodos para el análisis de glucosilación, que son útiles en el contexto de la presente invención. Estos métodos proporcionan información relacionada con la identidad y la composición del oligosacárido unido al péptido producido. Los métodos para análisis de carbohidratos útiles en relación con la presente invención incluyen, pero no están limitados a, cromatografía de lectina, HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico de intercambio aniónico a pH alto para separar oligosacáridos con base en la carga; PMN; espectroscopía de masas; HPLC; GPC; análisis de la composición de monosacáridos y digestión enzimática secuencial.

Además, se conocen y se llevan a la práctica en la técnica métodos para liberar oligosacáridos. Estos métodos incluyen 1) métodos enzimáticos, que se realizan comúnmente usando péptido-N-glucosidasa F/endo- β -galactosidasa; 2) métodos de eliminación β , usando un ambiente fuertemente

alcalino para liberar principalmente estructuras ligadas a O; y 3) métodos químicos que usan hidrazina anhidra para liberar los oligosacáridos enlazados a N y enlazados a O. El análisis puede realizarse mediante las etapas siguientes: 1. Diálisis
5 de la muestra frente a agua desionizada para eliminar todas las sales de amortiguador, seguido de liofilización. 2. Liberación de cadenas intactas de oligosacárido con hidrazina anhidra. 3. Tratamiento de cadenas intactas de oligosacárido con HCl metanólico anhidro para liberar monosacáridos
10 individuales como derivados de O-metilo. 4. N-acetilación de todos los grupos amino primarios. 5. Derivatización para obtener glucósidos de per-O-trimetilsilil metilo. 6. Separación de estos derivados por cromatografía por capilaridad gas-líquido (GLC, por sus siglas en inglés) en
15 una columna CP-SIL8. 7. Identificación de derivados de glucósido individuales mediante el tiempo de retención de la GLC y espectroscopía de masas, en comparación con los patrones conocidos. 8. Cuantificación de los derivados individuales por FID con un patrón interno (13-O-metil-D-
20 glucosa).

Pueden determinarse azúcares neutros y amino mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento combinada con detección amperométrica de pulsos (sistema de carbohidratos por HPAE-PAD; Dionex Corp.). Por
25 ejemplo, pueden liberarse azúcares por hidrólisis en ácido

trifluoroacético al 20% (v/v) a 100°C durante 6 horas. Después, los hidrolizados se secan por liofilización o con un Speed-Vac (Savant Instruments). Después, los residuos se disuelven en solución de acetato de sodio trihidratado al 1% y se analizan en una columna de HPLC-AS6 (tal como se describe por Anumula y col., 1991, *Anal. Biochem.*, 195:269-280).

Alternativamente, se realiza el análisis de carbohidratos por western blot. En este método, los carbohidratos unidos a proteína se detectan usando un sistema de detección de glucano comercial (Boehringer), que está basado en el método de western blot oxidativa descrito por Haselbeck y col. (1993, *Glycoconjugate J.*, 7:63). Se sigue el protocolo de coloración recomendado por el fabricante excepto en que la proteína se transfiere a una membrana de difluoruro de polivinilideno en vez de a una membrana de nitrocelulosa y los tampones de bloqueo contienen albúmina de suero bovino al 5% en amortiguador Tris 10 mM, pH de 7.4, con cloruro de sodio al 0.9%. La detección se realiza con anticuerpos antidigoxigenina unidos con un conjugado de fosfato alcalino (Boehringer), 1:1000 de dilución en solución salina amortiguada con Tris usando sustratos de fosfatasa, cloruro de 4-nitroazul de tetrazolio, al 0.03% (p/v) y fosfato de 5-bromo-4 cloro-3-indoilo al 0.03% (p/v) en amortiguador de Tris 100 mM , pH 9.5, que contiene cloruro de sodio 100 mM y

cloruro de magnesio 50 mM. Las bandas de proteína que contienen carbohidratos se visualizan generalmente en aproximadamente 10 a 15 minutos.

Los carbohidratos asociados con proteínas también
5 pueden analizarse por digestión con peptido-N-glucosidasa F. De acuerdo con este método, el residuo se suspende en 14 μ L de un amortiguador que contiene SDS al 0.18%, beta-mercaptoetanol al 18 mM, fosfato 90 mM, EDTA 3,6 mM, en un pH de 8.6, y se calienta a 100°C durante 3 minutos. Después de
10 enfriar a temperatura ambiente, la muestra se divide en dos partes iguales. Una parte, que no se trata adicionalmente, sirve como control. La otra parte se ajusta a aproximadamente un 1% de detergente NP-40, seguido de la adición de 0,2 unidades de péptido-N-glucosidasa F (Boehringer). Ambas
15 muestras se calientan a 37°C durante 2 horas y después se analizan por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Además, se evalúa el contenido en ácido siálico del producto glucoproteico usando métodos convencionales. Por ejemplo, el ácido siálico puede determinarse por separado
20 mediante un método colorimétrico directo (Yao y col., 1989, *Anal. Biochem.*, 179:332-335), usando preferentemente muestras por triplicado. Otro método de determinación de ácido siálico implica el uso de ácido tiobarbitúrico (TBA), tal como se describe por Warren y col. (1959, *J. Biol. Chem.*, 234:1971-
25 1975). Otro método más implica cromatografía de alto

rendimiento, tal como se describe por H.K. Ogawa y col. (1993, *J. Chromatography*, 612:145-149).

De forma ilustrativa, para la recuperación, el aislamiento y/o la purificación de la glucoproteína, el medio de cultivo celular o el lisado celular se centrifuga para retirar las células particuladas y los desechos celulares. El producto polipeptídico deseado se aísla o purifica lejos de proteínas y polipéptidos contaminantes solubles usando técnicas de purificación adecuadas. Los métodos siguientes proporcionan métodos ejemplares de purificación de proteínas, pero no limitantes: separación o fraccionamiento por inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico; precipitación de etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre una resina, tal como sílice o resina de intercambio iónico, por ejemplo, DEAE; cromatografía de enfoque; SDS-PAGE; precipitación de sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75, sefarosa; cromatografía en proteína A sefarosa para la eliminación de contaminantes de inmunoglobulina. Pueden usarse otros aditivos, tales como inhibidores de proteasa (por ejemplo, PMSF o proteinasa K) para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. El experto en la técnica entenderá que los métodos de purificación para un polipéptido de interés dado pueden requerir modificaciones que permitan cambios en el polipéptido expresado de forma recombinante en el cultivo

celular. Estos métodos de purificación que pueden seleccionarse para carbohidratos y enriquecerse para ácido siálico son particularmente preferentes, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico en gel blando o HPLC
5 usando resinas de intercambio catiónico o aniónico, en los que se recoge(n) la(s) fracción/fracciones más ácida(s).

Células, proteínas y cultivos celulares

En los métodos de cultivo celular de la presente invención, las células pueden mantenerse en una variedad de
10 medios de cultivo celular, por ejemplo, medio de cultivo basal, como se sabe convencionalmente en la técnica. Por ejemplo, los métodos se pueden aplicar en el uso de volúmenes grandes de células mantenidas en medio de cultivo celular, que pueden suplementarse con nutrientes y similares.
15 Típicamente, "medio de cultivo celular" (también denominado "medio de cultivo") es un término que el profesional de la técnica entiende y que es conocido para referirse a una solución de nutrientes en la que se cultivan células, preferentemente células animales o de mamífero y que
20 generalmente proporciona al menos uno o más componentes de entre los siguientes: una fuente de energía (generalmente en forma de un carbohidrato tal como glucosa), todos los aminoácidos esenciales, y generalmente los veinte aminoácidos básicos, más cisteína; vitaminas y/u otros compuestos
25 orgánicos que se precisan típicamente en bajas

concentraciones; lípidos o ácidos grasos libres, ácido linoleico y oligoelementos, por ejemplo, compuestos inorgánicos o elementos naturales que se requieren típicamente en bajas concentraciones, generalmente en el
5 intervalo micromolar. El medio de cultivo celular también puede suplementarse para contener una variedad de componentes opcionales, tales como hormonas y otros factores de crecimiento, por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, suero y similares; sales, por
10 ejemplo, calcio, magnesio y fosfato y tampones, por ejemplo HEPES; nucleósidos y bases, por ejemplo, adenosina, timidina, hipoxantina; e hidrolizados de proteínas y de tejidos, por ejemplo, proteína animal hidrolizada (peptonas o mezclas de peptonas, que pueden obtenerse a partir de subproductos
15 animales, gelatina purificada o material vegetal); antibióticos, por ejemplo gentamicina y agentes protectores de células, por ejemplo el poliol Pluronic (Pluronic F68). Es preferente un medio de nutrición celular exento de suero y de productos o ingredientes de origen animal.

20 El profesional aprecia que las células animales o de mamífero se cultivan en un medio adecuado para las células particulares que se cultivan y que puede determinarlo un experto en la técnica sin una excesiva experimentación. Se pueden utilizar los medios comercialmente disponibles, por
25 ejemplo, medio esencial mínimo (MEM, Sigma, St. Louis, MO,

EEUU); medio F10 de Ham (Sigma); medio eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma); medio RPMI-1640 (Sigma); medio de cultivo celular HyClone (HyClone, Logan, UT); y medio definido químicamente (CD), que está formulado para tipos de células particulares, por ejemplo, medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). A los medios puestos como ejemplos anteriormente se pueden añadir los componentes o ingredientes suplementarios descritos anteriormente, incluidos componentes adicionales, en concentraciones o cantidades apropiadas, como sea necesario o se desee, y tal como conocerían y pondrían en práctica los expertos en la técnica usando habilidades rutinarias.

Además, las condiciones adecuadas de cultivo celular para los métodos de la presente invención son las que se usan típicamente y se conocen por cultivo de células por lotes, semicontinuo y continuo, con atención al pH, por ejemplo, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7.5, oxígeno disuelto (O_2), por ejemplo, entre aproximadamente el 5 y el 90% de saturación de aire y dióxido de carbono (CO_2), agitación y humedad, además de la temperatura. Como ejemplo ilustrativo, pero no limitante, un medio de cultivo celular adecuado para los métodos semicontinuos de la presente invención comprende un medio CD-CHO modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). También puede usarse un medio nutriente, tal como medio ERDF modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA,

EEUU). Es preferente un medio de cultivo que también contenga glucocorticoides, por ejemplo dexametasona.

Células animales, células de mamífero, células cultivadas, células huésped animales o de mamífero, células
5 huésped, células recombinantes, células huésped recombinantes y similares, son todos términos para las células que pueden cultivarse de acuerdo con los métodos de la presente invención. Tales células son típicamente líneas celulares obtenidas o derivadas de mamíferos y son capaces de crecer y
10 sobrevivir cuando se las coloca bien en un cultivo monocapa o en un cultivo de suspensión en un medio que contiene los nutrientes y/o los factores de crecimientos apropiados. Los factores de crecimiento y nutrientes que son necesarios para el crecimiento y mantenimiento de cultivos celulares
15 particulares pueden determinarse de manera sencilla empíricamente por un experto en la técnica pertinente, tal como se describe, por ejemplo, por Barnes y Sato, (1980, *Cell*, 22:649); en *Mammalian Cell Culture*, Ed. J.P. Mather, Plenum Press, NY, 1984; y en la patente de Estados Unidos N°
20 5,721,121.

Pueden cultivarse numerosos tipos de células de acuerdo con los métodos de la presente invención. Las células son, típicamente, células animales o de mamífero que pueden expresar y secretar, o que pueden diseñarse molecularmente
25 para expresar y secretar, grandes cantidades de una proteína

particular, más particularmente una glucoproteína de interés, en un medio de cultivo. Se entenderá que la glucoproteína producida por una célula huésped puede ser endógena u homóloga a la célula huésped. De modo alternativo, 5 preferentemente, la glucoproteína es heteróloga, es decir, extraña, a la célula huésped, por ejemplo, una glucoproteína humana producida y secretada por una célula huésped de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés). También preferentemente, se consiguen glucoproteínas de mamífero, es 10 decir, las obtenidas originalmente o derivadas de un organismo mamífero, usando los métodos de la presente invención y son secretadas, preferentemente, por las células presentes en el medio de cultivo.

Ejemplos de glucoproteínas de mamífero que pueden 15 producirse de forma ventajosa usando los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, citocinas, receptores de citocina, factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, HER-2, FGF- α , FGF- β , TGF- α , TGF- β , PDGF, IGF-1, IGF-2, NGF, NGF- β); receptores de factores de crecimiento, incluidas 20 proteínas de fusión o quiméricas. Otros ejemplos no limitantes incluyen hormonas del crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento bovina); insulina (por ejemplo, cadena A de la insulina y cadena B de la insulina), proinsulina; eritropoyetina (EPO); 25 factores estimulantes de colonias (por ejemplo, G-CSF, GM-

CSF, M-CSF); interleucinas (por ejemplo IL-1 a IL-12); factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y su receptor (VEGF-R); interferones (por ejemplo, IFN- α , β , o γ); factor de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF- α y TNF- β) y sus receptores, TNFR-1 y TNFR-2; trombopoyetina (TPO); trombina; péptido natriurético cerebral (BNP, por sus siglas en inglés); factores de coagulación (por ejemplo, el factor VIII, el factor IX, factor de von Willebrand y similares); factores anticoagulación; activador del plasminógeno hístico (TPA, por sus siglas en inglés), por ejemplo, urocinasa u orina humana o tejido tipo TPA; hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés); hormona luteinizante (LH); calcitonina; proteínas CD (por ejemplo, CD3, CD4, CD8, CD28, CD19, etc.); proteínas CTLA (por ejemplo, CTLA4); proteínas receptoras de linfocitos T y linfocitos B; proteínas morfogénicas óseas (BNP, por ejemplo, BMP-1, BMP-2, BMP-3, etc.); factores neurotróficos, por ejemplo, factores neurotróficos derivados de huesos (BDNF, por sus siglas en inglés); neurotrofinas, por ejemplo, 3-6; renina; factor reumatoide; RANTES; albúmina; relaxina; proteínas inhibidoras de macrófagos (por ejemplo, MIP-1, MIP-2); proteínas o antígenos víricos; proteínas de superficie de membrana; proteínas del canal iónico; enzimas; proteínas reguladoras; anticuerpos; proteínas inmunomoduladoras, (por ejemplo, HLA, MHC, la familia B7); receptores de

localización; proteínas de transporte; superóxido dismutasa (SOD); proteínas del receptor acoplado a proteína G (GPCR); proteínas neuromoduladoras; proteínas y péptidos asociados a la enfermedad de Alzheimer, (por ejemplo A-beta) y otras tal como se conocen en la técnica. Las proteínas y polipéptidos de fusión, proteínas y polipéptidos quiméricos, así como fragmentos y porciones o mutantes, variantes o análogos de cualquier proteína o polipéptido mencionado anteriormente están también incluidos entre las proteínas, polipéptidos y péptidos adecuados que pueden producirse mediante los métodos de la presente invención.

Ejemplos no limitantes de células huésped animales o de mamífero adecuadas para alojar, expresar y producir proteínas para aislamiento y/o purificación incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin y col., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; y Kolkekar y col., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909), línea celular Tet-On CHO-K1 (Clontech), CHO designada ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), CHO clon 13 (GEIMG, Genova, Italia), CHO clon B (GEIMG, Genova, Italia), CHO-K1/SF designada ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), RR-CHOK1 designada ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), células CHO negativas en dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216) y células

dp12.CHO (documento de patente de Estados Unidos N° 5,721,121); células CV1 renales de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células renales embrionarias humanas (por ejemplo, células 293 o células 293
5 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL-10); células renales de mono (CV1, ATCC CCL-70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células de Sertoli de
10 ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL-34); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562,
15 ATCC CCL-51); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); células MCR 5; células FS4. Son preferentes las células CHO, particularmente, las células CHO/-DHFR.

Las células adecuadas para cultivar en los métodos
20 y procesos de la presente invención pueden contener vectores de expresión (constructos) introducidos, por ejemplo, por transformación, transfección, infección o inyección, tales como plásmidos y similares, que alojan secuencias de codificación, o porciones de las mismas, que codifican las
25 proteínas para su expresión y producción en los métodos de

cultivo. Tales vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Pueden usarse métodos que son bien conocidos y llevados a la práctica por los expertos en la

5 técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y los polipéptidos producidos, así como los elementos de control transcripcional y transduccional apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y

10 recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas están descritas en J. Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. y en F.M. Ausubel y col., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

15 Elementos de control o secuencias reguladoras son las regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Los elementos pueden

20 variar en su fuerza y su especificidad. En función del sistema vectorial y de la célula huésped que se utiliza, puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos promotores constitutivos e inducibles. En sistemas celulares de mamíferos, son

25 preferentes los promotores de genes de mamífero o de virus de

mamíferos. Los constructos para usar en sistemas de expresión proteica se diseñan para contener al menos un promotor, una secuencia potenciadora (opcionalmente, para sistemas de expresión de mamíferos) y otras secuencias tal como se
5 necesitan o se desean para una transcripción y regulación adecuada de la expresión génica (por ejemplo, secuencias de iniciación y terminación transcripcional, origen de sitios de replicación, secuencias de poliadenilación, por ejemplo, la secuencia poli A de la hormona del crecimiento bovina (BGH,
10 por sus siglas en inglés)).

Como se apreciará por los expertos en la técnica, la selección del vector apropiado, por ejemplo, un plásmido, componentes para una transcripción, expresión y aislamiento apropiados de proteínas producidas en sistemas de expresión
15 eucariótico (por ejemplo, mamíferos) es conocida y los expertos en la técnica la determinan y la llevan a la práctica rutinariamente. La expresión de proteínas por las células cultivadas de acuerdo con los métodos de la presente invención, puede situarse bajo el control de promotores tales
20 como promotores víricos, por ejemplo, citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés), virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), fosfoglicerol cinasa (PGK), timidina cinasa (TK) o el promotor de la α -actina. Además, los promotores regulados confieren inducibilidad mediante
25 compuestos o moléculas particulares, por ejemplo, el elemento

de respuesta a glucocorticoides (GRE, por sus siglas en inglés) del virus del tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés) se induce por glucocorticoides (V. Chandler y col., 1983, *Cell*, 33:489-499). También pueden usarse
5 promotores o elementos reguladores específicos de tejidos (G. Swift y col., 1984, *Cell*, 38:639-646), si se necesita o se desea.

Pueden introducirse constructos de expresión en las células mediante una variedad de métodos de transferencia
10 génica conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, métodos convencionales de transfección génica, tales como coprecipitación con fosfato de calcio, transfección liposómica, microinyección, electroporación e infección o transducción vírica. La elección del método está dentro de la
15 competencia del experto en la técnica. Para un experto en la técnica, será aparente que uno o más constructos que portan secuencias de ADN para su expresión en células pueden transfectarse a las células de modo que los productos de expresión se producen a continuación en las células y/o se
20 obtienen a partir de las mismas.

En un aspecto particular, los sistemas de expresión de mamíferos que contienen secuencias de control y reguladoras apropiadas son preferentes para usar en las células de mamífero que expresan proteínas de la presente
25 invención. Las secuencias de control eucarióticas que se usan

comúnmente para su uso en vectores de expresión de mamíferos incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero tales como, por ejemplo, el promotor (vector CDM8) del citomegalovirus (CMV) y del virus del sarcoma aviar (ASV, por sus siglas en inglés), (π LN). Otros promotores que se usan comúnmente incluyen los promotores tempranos y tardíos del virus del simio 40 (SV40) (Fiers y col., 1973, *Nature*, 273:113), u otros promotores víricos tales como los derivados de poliovirus, adenovirus 2 y virus del papiloma bovino. También puede usarse un promotor inducible, tal como hMTII (Karin y col., 1982, *Nature*, 299:797-802).

Ejemplos de vectores de expresión adecuados para células huésped eucarióticas incluyen, pero no están limitados a, vectores para células huésped de mamífero (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene), vectores retrovíricos (por ejemplo, vectores pFB (Stratagene)), pcDNA-3 (Invitrogen), vectores adenovíricos; Adeno-vectores de virus adenoasociados, vectores de bacilovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores pESC (Stratagene)) o formas modificadas de cualquiera de los precedentes. Los vectores pueden contener también secuencias de potenciadores cadena arriba o cadena abajo de las secuencias de la región promotora para optimizar la expresión

génica.

También puede usarse un marcador seleccionable en un vector recombinante (por ejemplo, un plásmido) para conferir resistencia a las células que alojan
5 (preferentemente, que tienen integrado de forma estable) el vector que permite su selección en un medio de selección apropiado. Puede usarse una serie de sistemas de selección, incluidos pero no limitados a, genes de timidina cinasa del virus del herpes simplex (HSV TK, por sus siglas en inglés),
10 (Wigler y col., 1977, *Cell*, 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT), (Szybalska y Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., 1980, *Cell*, 22:817), que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt (APRT),
15 respectivamente.

También puede usarse resistencia antimetabolito como base de selección para los ejemplos no limitantes siguientes de genes marcadores: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357; y O'Hare y col., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418 (*Clinical Pharmacy*, 12:488-505; Wu y Wu,
20 1991, *Biotherapy*, 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev.*
25

Pharmacol. Toxicol., 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science*, 260:926-932; Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-21; mayo, 1993, *TIB TECH*, 11(5):155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., 1984, *Gene*, 5 30:147). Pueden aplicarse rutinariamente métodos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar los clones de células recombinantes deseados y los métodos están descritos, por ejemplo, en Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & 10 Sons, NY (1993); Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., 1981. *J. Mol. Biol.*, 150:1, que se incorporan 15 por referencia al presente documento en su totalidad.

Además, los niveles de expresión de una molécula proteica expresada pueden aumentarse mediante amplificación de vectores (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the 20 expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning", Vol. 3, Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa una proteína es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de células huésped aumentará el número 25 de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada está

asociada con el gen que codifica la proteína, la producción de la proteína aumentará concomitantemente (Crouse y col., 1983, *Mol. Cell. Biol.*, 3:257).

Los vectores que alojan glutamina sintasa (GS) o
5 dihidrofolato reductasa (DHFR) que codifican ácidos nucleicos como marcadores seleccionables pueden amplificarse en presencia de los fármacos metionina sulfoximina o metotraxato, respectivamente. Una ventaja de vectores basados en glutamina sintasa es la disponibilidad de líneas celulares
10 (por ejemplo, la línea celular de mieloma murino, NSO) que son negativas a glutamina sintasa. También pueden funcionar sistemas de expresión de glutamina sintasa en células de expresión de glutamina sintasa (por ejemplo, células CHO) que proporcionan un inhibidor adicional para evitar el
15 funcionamiento del gen endógeno.

Los vectores que expresan DHFR como marcador seleccionable incluyen, pero no están limitados a, el plásmido pSV2-dhfr (Subramani y col., *Mol. Cell. Biol.* 1:854 (1981). Los vectores que expresan la glutamina sintasa como
20 marcador seleccionable incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión pEE6 descrito en Stephens y Cockett, 1989, *Nucl. Acids. Res.*, 17:7110. Un sistema de expresión de glutamina sintasa y componentes del mismo se detallan en las publicaciones PCT: W087/04462; W086/05807; W089/01036;
25 W089/10404 y W091/06657 que se incorporan por referencia al

presente documento en su totalidad. Además, los vectores de expresión de glutamina sintasa que pueden usarse de acuerdo con la presente invención están disponibles comercialmente en proveedores, por ejemplo, Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH, EEUU).

En una modalidad particular, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula STLA4 soluble o una molécula mutante de CTLA4 soluble puede insertarse en un vector diseñado para expresar secuencias extrañas en un huésped eucariótico. Los elementos regulatorios del vector pueden variar de acuerdo con el huésped eucariótico particular. Los vectores que expresan la CTLA4 soluble o la mutante de CTLA4 soluble en células huésped eucarióticas puede incluir secuencias de potenciadores para optimizar la expresión de la proteína.

Tipos de cultivos celulares

Con fines de comprensión, aunque sin limitación, el experto apreciará que los cultivos celulares y la modalidad del cultivo para la producción de proteínas puede incluir tres tipos generales; es decir, cultivo en continuo, cultivo en lotes y cultivo semicontinuo. En un cultivo en continuo, por ejemplo, el suplemento del medio de cultivo fresco (es decir, el medio nutriente) se proporciona a las células durante el periodo de cultivo, mientras que el medio de cultivo viejo se retira diariamente y el producto se recoge,

por ejemplo, diariamente o de forma continua. En un cultivo en continuo, el medio nutriente puede añadirse diariamente y puede añadirse en continuo, es decir, por goteo o por infusión. Para el cultivo en continuo, las células pueden
5 permanecer en cultivo tanto tiempo como se desee, mientras que las células permanezcan vivas y se mantengan las condiciones ambientales y de cultivo.

En el cultivo en lotes, las células se cultivan inicialmente en un medio y este medio ni se retira, ni se
10 reemplaza, ni se suplementa, es decir, las células no se "alimentan" con nuevo medio, durante o antes del final del proceso de cultivo. El producto deseado se recolecta al final del proceso de cultivo.

Para cultivos semicontinuos, el tiempo de ejecución
15 del cultivo se aumenta suplementando el medio de cultivo una o más veces al día (o en continuo) con medio fresco durante el proceso, es decir, las células se "alimentan" con nuevo medio ("medio nutriente") durante el periodo de cultivo. Los cultivos semicontinuos incluyen varios regímenes y tiempos de
20 alimentación, por ejemplo, diariamente, en días alternos, cada dos días, etc., más de una vez al día, o menos de una vez al día y así sucesivamente. Además, los cultivos semicontinuos pueden alimentarse continuamente con medio nutriente.

25 Después, el producto deseado se recolecta al final

del proceso de cultivo/producción. La presente invención abarca, preferentemente, los cultivos celulares semicontinuos en los que el compuesto glucorticoide se añade en un momento posterior a la inoculación.

5 De acuerdo con la presente invención, el cultivo celular puede llevarse a cabo, y las glucoproteínas pueden producirse por células, en condiciones para la producción a gran o pequeña escala de proteínas, usando recipientes de cultivo y/o aparatos de cultivo que se emplean de forma
10 convencional para el cultivo de células animales o de mamífero. Como aprecia el experto en la técnica, las placas de cultivo de tejido, los recipientes de cultivo de tejidos y los recipientes de agitación se usan típicamente a escala de laboratorio. Para el cultivo en gran escala, (por ejemplo,
15 500 litros, 5000 litros y similares, por ejemplo, tal como se describe en los documentos de patente de titularidad compartida de Estados Unidos N° 7,541,164 y N° 7,332,303 y la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 12/086786 , presentada el 19 de diciembre del 2006, el
20 contenido de los cuales se incorpora por referencia al presente documento en su totalidad) pueden usarse métodos que incluyen, pero no están limitados a, un biorreactor de lecho fluidizado, un biorreactor de fibra hueca, un cultivo en botella rotatoria o sistemas de biorreactores de tanque
25 agitado. Pueden usarse o pueden no usarse microportadores con

la botella de cultivo rotatoria o los sistemas de biorreactores de tanque agitado. Los sistemas pueden operarse en lotes, en continuo o en modo discontinuo. Además, el aparato o sistema de cultivo puede o no estar equipado con un
5 separador celular que usa filtros, gravedad, fuerza centrífuga y similares.

Fases del cultivo celular y parámetros asociados

El término "inoculación" se refiere a la adición de células del medio de iniciación al comienzo del cultivo.

10 La "fase de crecimiento" de un cultivo es la fase durante la que la densidad celular viable en cada punto temporal es superior a la que se tenía en cualquier punto temporal anterior.

15 La "fase estacionaria" de un cultivo es la fase durante la que la densidad celular viable es aproximadamente constante (es decir, dentro del error de medición) durante un periodo de cualquier duración.

20 La "fase de muerte" de un cultivo es la fase que viene después de la fase de crecimientos o después de la fase de crecimiento y la fase estacionaria, y durante la que la densidad celular viable en cualquier punto temporal es inferior a la de cualquier punto temporal anterior durante esa fase.

25 En un método de cultivo "asociado al crecimiento", tal como casos en los que un compuesto glucocorticoide

provoca una prolongación de la fase de crecimiento, la fase de producción puede comenzar durante la fase de crecimiento prolongada.

En un método de cultivo asociado a "no
5 crecimiento", la fase de producción del cultivo celular puede ser la fase estacionaria.

Preferentemente, el medio de cultivo se suplementa ("alimenta") durante la fase de producción para mantener la producción en continuo de proteínas, en particular en una
10 fase de producción prolongada, y para alcanzar amplias cantidades de producto glucoproteico de alta calidad (tal como se ejemplifica y/o se determina por un nivel alto en contenido final de ácido siálico tras la recuperación de la proteína. La alimentación puede tener lugar sobre una base
15 diaria, o de acuerdo con otros horarios para apoyar la viabilidad celular y la producción de proteínas

El método de cultivo de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado más de una célula viable superviviente hasta el final del periodo de cultivo. En
20 consecuencia, en algunas reivindicaciones, cuantas más células sobreviven, más células producen el producto deseado. Esto, a su vez, se traduce en una cantidad acumulada superior de producto al final del proceso de cultivo, permaneciendo igual la tasa de producción de proteína por células
25 individuales, es decir, la productividad específica celular.

La productividad específica celular o la tasa específica celular, tal como se conoce en la técnica, se refiere típicamente a la tasa de expresión específica de producto producido por célula, o por medida de masa o de volumen celular. La productividad específica celular se mide en 5 gramos de proteína producida por célula por día, por ejemplo, y puede medirse de acuerdo con un método integral que implica las fórmulas siguientes:

$$dP/dt = q_p X, \text{ o bien}$$

10

$$P = q_p \int_0^t X dt$$

en las que q_p es la constante de productividad específica celular; X es el número de células o volumen celular o equivalentes de masa celulares; y dP/dt es la velocidad de producción de proteína. De este modo, q_p puede 15 obtenerse a partir de una gráfica de concentración de producto frente a la integral con respecto al tiempo de células viables ($\int_0^t X dt$ "días de células viables"). De acuerdo con esta fórmula, cuando la cantidad de producto glucoproteico producido se representa frente a los días de 20 células viables, la pendiente es equivalente a la velocidad específica celular. Las células viables pueden determinarse por medio de varias mediciones, por ejemplo, biomasa, velocidad de captación de O_2 (LDH), volumen celular empaquetado o turbidez. (por ejemplo, el documento de patente 25 de Estados Unidos N° 5,705,364 de T. Etcheverry y col.)

Producción de moléculas CTLA4 solubles y moléculas
mutantes de CTLA4 solubles mediante los métodos de cultivo de
la presente invención

En otras modalidades que abarca la presente
5 invención, los métodos de cultivo celular de la invención se
usan para producir una molécula CTLA4 soluble o una molécula
mutante de CTLA4 soluble, tal como se describe a
continuación. Una molécula CTLA4 soluble es preferentemente
una proteína de fusión CTLA4, preferentemente CTLA4Ig. Es más
10 preferente una CTLA4Ig que comprende aminoácidos -1 a 357 ó
+1 a 357 tal como se muestra en la FIG. 19. Una molécula
mutante de CTLA4 es preferentemente la L104EA29YIg que
comprende aminoácidos -1 a 357 ó +1 a 357 tal como se muestra
en la FIG. 20. Los métodos de cultivo celular, que implican
15 unas fases de producción prolongada para productos proteicos
son especialmente adecuados para generar en cultivo grandes
cantidades de moléculas CTLA4 solubles y de moléculas
mutantes de CTLA4 solubles con alta calidad, por sus células
huésped.

20 En una modalidad preferente, la CTLA4Ig se produce
por células huésped diseñadas de forma recombinante. La
proteína de fusión CTLA4Ig puede producir de forma
recombinante células CHO transfectadas con un vector que
contiene la secuencia de ADN que codifica la CTLA4Ig. (véase
25 el documento de patente de Estados Unidos N°. 5,844,095 de

P.S. Linsley y col.). La proteína de fusión CTLA4Ig se produce con una calidad alta y se somete a sialilación apropiadamente cuanto se cultiva de acuerdo con los métodos de la presente invención. La invención proporciona la
5 producción de niveles altos de producto proteico recuperable, por ejemplo, producto proteico CTLA4Ig sialilado. En otra modalidad preferente, la molécula mutante de CTLA4 soluble L104EA29YIg que comprende aminoácidos -1 a 357 ó +1 a 357 tal como se muestra en la FIG. 20 se produce mediante métodos de
10 cultivo celular de la presente invención.

Un ligando para la CTLA4 es una molécula B7. Tal como se usa en el presente documento, "ligando" se refiere a una molécula que reconoce y se une específicamente a otra molécula. La interacción de una molécula y su ligando puede
15 regularse por los productos de los métodos de cultivo de la presente invención. Por ejemplo, la interacción de la CTLA4 con su ligando B7 puede bloquearse mediante la administración de moléculas CTLA4Ig. Como otros ejemplos, la interacción del factor de necrosis tumoral (TNF) con su ligando, el receptor
20 TNF (TNFR), puede bloquearse mediante la administración de etanercept u otras moléculas de bloqueo TNF/TNFR.

La CTLA4 de tipo silvestre o "CTLA4 no mutada" tiene la secuencia de aminoácidos de CTLA4 de cadena completa natural, tal como se muestra en la FIG. 20 (y también se
25 describe en los documentos de patente de Estados Unidos N°.

5,434,131, 5,844,095 y 5,851,795, que se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad), o cualquier porción de la misma que reconoce y se une a una molécula B7, o interfiere con una molécula B7, de tal forma que uniéndose a CD28 y/o a CTLA4 (por ejemplo, CD28 endógeno y/o CTLA4) se bloquea. La CTLA4 de tipo silvestre comprende porciones particulares, que incluyen, por ejemplo, el dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre que comienza con metionina en la posición +1 y termina en ácido aspártico en la posición +124, o el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre que comienza con alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en el posición +124 tal como se muestra en la FIG. 21.

La CTLA4 de tipo silvestre natural es una proteína de superficie celular que tiene un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico C-terminal. El dominio extracelular se une a una molécula diana, tal como una molécula B7. En una célula, la proteína CTLA4 de tipo silvestre natural se traduce como un polipéptido inmaduro que incluye un péptido de señalización en el extremo amino o N-terminal. El polipéptido inmaduro experimenta un procesamiento postraducciona l que incluye la escisión y eliminación del péptido de señalización para generar un producto de escisión de CTLA4 que tiene un extremo N-terminal recién generado y que difiere del extremo N-

terminal de la forma inmadura. Un experto en la técnica apreciará que puede tener lugar un procesamiento postraducciona1 que elimine uno o más de los aminoácidos del extremo N-terminal recién generado del producto de escisión de CTLA4. La proteína CTLA4 madura puede comenzar en la metionina de la posición +1 o la alanina de la posición -1. La forma madura de la molécula CTLA4 incluye el dominio extracelular o cualquier porción del mismo que se une a B7.

Una molécula CTLA4 mutante, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende la CTLA4 de tipo silvestre tal como se muestra en la FIG. 21, o cualquier porción o derivado de la misma, en la secuencia de CTLA4 de tipo silvestre, preferentemente en el dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre, y se une a B7.

Una molécula CTLA4 mutante tiene una secuencia que es similar, pero no idéntica, a la secuencia de la molécula CTLA4 de tipo silvestre, pero que también se une a B7. Las mutaciones pueden incluir uno o más restos de aminoácidos sustituidos con un aminoácido que tiene estructura o propiedades químicas, deleciones, adiciones, cambios de fase o truncaciones de aminoácidos conservativas (por ejemplo, una leucina sustituida por una isoleucina) o no conservativas (por ejemplo, una leucina sustituida por un triptófano).

Las moléculas mutantes de CTLA4 pueden incluir una molécula no-CTLA4 en la misma o unida a la misma, es decir,

proteínas de fusión de mutante de CTLA4. Las moléculas mutantes pueden ser solubles (es decir, en circulación) o pueden estar unidas a la superficie celular (unidas a la membrana). Las moléculas mutantes de CTLA4 incluyen la

5 L104EA29YIg y las descritas en las solicitudes de patente de Estados Unidos números de serie 60/214,065 y 60/287,576; en el documento WO 01/92337 A2; en los documentos de patente de Estados Unidos N° 6,090,914, 5,844,095, 7,094,874 y 5,773,253; y como se describen en R.J. Peach y col., 1994, *J*

10 *Exp Med*, 180:2049-2058.) Las moléculas mutantes de CTLA4 pueden producirse sintéticamente o de forma recombinante.

La CTLA4Ig es una proteína de fusión soluble que comprende un dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre, o una porción del mismo que se une a B7, unido a una molécula

15 de inmunoglobulina (Ig) o a una porción de la misma. El dominio extracelular de CTLA4 o una porción del mismo se une a un resto Ig que comprende toda o una porción de la molécula de inmunoglobulina, preferentemente toda o una porción de una región constante de la inmunoglobulina, tal como toda o una

20 porción de IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) o IgC ϵ (IgC ϵ), proporcionando la molécula de fusión soluble. El resto Ig puede incluir los dominios bisagra, CH2 y CH3 y

los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de las regiones constantes mencionadas anteriormente u otras regiones constantes. Preferentemente, el resto Ig es humano o de mono y comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3. Del modo más

5 preferente, el resto Ig comprende los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgC γ 1 humano, o está constituido por los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgC γ 1 humano. En un resto Ig de la CTLA4Ig, la región constante Ig o una porción de la misma puede mutarse, dando como resultado una reducción de sus

10 funciones efectoras (véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.637.481, 5,844,095 y 5.434.131. Tal como se usan en el presente documento, los términos resto Ig, región constante Ig, dominio Ig C(constante), IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) o IgC ϵ (IgC ϵ), incluyen tanto las secuencias nativas como las que han sido mutadas, tales como, por ejemplo, secuencias que tienen mutaciones en la región constante que reducen la

20 función efectoras.

Una modalidad particular relacionada con la CTLA4 comprende el dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre que comienza en la metionina en la posición +1 y termina en el ácido aspártico en la posición +124, o comienza

en la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124; un residuo de aminoácido de unión glutamina en la posición +125; y una porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 a través de una lisina en la posición +357, tal como se muestra en la FIG. 19. El ADN que codifica la CTLA4Ig se depositó el 31 de mayo de 1991 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA, EEUU 20110-2209, conforme a lo dispuesto en el Tratado de Budapest y se le ha asignado el número de referencia ATCC 68629; P. Linsley y col., 1994, Immunity 1:793-80. Una línea celular CHO que expresa la CTLA4Ig se depositó el 31 de mayo de 1991 en la ATCC con el número de identificación CRL-10762. Las moléculas CTLA4Ig solubles producidas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden o no incluir una secuencia peptídica de señalización (directora). La FIG 19 y la FIG 20 incluyen una ilustración de una secuencia peptídica de señalización (directora). Típicamente, las moléculas no incluyen una secuencia peptídica de señalización.

20 La L104EA29YIg es una proteína de fusión que es una molécula mutante de CTLA4 soluble que comprende un dominio extracelular de de CTLA4 de tipo silvestre con cambio de aminoácidos A29Y (un resto de aminoácido tirosina que sustituye a una alanina en la posición 29) y

25 L104E (un residuo de aminoácido ácido glutámico que

sustituye a una leucina en la posición +104) unidos a una cola Ig. La FIG. 20 ilustra la L104EA29YIg. La secuencia de aminoácidos de L104EA29YIg comprende la alanina en la posición aminoacídica -1 hasta la lisina en la posición aminoacídica +357 tal como se muestra en la FIG. 20. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos de L104EA29YIg comprende metionina en la posición aminoacídica +1 hasta lisina en la posición aminoacídica +357 tal como se muestra en la FIG. 20. La L104EA29YIg comprende un residuo de aminoácidos de unión a glutamina en la posición +125 y una porción Ig que comprende ácido glutámico en la posición +126 a través de la lisina de la posición +357. El ADN que codifica la L104EA29YIg se depositó en junio del 2000 en la American Type Culture Collection (ATCC), conforme a lo dispuesto en el Tratado de Budapest y se le ha asignado el número de referencia ATCC PTA-2104. La 104EA29Y-Ig se describe en las solicitudes de patente de Estados Unidos codependientes con los números de serie 09/579,927, 60/287,576 y 60/214,065 y en el documento WO/01/923337 A2, que se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad. Las moléculas L104EA29YIg solubles producidas mediante los métodos de cultivo de la presente invención pueden incluir o no una secuencia peptídica de señalización. Típicamente, las moléculas producidas de

acuerdo con la invención no incluyen una secuencia peptídica de señalización.

Tal como se usa en el presente documento, el término "soluble" se refiere a cualquier molécula o
5 fragmento de la misma que no está unido o enlazado a una célula, es decir, en circulación. Por ejemplo, la CTLA4 puede hacerse soluble uniendo un resto Ig al dominio extracelular de CTLA4.. Alternativamente, una molécula tal como la CTLA4 puede volverse soluble eliminando su
10 dominio transmembrana. Típicamente, las moléculas solubles producidas de acuerdo con la invención no incluyen una secuencia de señalización (o directora).

Una molécula CTLA4 soluble se refiere a una molécula no unida a la superficie celular (es decir, en
15 circulación) que comprende CTLA4 de tipo silvestre o cualquier porción o derivado que se une a B7, incluidos, pero no limitados a, proteínas de fusión CTLA4 solubles; proteínas de fusión CTLA4 solubles tales como proteínas de fusión CTLA4Ig (por ejemplo, ATCC 68629), en las que
20 el dominio extracelular de CTLA4 está fusionado con un resto Ig, que es una molécula Ig completa o una porción de la misma, preferentemente toda una región constante Ig o una porción de la misma, tal como toda IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4),
25 IgC γ 4, IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2

(IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCépsilon) o una porción de las mismas, volviendo la molécula de fusión soluble; las proteínas de fusión CTLA4 solubles en las que el dominio extracelular está fusionado a o unido con
5 una porción de una proteína biológicamente activa o químicamente activa tal como el producto génico E7 del virus del papiloma (CTLA4-E7), el antígeno asociado a melanoma p97 (CTLA4-p97) o la proteína env del VIH (CTLA4-env gp120), tal como se describe en el documento
10 de patente de Estados Unidos N° 5,844,095, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad; proteínas de fusión (quiméricas) híbridas tales como la CD28/CTLA4Ig tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5,434,131, que
15 se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad; moléculas CTLA4 con el dominio transmembrana eliminado para volverlas solubles (véase, por ejemplo, M.K. Oaks y col., 2000, *Cellular Immunology*, 201:144-153, que se incorpora al presente documento por referencia en
20 su totalidad); la molécula CTLA4 mutante L104EA29YIg.

Una molécula CTLA4 también puede ser una molécula mutante de CTLA4 soluble. Las moléculas CTLA4 solubles producidas de acuerdo con la presente invención pueden incluir o no una secuencia peptídica de
25 señalización (directora). El péptido de señalización

puede ser cualquier secuencia que permitirá la secreción de la molécula, incluido el péptido de señalización de oncostatina M (Malik y col., 1989, *Molec. Cell. Biol.*, 9:2847-2853) o CD5 (N.H. Jones y col., 1986, *Nature*, 323:346-349) o el péptido de señalización de cualquier proteína extracelular. La molécula CTLA4 soluble producida mediante los métodos de cultivo de la invención puede incluir el péptido de señalización de oncostatina M unido al extremo N terminal del dominio extracelular de la CTLA4. Típicamente, en la invención, las moléculas no incluyen una secuencia peptídica de señalización.

"Proteína de fusión CTLA4" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende el dominio extracelular de CTLA4 de tipo silvestre, o una porción del mismo que se une a B7, fusionado con un resto no-CTLA4 que vuelve la molécula CTLA4 soluble, tal como un resto Ig. Por ejemplo, una proteína de fusión CTLA4 puede incluir el dominio extracelular de CTLA4 fusionado con toda, o una porción de, la región constante Ig. Ejemplos de dominios constantes Ig (o porciones del mismo) que pueden fusionarse con CTLA4 incluyen todos, pero no están limitados a, los enumerados anteriormente en el presente documento. Una proteína de fusión CTLA4 puede ser también una molécula CTLA4 mutante.

Tal como se usa en el presente documento, "resto no-CTLA4" se refiere a una molécula o porción de la misma que no se une a CD80 y/o CD86 y no interfiere en la unión de la CTLA4 a su ligando. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, un resto Ig que es toda, o una porción de, una molécula Ig, una porción de una proteína biológicamente o químicamente activa tal como un producto génico E7 del virus del papiloma (CTLA4-E7), el antígeno p97 asociado a melanoma (CTLA4-p97) o la proteína env del VIH (CTLA4-env gp120) (tal como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° de serie 5,844,095, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad). Los ejemplos de restos Ig incluyen todo, o una porción del dominio constante de la inmunoglobulina, tal como IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) o IgC ϵ (IgC ϵ). El resto Ig puede incluir los dominios bisagra, CH2 y CH3 o los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de las regiones constantes mencionadas anteriormente u otras regiones constantes. Preferentemente, el resto Ig es humano o de mono e incluye los dominios bisagra, CH2 y CH3. Del modo más preferente, el resto Ig comprende los dominios bisagra,

CH2 y CH3 de IgC γ 1 humano, o es los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgC γ 1 humano. En un resto Ig, la región constante Ig, o una porción de la misma, puede mutarse, dando como resultado una reducción de sus funciones efectoras (véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 5,637,481, 5,844,095 y 5,434,131.

El dominio extracelular de CTLA4 se refiere a cualquier porción de CTLA4 de tipo silvestre que reconoce y se une a B7. Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende metionina en la posición +1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (FIG. 21). Por ejemplo, un dominio extracelular de CTLA4 comprende alanina en la posición -1 hasta ácido aspártico en la posición +124 (FIG. 21).

Tal como se usa en el presente documento, el término "mutación" se refiere a un cambio en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la molécula de tipo silvestre, por ejemplo, un cambio en el ADN y/o en las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre. Una mutación en el ADN puede cambiar un codón, provocando un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada. Un cambio en el ADN puede incluir sustituciones, supresiones, inserciones, ajuste alternativo o truncaciones. Un cambio de aminoácidos puede incluir sustituciones, deleciones, inserciones,

adiciones, truncaciones o errores de procesamiento o escisión de la proteína. De modo alternativo, las mutaciones en una secuencia de aminoácidos puede dar como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, como se entiende bien en la técnica. Como se entiende, también, que determinados codones de nucleótidos codifican el mismo aminoácido. Los ejemplos incluyen los codones de nucleótidos CGU, CGG, CGC y CGA, que codifican el aminoácido arginina (R); o los codones GAU y GAC, que codifican el aminoácido ácido aspártico (D).

De este modo, una proteína puede codificarse mediante uno o más moléculas de ácidos nucleicos que difieren en sus secuencias de nucleótidos, pero que aún así codifican moléculas de proteína que tienen secuencias idénticas. La molécula mutante puede tener una, o más de una, mutación. La secuencia de aminoácidos siguiente se presenta como guía:

20

25

5

10

15

20

25

Aminoácido	Símbolo	Símbolo de una letra	Codones
Alanina	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cisteína	Cys	C	UGU, UGC
Ácido aspártico	Asp	D	GAU, GAC
Ácido glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUU, UUC
Glicina	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidina	His	H	CAU, CAC
Isoleucina	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lisina	Lys	K	AAA, AAG
Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAU, AAC
Prolina	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Treonina	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valina	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento o porción" es una parte o segmento de una molécula. Para CTLA4 ó CD28, un fragmento o porción es preferentemente el dominio extracelular de CTLA4 ó CD28, o una parte o segmento del mismo, que reconoce y se une a B7 o interfiere con una B7 de modo que bloquea la unión a CD28 y/o CTLA4. También, tal como se usa en el presente documento, "que corresponde" significa que comparte identidad secuencial.

10 Tal como se usa en el presente documento, un "derivado" es una molécula que comparte la similaridad secuencial y la actividad de su molécula progenitora. Por ejemplo, un derivado de CTLA4 incluye una molécula CTLA4 soluble que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 15 70% similar al dominio extracelular de la CTLA4 de tipo silvestre, y que reconoce y se une a B7, por ejemplo CTLA4Ig o la molécula mutante de CTLA4 soluble L104EA29YIg. Un derivado significa cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos y/o calidad química del aminoácido, por ejemplo 20 análogos de aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, "regular una respuesta inmunitaria" es activar, estimular, regular al alza, inhibir, bloquear, reducir, atenuar, regular a la baja o modificar la respuesta inmunitaria. Pueden tratarse una 25 variedad de enfermedades, por ejemplo, enfermedades

autoinmunitarias, regulado una respuesta inmunitaria regulando, por ejemplo, de forma funcional interacciones de células positivas a CTLA4 y/o CD28 con células positivas a B7. Por ejemplo, un método de regulación de una respuesta
5 inmunitaria comprende poner en contacto células positivas a B7 con una molécula CTLA4 soluble, tal como las que se producen de acuerdo con la invención, para formar complejos CTLA4/B7 solubles, en los que la molécula CTLA4 interfiere con la reacción de una molécula CTLA4 y/o CD28 endógena con
10 la molécula B7. "Bloquear" o "inhibir" un receptor, señal o molécula, tal como se denomina en el presente documento, significa interferir con la activación del receptor, señal o molécula, tal como se detecta mediante un ensayo reconocido en la técnica. El bloqueo o la inhibición puede ser total o
15 parcial.

Tal como se usa en el presente documento, "que bloquea la interacción de b7" se refiere a que interfiere en la unión de B7 a sus ligandos, tales como CD28 y/o CTLA4, obstruyendo, por consiguiente, las interacciones de
20 linfocitos T y células positivas a B7. Los ejemplos de agentes que bloquean las interacciones de B7 incluyen, pero no están limitadas a, moléculas tales como un anticuerpo (o porción del mismo) que reconoce y se une a cualquiera de las moléculas CTLA4, CD28 o B7 (por ejemplo, B7-1, B7-2); una
25 forma soluble (o una porción de la misma) de las moléculas

tales como la CTLA4 soluble; un fragmento peptídico u otra molécula pequeña diseñada para interferir con la señal celular a través de la interacción mediada por CTLA4/CD28/B7. En una modalidad preferente, el agente bloqueante es una

5 molécula CTLA4 soluble, tal como CTLA4Ig (ATCC 68629) o L104EA29YIg (ATCC PTA-2104); una molécula CD28 soluble, tal como CD28Ig (ATCC 68628); una molécula B7 soluble, tal como B7-Ig (ATCC 68627); un anticuerpo monoclonal anti-B7 (por ejemplo, ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-

10 301, ATCC HB-11341 y anticuerpos monoclonales tal como se describen en el documento de patente de Estados Unidos N° 6,113,898 o en Yokochi y col., 1982, *J. Immunol.*, 128(2):823-827); un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 (por ejemplo, ATCC HB-304, y anticuerpos monoclonales tal como se describen en

15 las referencias 82-83); y/o un anticuerpo monoclonal anti-CD28 (por ejemplo, ATCC HB 11944 y MAb 9.3, tal como se describen en Hansen y col., 1980, *Immunogenetics*, 10: 247-260 o Martin y col., 1984, *J. Clin. Immunol.*, 4(1):18-22). El bloqueo de las interacciones de B7 puede detectarse usando

20 análisis reconocidos en la técnica tales como la determinación de la reducción síntomas asociados a la enfermedad inmunitaria (por ejemplo, enfermedad reumática), la determinación de una reducción de las interacciones linfocito T / célula B7 o la determinación de una reducción

25 en la interacción de B7 con CTLA4/CD28. El bloqueo puede ser

parcial o total.

Tal como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz de una molécula se refiere a una cantidad que bloquea la interacción de la molécula con su ligando. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es la cantidad de la molécula que, cuando se une a moléculas B7 o células positivas a B7, inhibe que las moléculas B7 se unan a ligandos endógenos tales como CTLA4 y CD28. De modo alternativo, una cantidad eficaz de una molécula que bloquea la interacción de B7 con CTLA4 y/o CD28 es la cantidad de la molécula que, cuando se une a moléculas CTLA4 y/o CD28 en linfocitos T, inhibe que las moléculas B7 se unan a ligandos endógenos tales como CTLA4 y CD28. La inhibición o bloqueo puede ser parcial o completo.

Para protocolos clínicos, es preferente que el resto Ig de una proteína de fusión, tal como CTLA4Ig o CTLA4Ig mutante, no facilite una respuesta inmunitaria perjudicial en un sujeto. El resto preferente es toda, o una porción de, la región constante Ig, incluidas las regiones constantes de Ig humana o de primate no humana. Los ejemplos de regiones de Ig adecuadas incluyen IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) o IgC ϵ (IgC ϵ), incluidos los dominios bisagra, CH2 y

CH3 o los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, que están implicados en funciones efectoras tales como la unión a receptores Fc, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés) o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés). El resto Ig puede contener una o más mutaciones, (por ejemplo, en el dominio CH2 para reducir las funciones efectoras tales como CDC o ADCC, por sus siglas en inglés) en las que la mutación modula la capacidad del Ig para unirse a su ligando aumentando o disminuyendo la capacidad del Ig para unirse a receptores Fc. Por ejemplo, las mutaciones en el resto Ig pueden incluir cambios en cualquiera o todos los restos cisteína del dominio bisagra. Por ejemplo, las cisteínas de las posiciones +130, +136, y +139 se sustituyen por serina. El resto Ig también puede incluir la prolina en la posición +148 sustituida con una serina. Además, las mutaciones en el resto Ig pueden incluir que tenga la leucina en la posición +144 substituida por fenilalanina; la leucina en la posición +145 sustituida por ácido glutámico; o la glicina en la posición +147 sustituida por alanina.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos exponen aspectos específicos de la invención ilustrando la invención y proporcionan una descripción de los presentes métodos para aquellos de habilidad en la técnica. Los Ejemplos no deberían

interpretarse como que limitan la invención, ya que los Ejemplos simplemente proporcionan metodología y ejemplificación que son útiles en la comprensión y práctica de la invención y sus diversos aspectos.

- 5 Los Ejemplos 1-5 según se expone más adelante describen experimentos relativos a métodos de cultivo celular que implican adición de glucocorticoides durante la actividad del cultivo.

EJEMPLO 1

- 10 En este estudio, se estudiaron los efectos intracelulares de dexametasona (DEX) en el método de glucosilación celular de CHO y los efectos intracelulares debidos a la actividad de sialidasa. Aquí se demuestra por primera vez que DEX fue capaz de mejorar la sialilación de
- 15 una glucoproteína de condensación recombinante producida por CHO. Los efectos netos de DEX en promover sialilación incrementada probada en cultivos de matraz de agitación se confirmaron después exitosamente en biorreactores controlados y dieron como resultado contenido en ácido siálico potenciado
- 20 así como velocidades de de-sialilación reducidas en los cultivos semicontínuos.

Línea celular y medio

- La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originalmente a partir de células parentales DG44 y
- 25 se cultivó en un medio de crecimiento libre de proteínas

patentado.

Experimentos de matraz de agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de agitación de 250 ml (VWR international) con volúmenes de
5 partida de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6×10^5 células/ml. Los cultivos se situaron en una plataforma agitadora (VWR international) a 150 rpm y se mantuvieron a 37°C y CO₂ al 6% durante diez días. Los cultivos se
10 mostraron diariamente y el pH se ajustó según se necesitó usando carbonato de sodio 1M y se alimentaron con glucosa y glutamina cada dos días con el fin de mantenerlas a niveles adecuados. Se midieron la densidad y la viabilidad celulares fuera de línea usando un contador celular automatizado Cedex (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania). El pH de los cultivos y
15 las concentraciones para glucosa y glutamina se midieron fuera de línea usando un Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).

Operación de biorreactores

Los experimentos de biorreactores se llevaron a
20 cabo en biorreactores de 5 l (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) con volúmenes de trabajo de 1.5 l. La agitación, el pH y el oxígeno disuelto se controlaron a 150 rpm, 7.05 y saturación del aire al 50%, respectivamente. La temperatura se controló inicialmente a 37°C, pero se cambió a una
25 temperatura más baja durante el cultivo prolongando la

viabilidad del cultivo. Los biorreactores se operaron en modo semicontinuo y se alimentaron diariamente comenzando en el día 3 con el medio nutriente patentado manteniendo concentraciones adecuadas para glucosa y otros nutrientes. Se
5 tomaron muestras durante el método de cultivo celular y se analizaron para densidad celular, viabilidad celular, sustratos y metabolitos.

Análisis de western blot de $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa ($\alpha 2,3$ -ST) y $\beta 1,4$ -galactosiltransferasa ($\beta 1,4$ -GT)

10 Aproximadamente 10^7 células CHO se lavaron con Solución Salina Amortiguada con Fosfato 1X (PBS), se lisaron con 1 ml de amortiguador de muestra de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA), después se desnaturalizaron a 90°C durante 5 minutos. Los lisados de células completas se
15 separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 4-15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA), y se exploraron con anticuerpos primarios y secundarios. Los anticuerpos primarios fueron anticuerpos policlonales de conejo $\alpha 2,3$ -ST
20 anti-humanos y anticuerpos policlonales de conejo $\beta 1,4$ -GT anti-humanos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). El anticuerpo secundario fue anticuerpo anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las membranas se retiraron y se re-
25 exploraron con un anticuerpo de β -actina (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo secundario antirratón conjugado con HRP. La inmunodetección se llevó a cabo usando un sistema de detección de análisis de western blot de quimioluminiscencia potenciada (GE Healthcare) y se
5 visualizó con un Sistema de Formación de Imágenes VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Medida de actividad sialidasa en sobrenadante

La actividad sialidasa se analizó usando el Kit de Ensayo de Neuraminidasa (Sialidasa) Amplex Red (Invitrogen,
10 Carlsbad, CA). Brevemente, la neuraminidasa en la muestra se usó desialilando fetuina. Este ensayo utiliza Amplex Red detectando H_2O_2 generado por oxidación de los residuos de galactosa desialilada en la fetuina por galactosa oxidasa. El H_2O_2 , en presencia de HRP, reacciona estequiométricamente con el reactivo
15 de Amplex Red generando el producto de oxidación rojo-fluorescente, resorufina 5, que se analiza después bien fluorométricamente o bien espectrofotométricamente. En cada ensayo, se añadieron 50 μ l de solución de trabajo (Amplex Red 100 μ M, 0,2 u/ml de HRP, 4 u/ml de galactosa oxidasa y 500 μ g/ml
20 de fetuina) dentro de cada pocillo de microplaca conteniendo 50 μ l de sobrenadante de cultivo celular diluido. Después de incubación de 30 minutos a 37 °C, se analizaron muestras para absorbancia a 560 nm usando un lector de microplaca.

Ensayo de ácido siálico

25 El ácido siálico para la proporción molar de

proteína recombinante se calculó determinando las concentraciones de ácido siálico y de proteína recombinante. El ácido siálico (SA), incluyendo N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), se liberó por hidrólisis de ácido parcial. Los derivados se separaron después por HPLC en fase reversa determinando contenido en ácido siálico. Las concentraciones proteicas se determinaron por absorbancia UV a 280 nm. El contenido de ácido siálico se indica en forma de proporciones molares, que son los moles totales de Neu5Ac y de Neu5Gc por mol de glucoproteína recombinante. Los contenidos de ácido siálico se dan como valores normalizados, que son los valores reales divididos por un valor arbitrario. En los estudios de los que se informa en el presente documento se usó el mismo divisor para normalizar todos los datos de contenido de ácido siálico.

Medida de oligosacáridos N-ligados

Se usó cromatografía de intercambio aniónico a pH alto con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD) para el trazado de perfiles de oligosacáridos N-ligados (Basa and Spellman 1990; Townsend and Hardy 1991) proporcionando información en glucosilación N-ligada específica de sitio. Los oligosacáridos N-ligados se escindieron de la proteína y se separaron en HPAEC-PAD en cuatro dominios en base a la cantidad de ácido siálico presente. El dominio I representa las especies asialo. Los dominios II, III y IV son especies

sialiladas y representan especies monosialiladas, disialiladas y tri- y tetra-sialiladas, respectivamente. La fracción de especies sialiladas unidas a N se da como el porcentaje de especies sialiladas unidas a N dentro del total de especies de oligosacáridos unidos a N total, lo que incluye tanto las especies asialo como las sialiladas. Las fracciones de especies sialiladas unidas a N se dan como valores normalizados, que son los valores reales divididos por un valor arbitrario. En los estudios de los que se informa en el presente documento se usó el mismo divisor para normalizar todos los datos de la fracción de especies sialiladas unidas a N.

Medida de oligosacáridos O-ligados

La glucosilación O-ligada se caracterizó por análisis de masa intacta de un estándar de referencia y de muestras purificadas de Proteína A de la proteína de condensación (Referencia). Las muestras se diluyeron en Tris 100 mM, NaCl 25 mM, pH 7.6 y se incubaron con PNGasa F durante toda una noche eliminando enzimáticamente todos los oligosacáridos N-ligados. Las muestras se inyectaron después para análisis de masa intacta después de mezclar con un estándar interno de insulina. El contenido de ácido siálico O-ligado se comunica en forma de proporciones molares, que son los moles de ácido siálico O-ligado por mol de glucoproteína recombinante.

Resultados

La dexametasona aumenta el contenido de ácido siálico y el porcentaje de especies sialiladas en oligosacáridos N-ligados

5 La línea celular DG44 de CHO que expresa la glucoproteína de condensación se trató con diversos niveles de DEX evaluando si DEX afectó el contenido de ácido siálico y los porcentajes de las diferentes especies sialiladas. Este estudio se llevó a cabo en

10 matraces de agitación de 250 ml duplicados usando las condiciones de cultivo como se describen anteriormente. En el segundo día después de la inoculación, se añadió DEX a cultivos de células CHO a concentraciones finales que varían desde DEX 0.01 μ M hasta DEX 10 μ M. Los

15 cultivos se recogieron en el día 10 y la proteína de condensación se purificó usando una columna de proteína A y se analizó para contenido de ácido siálico total, para contenido de ácido siálico O-ligado total y para el perfil de N-ligado. La sialilación se incrementó en los

20 cultivos tratados con DEX en una manera dependiente de concentración (Tabla 1).

Tabla 1

5	Tratamien to de DEX (µM)	Incremen	Incremen	Incremen	Incremen	Incremen	Increme
		to en	to en	to en	to en	to en	nto en
10		porcenta	porcenta	porcenta	porcenta	porcenta	porcent
		je de	je de N-	je de N-	je de N-	je de N-	aje de
		ácido	enlace	enlace-	enlace-	enlace-	ácido
		siálico	asialo-	Mono-		Tri y	siálico
		(%)	(%)	(%)	Di	tetra-	de O-
					- (%)	(%)	enlace
15							(%)
	0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.01	9.3	-8.6	6.6	13.9	4.5	0.0
	0.1	13.0	-9.6	7.3	13.9	13.6	0.5
	1.0	13.0	-10.0	4.3	19.4	15.9	0.9
	10	20.4	-15.6	7.3	24.3	20.5	0.0

Concentraciones de DEX desde 0.01 µM hasta 10 µM dieron como resultado incremento en 9.3% al 20.4% en el contenido de ácido siálico, con un efecto máximo a 10 µM.

20 Comparados con el control, los cromatógrafos de oligosacáridos N-ligados para cultivos con tratamiento de DEX mostraron fracciones monosialiladas, disialiladas y las fracciones trisialiladas más tetrasialiladas del 4.3% al 7.3%, 13.9% al 24.3% y 4.5% al 20.5%, respectivamente. A la

25 inversa, hubo una reducción 8.5% al 15.6% comparada con el

control en fracciones asialo en las distribuciones de oligosacáridos para los cultivos suplementados con DEX. Los cromatogramas N-ligados también mostraron el efecto máximo a DEX 10 μ M. Estos resultados indican sialilación incrementada en los cultivos tratados con DEX. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las proporciones molares de ácido siálico O-ligado a partir de las muestras tratadas con DEX.

DEX promueve la expresión de β 1,4-galactosiltransferasa (β 1,4-GT) y α 2,3-sialiltransferasa (α 2,3-ST)

Se empleó el análisis de western blot dilucidando los mecanismos potenciales de DEX sobre sialilación estudiando la expresión de dos enzimas, β 1,4-GT y α 2,3-ST, que están implicadas en las rutas de adición de ácido siálico. En este experimento, se añadió DEX el segundo día después de la inoculación a cultivos a concentraciones desde 0.1 μ M hasta 100 μ M y las células se recogieron para análisis de western blot después de tres días. La proteína doméstica β -actina se usó comparando la carga de muestras. Como se muestra en las Figuras 1A y 1B, la expresión de niveles de β 1,4-GT y de α 2,3-ST se incrementó sustancialmente en los cultivos tratados con DEX comparados con los cultivos sin tratamiento con DEX. La intensidad de expresión para ambas enzimas se incrementó, en general, con la concentración de

DEX. Estos resultados demostraron que DEX fue capaz de estimular expresión de las sialiltransferasas β 1,4-GT y α 2,3-ST en células CHO.

Efecto citoprotector de los resultados de DEX en
5 actividad sialidasa reducida en el sobrenadante de cultivo

En el Ejemplo 3, se mostró que el tratamiento de DEX incrementaba la expresión de la proteína anti-apoptótica GILZ dando como resultado aparición retardada de muerte celular y viabilidad potenciada de los cultivos celulares de CHO. Para determinar si el incremento en viabilidad celular debido a DEX podría disminuir el efecto degradador de las sialidasas en la proteína de condensación recombinante, se inició un estudio de matraz de agitación comparando viabilidad celular y perfiles de actividad sialidasa de sobrenadantes de cultivos con o sin DEX 1 μ M. Como se muestra en la Figura 2A y en la Fig. 2B, la actividad sialidasa incrementada estaba asociada con las viabilidades celulares disminuidas tanto en los cultivos tratados con DEX como en los cultivos no tratados. La viabilidad celular disminuyó desde el $98,0 \pm 0,1\%$ en el día 4 hasta el $85,0 \pm 2,7\%$ en el día 10 en los cultivos tratados con DEX comparada con una viabilidad en el día 10 del $70,2 \pm 4,6\%$ para el control. La medida de absorbancia de actividad sialidasa se incrementó desde el 0.006 ± 0.002 en el día 4 hasta el 0.024 ± 0.003 en el día 10 en los cultivos tratados con DEX comparada con un

valor del día 10 de 0.047 ± 0.004 en el control. Así, la velocidad a la que los cultivos tanto declinaron en viabilidad celular así como se incrementaron en actividad sialidasa fueron significativamente más bajas en los cultivos
5 tratados con DEX. Estos resultados sugieren que DEX fue capaz de inhibir liberación de sialidasa por su efecto citoprotector.

Comparación de dexametasona con otros dos glucocorticoides, hidrocortisona y prednisolona

10 Se evaluaron también compuestos glucocorticoides adicionales, hidrocortisona (HYC) y prednisolona (PRD) determinando si el efecto de DEX en incrementar sialilación en las células CHO podría extenderse a otros compuestos glucocorticoides. DEX, HYC y PRD se añadieron en el medio de
15 cultivo celular en el segundo día después de inoculación en las concentraciones finales 0, 0.1, 1 y 10 μM . La Fig 3A y la Fig 3B muestran el contenido normalizado de ácido siálico total y la fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N después del cultivo de 10 días para las diferentes
20 condiciones de glucocorticoides. El contenido de ácido siálico total en concentraciones de glucocorticoide entre 0.1 y 10 μM fue 14.0 ± 0.5 para DEX, de 11.2 ± 0.1 a 13.0 ± 0.2 para HYC y de 11.8 ± 0.2 a 13.4 ± 0.8 para PRD, en comparación con 10.2 ± 0.2 para el control. La fracción de
25 especies sialiladas unidas a N en concentraciones de

glucocorticoides entre 0.1 y 10 μ M fue 85.6 ± 1.6 a 88.8 ± 0.9 para DEX, 79.8 ± 1.6 a 89.6 ± 0.1 para HYC y 83.7 ± 0.1 a 89.0 ± 0.2 para PRD, en comparación con 77.1 ± 0.7 para el control. Así, de forma similar a DEX, tanto HYC como PRD mostraron también incrementos en sialilación y el efecto máximo se observó a 10 μ M para todos los tres compuestos glucocorticoides dentro del intervalo de concentración estudiado. Sin embargo, las concentraciones más altas de HYC y PRD se requirieron para lograr el mismo nivel de potenciación de la sialilación como DEX.

Mecanismo para potenciación de sialilación por dexametasona implica el receptor de glucocorticoides

Con el fin de determinar si la mejora de sialilación a partir de adición de DEX estuvo mediada por el receptor de glucocorticoides (GR), el antagonista de GR mifepristona (RU-486) se añadió al medio de cultivo celular antes de tratamiento con DEX. Específicamente, se añadió 1 μ M de RU-486 48 horas después de inoculación y DEX, a concentraciones de 0.1, 1 y 10 μ M, se añadió después 24 horas más tarde. DEX se añadió también a cultivos sin RU-486 como controles. Para condiciones con o sin RU-486, el contenido normalizado de ácido siálico total y la fracción normalizada de especies sialiladas unidas a N inducidas por DEX se muestran en la Fig. 4A y en la Fig. 4B, respectivamente. La capacidad de DEX para potenciar la sialilación del producto

se redujo sustancialmente en presencia de 1 μ M de RU-486 y fue lo más evidente para la condición de DEX 0.1 μ M. El contenido de ácido siálico total y la fracción de especies sialiladas unidas a N para las condiciones de DEX 0.1 μ M disminuyó de 15.1 ± 0.1 y 92.2 ± 2.0 (sin RU-486) hasta 2.7 ± 0.1 y 81.5 ± 0.8 (con RU-486 1 μ M), respectivamente. Estos resultados indican que el mecanismo por el que DEX incrementó sialilación era dependiente de GR, dado que RU-486 compite con DEX por el dominio de unión a ligando del GR (Raux-Demay y col. 1990).

Aplicación de DEX en cultivo de biorreactor semicontinuo

El efecto de DEX en el aumento de la sialilación de proteína de condensación encontrada en los matraces de agitación se probó después en cultivos semicontinuos usando biorreactores de 5 l controlados. Los biorreactores se operaron como describe la sección de métodos. Se observó un contenido de ácido siálico total (Fig. 5A) y una fracción de especies sialiladas ligadas a N (Fig. 5B) más elevados en los cultivos con la adición de un bolo de DEX 1 μ M. El contenido de ácido siálico total con DEX fue 16.5 ± 0.1 en comparación con 14.2 ± 0.1 para el control (16.2% de aumento). De forma similar, la fracción de las especies sialiladas con DEX fue 90.2 ± 1.3 en comparación con 77.9 ± 1.6 para el control (5.8% de aumento). De acuerdo con la observación en

estudios de actividad de sialidasa en matraces de agitación (Fig. 3A y Fig. 3B), los contenidos de siálicos totales decrecieron entre los días 8 a 14 de 17.9 ± 0.1 a 16.5 ± 0.1 (-7.8%) con DEX en comparación con de 16.3 ± 0.1 a 14.2 ± 0.1 (-12.9%) para el control. De forma similar, el porcentaje de la fracción sialilada entre los días 8 a 14 disminuyó de 97.7 ± 0.9 a 90.2 ± 1.3 (-7.7%) con DEX en comparación con de 91.3 ± 0.9 a 77.9 ± 1.6 (-14.7%) para el control.

El incremento en sialilación de glucoproteínas por DEX se confirmó adicionalmente a diversas escalas de biorreactores. El contenido de ácido siálico final normalizado y el porcentaje normalizado de fracciones sialiladas a partir de diferentes funcionamientos se resumen en la Figura 6. Dentro de estos funcionamientos, la condición de DEX incluyó funcionamientos con DEX añadida como un bolo o incluida en el medio nutriente. Como se indica en la Figura 6, DEX mostró mejora en sialilación significativa con contenido en ácido siálico final potenciado (valor de $p < 0.001$ por prueba t) y fracción de especies sialiladas finales (valor de $p < 0.001$ por prueba t).

Conclusión

La adición de dexametasona a un cultivo de CHO que produce una glucoproteína de condensación recombinante dio como resultado sialilación incrementada. Este estudio fue el primero en demostrar que la dexametasona fue capaz de

210
incrementar la expresión de las glucosiltransferasas α 2,3-ST y β 1,4-GT y que el efecto de dexametasona estaba mediado por receptores de glucocorticoides. En conjunto el efecto de la dexametasona en mejorar la sialilación implicó tanto efectos
5 intracelulares por las glucosiltransferasas así como efectos extracelulares por prolongar la viabilidad de cultivos que disminuye la presencia de sialidasas liberadas dentro del sobrenadante del cultivo a través de lisis celular. Se encontró que dexametasona es un método conveniente para
10 mejora de sialilación.

Ejemplo 2

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originalmente a partir de células parentales
15 DG44 y se cultivó en un medio de crecimiento patentado libre de proteínas. Las células huésped se modificaron mediante ingeniería genética para segregar una proteína de condensación de IgG bajo el control de promotor de CMV.

20 Experimentos de matraz de agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de agitación de 250 ml (VWR international) con volúmenes de partida de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6×10^5 células/ml. Los matraces de agitación se situaron en una
25 plataforma agitadora (VWR international) a velocidad de

rotación de 150 rpm. Las células se cultivaron en condición humidificada estándar a 37°C y a CO₂ al 6%, para una duración de diez días con ajuste de pH diario usando carbonato de sodio 1 M y se alimentaron con glucosa y glutamina cada dos días con el fin de mantenerlas a cierto nivel. La densidad celular, la viabilidad celular y los sustratos/metabolitos se analizaron fuera de línea por un sistema de recuento celular automatizado Cedex (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania) y un Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA). El sobrenadante de cada cultivo se recogió para análisis de SEC.

Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC, por sus siglas en inglés)

El análisis de SEC se llevó a cabo según el método previamente publicado (Perico y col., 2008) con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras purificadas de Proteína-A se sometieron a funcionamiento en un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) en columna Tosoh Bioscience TSK-Gel G3000 SWx1 (7.8 DI x 30 cm, partículas de 5 µm). La fase móvil contenía Solución Salina Amortiguada con Fosfato 1 x (PBS) a pH 7.4. El caudal fue 0.5 ml/minuto y la temperatura en columna se controló a 25 °C. La señal se sometió a control por absorbancia a longitud de onda de 280 nm.

Análisis de western blot de glutatión reductasa y

de receptor de glucocorticoides

Después de lavarse con PBS 1 x, se lisaron aproximadamente 10^7 células CHO con 1 ml de amortiguador de muestras de Laemmli (Bio-Rad Laboratories) y se
5 desnaturalizaron a 90 °C durante 5 minutos. Los lisados de células completas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 4-15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Bio-Rad Laboratories), y se exploraron con anticuerpos primarios y secundarios. El
10 anticuerpo primario para detección de glutatión reductasa fue el anticuerpo monoclonal desarrollado contra los aminoácidos 391-510 que mapean cerca del extremo C-terminal de la glutatión reductasa de origen humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Aunque el origen de hámster
15 chino no se enumeró por el fabricante para la detección de glutatión reductasa usando este anticuerpo, un experimento preliminar mostró que hubo sólo una banda detectada en los lisados tanto de células CHO como de células HL60 de origen humano con un tamaño molecular aparente idéntico en la
20 mancha. El anticuerpo primario usado para detección de receptor glucocorticoide fue anticuerpo monoclonal anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). El anticuerpo secundario fue anticuerpo antirrattón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz Biotechnology,
25 Santa Cruz, CA). Las membranas se retiraron y se re-

exploraron con un anticuerpo de β -actina (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La inmunodetección se llevó a cabo con el sistema de detección de análisis de western blot de quimioluminiscencia
5 potenciada (GE Healthcare) y se visualizó con un Sistema de Formación de Imágenes VersaDoc (Bio-Rad Laboratories).

Resultados

**La dexametasona (DEX) reduce la agregación de proteínas de condensación de IgG producidas por CHO en un
10 amplio intervalo de concentraciones**

La Figura 7A muestra un porcentaje significativamente reducido de especies de peso molecular alto (HMW) en proteína de condensación de IgG después de tratar células CHO con DEX a una concentración final 1 μ M en
15 el medio de cultivo. Los componentes principales de especies HMW fueron dímeros y trímeros formados covalentemente o de forma no covalente y considerados categóricamente como agregados de proteínas. Considerando que se obtuvo un 15% de reducción de agregación de proteínas en las condiciones de
20 cultivo, que ya se habían optimizado, la mejora fue significativa, en la práctica, en métodos de fabricación. Para establecer la curva de respuesta a dosis y el transcurso del tiempo para los efectos de DEX en agregación de proteínas, cultivamos las células bien a concentración
25 diferente de DEX o bien a la misma concentración (1 μ M) pero

con diferente tiempo de incubación. Como se muestra en la Fig. 7C, la DEX reduce la tasa de agregación de proteínas de forma dependiente del tiempo, lo que es consistente con la dependencia del tiempo de DEX observada previamente sobre la mejora de la viabilidad celular y los perfiles de glucosilación proteica (Tabla 1 y Figura 11). No obstante, la dependencia de la concentración de DEX sobre la reducción del nivel de agregación de proteínas no fue obvia (Figura 7B), lo que sugiere que el efecto antiagregación no fue debido simplemente a la mejora de la viabilidad celular, ya que nuestros resultados previos demostraron que la viabilidad de células CHO aumentó con la concentración de DEX de 0.01 μ M a 10 μ M en el medio de cultivo.

La dexametasona regula al alza la expresión de glutatión reductasa en células CHO

Se llevó a cabo un análisis de western blot detectando expresión de glutatión reductasa en los lisados celulares completos preparados a partir de las células CHO tratadas con diversas concentraciones de DEX. Como se muestra en la Figura 8, DEX incrementa la expresión de glutatión reductasa, que podría verse incluso cuando el fármaco estaba a 1 nM. Se usó detección de β -actina para comparación de carga de muestras para eliminar la posibilidad de que la potenciación de la banda de glutatión reductasa se debiera a

la carga de muestras incrementada coincidentalmente.

GSH reduce la agregación de proteínas de condensación de IgG purificadas *in vitro*

Para determinar si GSH podría afectar por sí misma
5 la agregación de proteínas interaccionando directamente con
las proteínas, realizamos un estudio *in vitro* añadiendo GSH a
proteínas de condensación de IgG purificadas de Proteína-A
que se reconstituyeron en amortiguador de Tris-acetato, y se
analizaron perfiles de SEC. Tal como se muestra en la Figura
10 9, el porcentaje de especies de alto peso molecular se redujo
significativamente, siendo la tasa de reducción del 15,3% y
del 27,3% en presencia de GSH 1 y 3 mM, respectivamente. Los
datos demostraron claramente que GSH podría inhibir
directamente la agregación de proteínas de condensación de
15 IgG.

Los efectos de dexametasona están mediados por medio de receptores glucocorticoides

DEX es un potente glucocorticoide con acciones
farmacológicas amplias. Determinando si el efecto inhibitor
20 de DEX en agregación proteica de condensación con IgG estuvo
mediado específicamente por activación de receptores de
glucocorticoides, se confirmó primero que hay expresión
endógena de receptores de glucocorticoides (GR) en la línea
celular utilizada, que se presenta en la Fig. 10A. Dado que
25 el anticuerpo usado en el análisis de western blot se

desarrolló contra la región conservada de GR humanos, se cargó también una muestra de lisado celular completo de células HepG-2 como muestra de origen humano para propósito de validación de anticuerpos. Aunque el anticuerpo podría
5 detectar tanto GR α como GR β , el presente análisis sólo mostró una banda individual. Esto podría ser debido a que los pesos moleculares de estas dos isoformas (95 kDa frente a 90 kDa) estuvieron demasiado cerca de separarse en el gel de gradiente del 5-15% o más probablemente debido a que sólo
10 hubo una isoforma presentada en las muestras.

Dado que se encontró que DEX regula al alza la expresión de glutatión reductasa en células CHO (véase Figura 8), se indujo una evaluación adicional determinando si este efecto estuvo inducido por la activación de receptores de GR.
15 La RU-486 es un antagonista de GR y se usa a menudo como un fármaco herramienta en muchos estudios relacionados con GR. El experimento preliminar de los autores de la presente invención mostró que RU-486 no afectó la viabilidad celular de CHO y no afectó los parámetros metabólicos si las
20 concentraciones no eran más altas que 1 μ M; a 10 μ M, se observó un decrecimiento significativo en viabilidad celular y velocidad de crecimiento celular. En los experimentos subsiguientes, RU-486 se usó por lo tanto a 1 μ M o a concentraciones menores y se introdujo dentro del cultivo
25 pretratando células CHO un día antes de la adición de DEX. La

Fig. 10B muestra que en la presencia de RU-486 $1 \mu\text{M}$, el efecto regulador al alza de DEX en glutatión reductasa se atenuó, confirmando la implicación de GR.

Finalmente, se evaluaron los porcentajes de especies de P.M.A. en proteínas de condensación de IgG producidas por células CHO tratadas con DEX $0.1 \mu\text{M}$ y su combinación con diferentes concentraciones de RU-486. Consistente con el resultado en la Fig. 7B, el porcentaje de especies de P.M.A. estuvo disminuido en aproximadamente el 16% cuando el cultivo se trató con DEX $0.1 \mu\text{M}$ solo y este efecto se disminuyó gradualmente con concentraciones crecientes de RU-486 (Fig. 10C). Con la condición de que se usara igual concentración de DEX y de RU-486, la velocidad de inhibición de especies de P.M.A. fue aproximadamente la mitad de la velocidad obtenida de DEX solo, indicando que DEX como un agonista y RU-486 como un antagonista tuvieron afinidades similares compitiendo la una con la otra por GR en células CHO. Así, tomando todas las tres partes de datos en la Figura 9 conjuntamente, los resultados demostraron claramente que la inhibición de la agregación de proteínas de condensación de IgG estuvo mediada por GR.

Conclusión

Como glucocorticoide económico pero potente y con su tríada benéfica, mejorando la viabilidad celular como se describe en el Ejemplo 3 y la glucosilación como se describe

en el Ejemplo 1 e inhibiendo agregación proteica como se describe en el presente documento, la dexametasona puede proporcionar una manera simple, rentable y eficiente para potenciar en conjunto el método de cultivo celular.

5 **Ejemplo 3**

Este estudio, por primera vez, demostró que la dexametasona es capaz de evitar apoptosis de células CHO en condición libre de suero en una manera dependiente de concentración y de tiempo. DEX induce la expresión génica de
10 células GILZ (cremallera de leucina inducida por glucocorticoides). DEX se usó exitosamente en cultivo de CHO de biorreactor de 10 l mejorando la viabilidad celular y la productividad de proteínas de condensación Fc y el contenido de ácido siálico. Este estudio demostró la aplicación de DEX
15 en cultivo celular industrial mejorando la productividad de proteínas recombinantes y la glucosilación.

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó a partir de células parentales DG44 y se cultivó en
20 un medio de crecimiento químicamente definido patentado.

Experimentos de matraz de agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de agitación de 250 ml (VWR international) con volúmenes de partida de 100 ml y densidades celulares iniciales de 6×10^5
25 células/ml. Los cultivos se situaron en una plataforma

agitadora (VWR international) a 150 rpm y se mantuvieron a 37°C y CO₂ al 6% durante diez días. Los cultivos se mostraron diariamente y el ajuste de pH se realizó usando carbonato de sodio 1M y se alimentaron con glucosa y glutamina cada dos días con el fin de mantenerlas a ciertos niveles. La densidad celular y la viabilidad celular se midieron fuera de línea en un Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).

Operación de biorreactores

Los experimentos de biorreactores se llevaron a cabo en biorreactores de 10 l (Sartorius Stedim Biotech, Francia) con volúmenes de trabajo de partida de 5 l. La agitación, el pH y el oxígeno disuelto se controlaron a 150 rpm, 7.05 y saturación del aire al 50%, respectivamente. La temperatura se controló inicialmente a 37°C, y se cambió a una temperatura más baja durante el cultivo prolongando la viabilidad del cultivo. Los biorreactores se operaron en un modo por lotes y se alimentaron diariamente comenzando en el día 3 con el medio nutriente patentado manteniendo concentraciones adecuadas para glucosa y otros nutrientes. Se tomaron muestras durante el método de cultivo celular y se analizaron para densidad celular, viabilidad celular, sustratos y metabolitos.

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo

real de 5'-nucleasa TaqMan® para verificar la regulación al alza de GILZ por DEX. El ARN total, se purificó a partir de cada cultivo por triplicado con y sin DEX 1 µM usando el kit RNeasy® midi tal como se describe a continuación. El ARN

5 purificado se trató con DNaseI (Quiagen) exenta de RNasa y después se usó como plantilla para sintetizar el ADNc de primera cadena usando el kit RT² First Strand (SA Biosciences, Frederick, MD). La expresión de GILZ se determinó cuantitativamente usando la sonda específica de

10 GILZ TaqMan MGB (6-FAM-AGAGGACTTCACGTGT) y cebadores (directo: 5-CCTCCCTCATCTGTCCACTGA-3 e inverso: 5-TGGTGGGTTTGGCATTCAA-3). Se amplificaron 20 ng de ADNc usando cebadores a una concentración 900 nM y sonda a una concentración 250 nM en 1xTaqMan Fast Universal PCR Master

15 Mix (Applied Biosystem, Carlsbad, CA). Las reacciones se realizaron por triplicado en el Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System usando los parámetros de ciclación universales (20 s 95 °C, 40 ciclos de 3 s 95 °C, 30 s 60 °C). Se realizaron reacciones paralelas en la misma placa

20 analizando β-actina en cada muestra como control endógeno. El ciclo umbral de cada gen se normalizó frente al ciclo umbral del "gen doméstico" β-actina. Se calcularon los cambios normalizados en la expresión génica con respecto al control usando un método de ciclo umbral delta-delta (Livak y

25 Schmittgen, 2001).

Análisis de western blot de Bcl-2

Se lavaron aproximadamente 10^7 células CHO con Solución Salina Amortiguada con Fosfato 1X (PBS), se lisaron con 1 ml de amortiguador de muestra de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA), y después se desnaturalizaron a 90 °C durante 5 minutos. Los lisados de células completas se separaron en un gel de poliacrilamida al 4-15%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Bio-Rad Laboratories) y se exploraron con un anticuerpo monoclonal murino primario dirigido a Bcl-2 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguido por anticuerpo secundario anti-murino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se retiraron y se re-exploraron con un anticuerpo de β -actina (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario antimurino conjugado con HRP. La inmunodetección se llevó a cabo con el sistema de detección de análisis de western blot de quimioluminiscencia potenciada (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) y se visualizó con un Sistema de Formación de Imágenes VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA).

Ensayo de Valoración

Se determinó valoración por cromatografía de afinidad usando una bomba de HPCL y detección de UV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y columna de Proteína A Poros

A/20 de Applied Biosystems (100 x 4.6 mm). La proteína eluida se cuantificó usando una curva estándar de nivel 10.

Resultados

Efecto de la dexametasona sobre el crecimiento de 5 células CHO

La dexametasona glucocorticoide (DEX) se añadió a cultivos de matraces de agitación a concentraciones finales entre 0.01 a 10 μM dos días después de inoculación evaluando los efectos de glucocorticoides en viabilidad celular de CH y
10 el potencial para prolongar el periodo de cultivo celular. El perfil de la densidad celular viable (VCD) en el estudio de respuesta a dosis (Fig. 11A) muestra inhibición incrementante de crecimiento celular que tiene lugar un día después del tratamiento de DEX en una manera dependiente de dosis. El VCD
15 pico alcanzó 8.5×10^6 células/ml en el cultivo control no tratado, mientras que el VCD pico fue 6.5×10^6 células/ml en los cultivos tratados con DEX 10 μM . La viabilidad celular disminuyó rápidamente después del día 6 (Fig. 11B) y la viabilidad en porcentaje en el día 10 fue sólo 42.1%. Por el
20 contrario, las viabilidades celulares finales con 0.01 μM y DEX 10 μM fueron 53.1% y 64.0%, respectivamente. La pérdida de viabilidad empezando en el día 6 mejoró en una manera dependiente de la concentración en los cultivos tratados con DEX, con un efecto máximo a 10 μM (Figuras 11A y 11B).

Un estudio en el transcurso del tiempo para la adición de DEX se llevó a cabo después en cultivos de matraces de agitación en los que se añadió DEX a una concentración final de DEX de 1 μ M y se añadió entre el día 5 de la inoculación hasta el sexto día después de la inoculación. Como se muestra en las Figuras 11C y 11D, la VCD final y la viabilidad celular se incrementaron en todos los cultivos tratados con DEX y tanto VCD como la viabilidad celular mejoraron en una manera dependiente del tiempo con 10 coordinación de adición de DEX más temprana. La viabilidad de cultivos celulares de CHO no tratados disminuyó al 50% en el día 10, mientras que en los cultivos en los que se añadió DEX en los días 0, 2, 4 y 6 fue el 63, el 68, el 72 y el 74%, respectivamente.

15 **DEX reduce la velocidad de crecimiento específico pero incrementa la productividad específica de células**

La velocidad de crecimiento específica, la productividad volumétrica normalizada y la productividad específica celular normalizada se cuantificaron y compararon 20 entre células tratadas con DEX y no tratadas. Los datos que comparan los perfiles de velocidades de crecimiento celular específicas normalizadas y los perfiles de productividad normalizada con o sin DEX 1 μ M se muestran en la Figura 12A y en la 12B (n = 5). Se añadió DEX en el día 2, dando como 25 resultado aproximadamente una reducción del 30% en

velocidades de crecimiento celular con DEX comparado con control el día después de la adición de DEX. Sin embargo, este efecto de inhibición del crecimiento disminuyó con el tiempo de cultivo. Al final del periodo de cultivo, las
5 velocidades de muerte celular fueron menores en cultivos con células tratadas con DEX. Además, la inhibición del crecimiento celular temprana inducida por DEX no afectó a la productividad volumétrica normalizada (6.5 para todos los cultivos); sin embargo, los cultivos con tratamiento de DEX
10 tuvieron significativamente productividad específica más alta que las células no tratadas, con una productividad específica normalizada máxima de $(7.0 \pm 0.6) \times 10^{-9}$.

La expresión al alza de GILZ se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de western blot

15 Se analizó GILZ usando PCR cuantitativa a tiempo real para validar los perfiles de expresión génica obtenidos por análisis de micromatrices. Se aplicó la cuantificación de PCR cuantitativa en TaqMan® a muestras de ARN del día 5 y del día 8 para cultivos tratados con DEX y no tratados por
20 triplicado. Se establecieron reacciones paralelas en la misma placa en que se analiza β -actina en cada muestra como control endógeno. Tal como se muestra en la Fig. 13A, los cambios en el perfil de expresión normalizado de GILZ obtenidos por PCR cuantitativa en tiempo real en las muestras del día 5 y del
25 día 8 son 7.66 ± 1.08 y 10.48 ± 2.16 , respectivamente.

Se analizaron mediante western blot lisados celulares procedentes de cultivos del día 5 con y sin tratamiento con DEX 1 μ M para analizar si GILZ estaba sobreexpresada en los cultivos tratados con DEX. La transferencia se volvió a investigar también con el anticuerpo beta-actina como un control evaluando la carga de gel equivalente. Como se muestra en la Fig. 13B, la expresión de proteína GILZ aumentó significativamente en las muestras tratadas con DEX, en comparación con las muestras no tratadas. Además, los cambios en el plegamiento de GILZ causados por DEX son ligeramente superiores en las muestras del día 8 que en las muestras del día 5, lo que está de acuerdo con los resultados de la PCR cuantitativa en tiempo real.

Comparación de dexametasona con otros dos glucocorticoides, hidrocortisona y prednisolona

Experimentos en matraces de agitación probaron después si el efecto protector de DEX en viabilidad celular de CHO se limitaba a DEX o si podría extenderse a otros compuestos glucocorticoides, tales como hidrocortisona (HYC) y prednisolona (PRD). DEX, HYC y PRD (Sigma-Aldrich, San Luís, MO) se añadieron dos días después de inoculación a concentraciones finales de 0, 0.1, 1 y 10 μ M para cada uno de estos tres compuestos. VCD pico, VCD final y viabilidad final de células de cultivo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

		Concentra- ción de Tratamiento (µM)	VCD Pico (× 10 ⁶ células/ ml)	VCD Final (× 10 ⁶ células/m l)	Viabili- dad (%)
5	Dexametasona (DEX)	0.1	7,99	7,64	72,3
		1	9,02	8,40	75,8
10		10	7,49	7,38	82,3
	Hidrocortisona (HYC)	0.1	10.06	7,86	60.1
		1	9,51	8,15	65,1
		10	8,44	7,80	75,5
15	Prednisolona (PRD)	0.1	8,99	8,26	69,4
		1	9,25	8,79	76,8
		10	8,05	8,27	77.5
	Control	N/A	8,69	7.56	56,6
20	Similar a DEX, HYC (viabilidad final del 60.1-75,5%) y PRD (viabilidad final del 69.4-75.5%) mostraron también efectos protectores celulares dependientes de dosis. La viabilidad en el día 10 fue del 56.6% para el control comparado con las viabilidades del día 10 con concentraciones				
25	de 0.1 y de 10 µM para DEX del 72.3% y del 82.3%; para HYC				

del 60.1% y del 75.5%; y PRD del 69.4% y del 77.5%,
respectivamente. Así todos los tres compuestos
glucocorticoides mejoraron viabilidad de cultivo con efectos
máximos a 10 μ M para todos los tres compuestos
5 glucocorticoides.

**La acción de supresión de la muerte de dexametasona
implica a GILZ y al receptor de glucocorticoides.**

Con el fin de determinar si la acción mejora de la
viabilidad a partir de la adición de DEX estaba mediada por
10 GILZ y el receptor de glucocorticoides (GR), se añadió el
antagonista de GR mifepristona (RU-486) al medio de cultivo
celular antes del tratamiento con DEX. Para condiciones con y
sin RU-486, el aumento en el porcentaje de la viabilidad
celular final inducida por DEX se muestra en la Fig. 14. La
15 capacidad de DEX para mejorar la viabilidad celular se redujo
sustancialmente en presencia de RU-486 1 μ M. El aumento del
porcentaje de la viabilidad celular inducida por DEX 0.1 y 1
 μ M disminuyó del 30.5% y el 32.6% (sin RU-486) al 4.7% y el
5.7% (con RU-486 1 μ M), respectivamente. En el tiempo medio,
20 el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (Fig. 14B)
muestra que en presencia de RU-486 1 μ M, el efecto de
regulación al alza de DEX sobre la expresión de GILZ se
atenuó significativamente. El cambio de plegamiento inducido
por DEX 0.1 y 1 μ M disminuyó de 9.0 ± 1.9 y 11.3 ± 3.0 (sin
25 RU-486) a 1.8 ± 0.9 y 2.3 ± 1.0 (con RU-486 1 μ M),

respectivamente. El análisis de western blot (Fig. 14C) confirmó adicionalmente que la sobreexpresión de la proteína GILZ disminuyó significativamente en presencia de RU-486 1 μ M. Estos resultados indican que el mecanismo a través del
5 que DEX disminuye la viabilidad implica a GILZ y es dependiente de GR, ya que RU-486 compite con DEX por el dominio de unión a ligando del GR.

Aplicación de dexametasona en 10 l de cultivo de biorreactor semicontinuo

10 Los cultivos semicontinuos en biorreactores de 10 l se llevaron a cabo determinando si el efecto de DEX visto en matraces de agitación subiría para biorreactores. La meta en conjunto de DEX fue suprimir la muerte celular, prolongar la longevidad del cultivo y por consiguiente incrementar la
15 producción de glucoproteína para un proceso en biorreactores. En este estudio, se operaron tres biorreactores usando las mismas condiciones descritas anteriormente; con 1 μ M de DEX añadido a dos biorreactores en el día 2 o en el día 7 respectivamente. Diferentes de los funcionamientos de
20 matraces de agitación, los funcionamientos de los biorreactores se prolongan hasta 14 días, la temperatura del cultivo se cambió a una temperatura más baja durante la fase exponencial del cultivo y se usó un medio nutriente patentado en vez de suministrar sólo glucosa y glutamina.

25 Biorreactores con DEX añadidos bien en el día 2 o

bien en el día 7 alcanzaron densidades celulares máximas de aproximadamente 8.3×10^6 células/ml en el día 8, comparadas con 7.8×10^6 células/ml sin DEX (Fig. 15A). La adición de DEX disminuyó la velocidad de muerte celular en los biorreactores. La viabilidad celular fue viabilidad del 94% para todas las condiciones en el día 6 (Fig. 15B). Por el día 14, la viabilidad en porcentaje disminuyó al 29% sin DEX, comparada con el 55% y el 39% con DEX añadida en los días 2 ó 7, respectivamente. Las VCD finales en el día 14 con DEX añadida en los días 2 ó 7 fueron 4.1 y 3.5×10^6 células/ml respectivamente, comparadas con 2.8×10^6 células/ml sin adición de DEX. Las valoraciones de proteínas normalizadas fueron aproximadamente 5.5 en el día 7 antes de la VCD máxima (Fig. 15C). A partir de entonces, la producción de proteínas durante las fases estacionaria y de muerte de los cultivos fue más alta en los biorreactores con adición de DEX. El día 14 valoraciones normalizadas de recogida fueron 12.5 en ambos biorreactores con DEX, comparados con 10.5 g/l sin adición de DEX, un incremento del 20%.

20 **Conclusión**

Nuestros esfuerzos en la optimización del medio nos han conducido a descubrir inesperadamente que los glucocorticoides pueden atenuar significativamente la disminución de la viabilidad celular en cultivos semicontinuos de células CHO. En el estudio del mecanismo de este fenómeno,

la implicación de la regulación al alza del gen antiapoptótico GILZ se identificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de western blot. Estudiando efectos de análogos y antagonistas de DEX sobre el crecimiento de células CHO, se
5 determinó el papel de GILZ y del receptor de glucocorticoides en la mediación de la actividad de DEX. Los experimentos en biorreactor semicontinuo demostraron que el análogo de glucocorticoide era un compuesto químico eficaz, accesible y rentable para atenuar la disminución de la viabilidad en
10 cultivos celulares.

Ejemplo 4

En este estudio, se estudiaron los efectos de dexametasona (DEX) sobre el crecimiento de células CHO, la sialilación de proteínas y la agregación en otra línea
15 celular CHO con la secreción de una glucoproteína diferente (CTLA4Ig).

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó originariamente a partir de células parentales DG44
20 y se cultivó en un medio de crecimiento definido químicamente registrado.

Experimentos en matraz con agitación

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con agitación (VWR international) con volúmenes
25 iniciales de 100 ml y densidades celulares iniciales de $6 \times$

10⁵ células/ml. Los cultivos se situaron sobre una plataforma de agitación (VWR international) a 150 rpm y se mantuvieron a 37°C y al 6% de CO₂ durante diez días. Se tomaron muestras de los cultivos diariamente y se ajustó el pH según se necesitara usando carbonato de sodio 1 M y se alimento con glucosa y glutamina cada dos días, con el fin de mantenerlos a niveles adecuados. Se añadió el glucocorticoide dexametasona (DEX) a concentraciones finales 0.001 - 10 µM el día 2. Se midieron fuera de línea la densidad y la viabilidad celular usando un contador de células automatizado (Innovatis AG, Bielefeld, Alemania). El pH del cultivo y las concentraciones de glucosa y glutamina se midieron fuera de línea usando un analizador Bioprofile Analyzer 400 (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, EEUU). Los sobrenadantes procedentes de las recolecciones del cultivo se recogieron para el análisis del contenido de ácido siálico y niveles de especies de alto peso molecular.

Ensayo del contenido de ácido siálico y HMW

El ensayo del contenido de ácido siálico y HMW se realizó tal como se ha descrito en los ejemplos previos.

Resultados

Efecto de la dexametasona sobre el crecimiento de células CHO

El glucocorticoide dexametasona (DEX) se añadió a los cultivos del matraz de agitación a concentraciones

5 finales entre 0.001 y 10 μM dos días después de la
inoculación para evaluar los efectos de la DEX sobre la
viabilidad de células CHO y el potencial para prolongar el
periodo de cultivo celular. El perfil de densidad celular
10 viable (VCD, por sus siglas en inglés) en el estudio de
dosis-respuesta (Fig. 16A) muestra un aumento en la
inhibición del crecimiento celular que tiene lugar después
del tratamiento con DEX, aunque la dependencia de la
concentración no es obvia en el intervalo del estudio. El
15 pico de VCD alcanzó 13.9×10^6 células/ml en el cultivo
control no tratado, mientras que el pico de VCD osciló entre
 10.6×10^6 y 12.7×10^6 células/ml en los cultivos tratados
con DEX 0.001 a 10 μM . La viabilidad celular para los
cultivos no tratados disminuyó rápidamente después del día 6
15 (Fig. 16B) y el porcentaje de viabilidad el día 10 fue de
sólo el 64.5%. Por contra, las viabilidades celulares finales
con DEX 0.001 μM y 10 μM fueron del 75.5% y el 82.3%,
respectivamente.

**La dexametasona (DEX) aumenta la sialilación y
20 reduce el nivel de especies de alto peso molecular (HMW) de
glucoproteína CTLA4Ig**

Además del crecimiento celular, también se
evaluaron los efectos de la DEX sobre el contenido de ácido
siálico y los niveles de especies de alto peso molecular.
25 Comparando los cultivos no tratados, el porcentaje de

aumento del contenido en ácido siálico (Fig. 17A) y el porcentaje de reducción de especies de alto peso molecular (Fig. 17B) inducidos por varias concentraciones de DEX se muestran en la Fig. 17. Es obvio que la DEX es capaz de
5 aumentar la sialilación y reducir las especies de alto peso molecular de glucoproteína, mostrando una mejora en la calidad de las proteínas, incluso a concentraciones 0.001 μ M. La dependencia de la concentración de DEX sobre el contenido de ácido siálico y las especies de alto peso
10 molecular no es tan obvio cuando la concentración de DEX es superior a 0.01 μ M.

Estos resultados demostraron que las acciones de DEX sobre la mejora de la viabilidad celular, la mejora de la sialilación de glucoproteínas y la reducción de la agregación
15 no están limitadas a una línea celular única ni a un medio de formulación único.

Ejemplo 5

En este estudio, se demuestra la factibilidad de utilizar DEX en el medio de cultivo celular para la
20 producción de glucoproteína recombinante a gran escala en biorreactores a escala de 500 l y 5000 l.

Línea celular y medio

La línea celular CHO usada en este estudio se subclonó a partir de células parentales y se cultivó en un
25 medio de crecimiento patentado.

Operación en biorreactor

Los experimentos en biorreactor se realizaron en biorreactores de 7 l, 500 l y 5,000 l con volúmenes de trabajo iniciales de aproximadamente 3 l, 300 l y 3,000 l, respectivamente. Todos los biorreactores iniciaron el funcionamiento a 37°C y se llevaron a temperaturas inferiores cuando las células entraron en la fase de producción, con el fin de prolongar el periodo de cultivo celular. El pH y el oxígeno disuelto se mantuvieron a 7.05 y al 50% de saturación del aire. Las velocidades de agitación para las escalas de 7 l, 500 l y 5,000 son 180, 75 y 60 rpm respectivamente. Todos los experimentos en biorreactor se llevaron a cabo en modo semicontinuo con alimentación diaria de medio exento de proteína, con el fin de mantener la glucosa y otros nutrientes a determinados niveles. Se incluyó la mexametasona en el medio nutriente en todas las escalas de producción con el propósito de aumentar la viabilidad celular y la sialilación de la proteína. Las muestras se tomaron durante el método de cultivo celular y se analizaron la densidad celular, la viabilidad celular, sustratos y metabolitos.

El ensayo de valoración, contenido de ácido siálico y de HMW se realizó tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Resultados

Las figuras 18A y 18B presentan el rendimiento del

biorreactor con respecto al crecimiento y a la viabilidad celular. Se vigiló el crecimiento celular a escala creciente de 7 l a 5,000 l para tener máximos similares de densidades celulares viables de entre 12 y 13 x 10⁶ células/ml con barras de error que representan la desviación típica de las ejecuciones a una escala particular que se sobrepone en cada punto temporal. Las densidades celulares alcanzaron el máximo el día 7 a la escala de 5,000 l y el día 8 para las escalas de 7 l y 500 l. El día 14 las viabilidades medias de los cultivos fueron el 88%, el 84% y el 91% a escalas del biorreactor de 7 l, 500 l y 5,000 l, respectivamente. Las figuras 18C y 18D presentan los perfiles de productividad y de ácido siálico a partir de escalas del biorreactor de 7 l, 500 l y 5,000 l. Las valoraciones del día 14 (indicadas como valores normalizados) fueron 13.2, 11.6 y 13.6 a escalas de 7, 500 y 5,000 l, respectivamente. Los niveles máximos de ácido siálico (indicados como valores normalizados) fueron 16.0, 18.0 y 19.0 a escalas aumentadas. El ácido siálico cayó en aproximadamente 2,6 unidades hacia el final del proceso en todas las escalas.

20 **Conclusión**

En conjunto, con la dexametasona incluida en el medio nutriente, el método se realizó bien en todas las escalas, lo que indica la viabilidad del uso de dexametasona como aditivo del medio para la producción a escala industrial.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de cultivo celular, caracterizado porque es para la producción de glucoproteínas, que comprende:

- 5 a) cultivar células huésped que producen una glucoproteína en cultivo celular en condiciones que permiten la producción de proteína; y b) añadir niveles no tóxicos de glucocorticoide.

2. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se aumenta la
10 sialilación de la glucoproteína en comparación con la sialilación en un cultivo sin adición de glucocorticoide.

3. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se suprime la apoptosis celular en comparación con la apoptosis celular en
15 un cultivo sin adición de glucocorticoide.

4. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se aumenta la viabilidad celular en comparación con la viabilidad celular en un cultivo sin adición de glucocorticoide.

20 5. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se aumenta la titulación de glucoproteína en comparación con un cultivo sin adición de glucocorticoide.

6. El proceso de cultivo celular de conformidad con
25 la reivindicación 1, caracterizado porque se disminuye la

agregación de glucoproteínas en comparación con un cultivo sin adición de glucocorticoide.

7. El proceso de cultivo celular de conformidad con las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el
5 glucocorticoide se selecciona de entre el grupo constituido por dexametasona, betametasona, acetato de fludrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

8. El proceso de cultivo celular de conformidad con
10 las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque las células huésped son células de mamífero.

9. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque las células de mamífero se seleccionan de entre el grupo constituido por CHO,
15 mieloma y células COS.

10. El proceso de cultivo celular 1-6, caracterizado porque el nivel de glucocorticoide se mantiene en el cultivo celular a una concentración de 1 nM a 1 mM.

11. El proceso de cultivo celular de conformidad con
20 las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el glucocorticoide se añade a los medios basales, a los medios nutrientes o como un bolo en cualquier momento durante el método de cultivo.

12. El proceso de conformidad con las
25 reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el glucocorticoide

se añade en un momento posterior a la inoculación que es anterior al comienzo de la fase de muerte inicial.

13. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el glucocorticoide se añade en un
5 momento posterior a la inoculación que se encuentra durante la fase de crecimiento inicial.

14. El proceso de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el glucocorticoide se añade en o aproximadamente al final de la fase de crecimiento inicial.

10 15. Un proceso de cultivo celular para la producción de una molécula CTLA4 soluble, caracterizado porque comprende:
a) cultivar células CHO que producen una molécula CTLA4 soluble en cultivo celular en condiciones que permiten la producción de proteína; y b) alimentar las células con medio
15 nutriente que contiene dexametasona.

16. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la sialilación de la molécula CTLA4 se aumenta en comparación con la sialilación en un cultivo sin alimentar las células con medio nutriente
20 que contiene dexametasona.

17. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula CTLA4 soluble es una molécula mutante de CTLA4 soluble que comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la
25 posición +1 o alanina en la posición -1 y termina con ácido

aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID N°: 3 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende dominios bisagra, CH2 y CH3, en el que la dexametasona se conserva o se mantiene en el cultivo celular a una
5 concentración de 0.1 μ M a 10 μ M y en el que el volumen del cultivo celular es al menos de 500 litros.

18. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula CTLA4 soluble es una molécula mutante de CTLA4 soluble que comprende
10 la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID N°: 3 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende dominios bisagra, CH2 y CH3, en el que las células se
15 alimentan con un medio nutriente que contiene dexametasona y en el que el volumen de cultivo celular es al menos de 500 litros.

19. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula CTLA4 soluble comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con
20 metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID N°: 1 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende dominios bisagra, CH2 y CH3, en el que la
25 dexametasona se conserva o se mantiene en el cultivo celular a

una concentración de 1 nM a 0.1 μ M y en el que el volumen del cultivo celular es al menos de 500 litros.

20. El proceso de cultivo celular de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la molécula CTLA4 soluble comprende la secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y termina con ácido aspártico en la posición 124 tal como se muestra en la SEQ ID N°: 1 unida a un resto de inmunoglobulina que comprende dominios bisagra, CH2 y CH3, en el que las células se alimentan con un medio nutriente que contiene dexametasona y en el que el volumen de cultivo celular es al menos de 500 litros.

21. El proceso de cultivo celular de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15, 19 y 20, caracterizado porque la molécula CTLA4 soluble comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y termina con lisina en la posición +357 tal como se muestra en la SEQ ID N°: 1.

22. El proceso de cultivo celular de conformidad con cualquiera de conformidad con las reivindicaciones 17 y 18, caracterizado porque la molécula mutante de CTLA4 soluble comprende una secuencia de aminoácidos que comienza con metionina en la posición +1 o alanina en la posición -1 y termina con lisina en la posición +357 tal como se muestra en la SEQ ID N°: 3.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe métodos y procesos para la producción de proteínas, en particular de glucoproteínas, mediante el cultivo de células animales o de mamífero, preferentemente, pero no limitados a, cultivos celulares semicontínuos. En un aspecto, los métodos comprenden la adición de compuesto glucocorticoide durante el periodo de cultivo. La adición de compuesto glucocorticoide mantiene una viabilidad alta de los cultivos celulares y puede proporcionar un aumento en la titulación final de producto proteico y una calidad alta de producto proteico, tal como se determina, por ejemplo, por medio del contenido de ácido siálico en la proteína producida.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Jing Ying

<120> METODOS DE PRODUCCION DE GLUCOPROTEINAS EN CULTIVOS DE CELULAS DE
MAMIFEROS USANDO GLUCOCORTICOIDES

<130> 11400 WO PCT

5

<150> 61/278,343
>151> 2009/10/06

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1152
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)

<400> 1
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
e 20 25 30

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag 144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

20

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg 240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc 288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac 336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

25

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac 384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

2

	tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa	432
	Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu	
	130 135 140	
	ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac	480
	Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His	
	145 150 155 160	
5	aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggt gga tcg tca gtc	528
	Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val	
	165 170 175	
	ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc	576
	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	
	180 185 190	
	cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag	624
	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	
	195 200 205	
10	gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag	672
	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
	210 215 220	
	aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc	720
	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	
	225 230 235 240	
	gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag	768
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	
	245 250 255	
15	tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc	816
	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	
	260 265 270	
	tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc	864
	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	
	275 280 285	
	cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg	912
	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
	290 295 300	
20	gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat	960
	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	
	305 310 315 320	
	ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc	1008
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	
	325 330 335	
	gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg	1056
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
	340 345 350	
25	tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg	1104
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	
	355 360 365	

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370375380

<210> 2
<211> 383
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5<400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
151015

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
202530

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
354045

10Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
505560

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65707580

15Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
859095

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100105110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115120125

20Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130135140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145150155160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165170175

25Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180185190

5

10

15

20

25

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 3
<211> 1152
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1149)
<400> 3

5	atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala 1 5 10 15	48
	ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro 20 25 30	96
	gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu 35 40 45	144
	tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg 50 55 60	192
	cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met 65 70 75 80	240
10	ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser 85 90 95	288
	agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp 100 105 110	336
	acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr 115 120 125	384
15	tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu 130 135 140	432
	ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His 145 150 155 160	480
	aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val 165 170 175	528
20	ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr 180 185 190	576
	cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu 195 200 205	624
	gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys 210 215 220	672
25	aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser 225 230 235 240	720

5	gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag	768
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	
	245 250 255	
	tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc	816
	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	
10	260 265 270	
	tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc	864
	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	
	275 280 285	
	cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg	912
15	Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
	290 295 300	
	gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat	960
	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	
	305 310 315 320	
20	ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc	1008
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	
	325 330 335	
	gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg	1056
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
25	340 345 350	
	tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg	1104
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	
	355 360 365	
	cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	1152
30	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	370 375 380	
	<210> 4	
	<211> 383	
	<212> PRT	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
	Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala	
	1 5 10 15	
	Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro	
40	20 25 30	
	Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu	
	35 40 45	
	Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg	
	50 55 60	

5

10

15

20

25

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

5

10

15

20

25

Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
305					310					315					320	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				325					330					335		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			340					345					350			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
		355					360					365				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
	370					375					380					
<210>	5															
<211>	636															
<212>	ADN															
<213>	Homo sapiens															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(1)..(636)															
<400>	5															
atg	ggt	gta	ctg	ctc	aca	cag	agg	acg	ctg	ctc	agt	ctg	gtc	ctt	gca	48
Met	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	
1				5					10					15		
ctc	ctg	ttt	cca	agc	atg	gcg	agc	atg	gca	atg	cac	gtg	gcc	cag	cct	96
Leu	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Met	Ala	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	
			20					25					30			
gct	gtg	gta	ctg	gcc	agc	agc	cga	ggc	atc	gcc	agc	ttt	gtg	tgt	gag	144
Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	
		35					40					45				
tat	gca	tct	cca	ggc	aaa	gcc	act	gag	gtc	cgg	gtg	aca	gtg	ctt	cgg	192
Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	
	50					55					60					
cag	gct	gac	agc	cag	gtg	act	gaa	gtc	tgt	gcg	gca	acc	tac	atg	atg	240
Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	
65					70					75				80		
ggg	aat	gag	ttg	acc	ttc	cta	gat	gat	tcc	atc	tgc	acg	ggc	acc	tcc	288
Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	
				85					90					95		
agt	gga	aat	caa	gtg	aac	ctc	act	atc	caa	gga	ctg	agg	gcc	atg	gac	336
Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	
			100					105					110			

	acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac	384
	Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr	
	115 120 125	
	tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa	432
	Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu	
	130 135 140	
5	ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt	480
	Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser	
	145 150 155 160	
	tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc	528
	Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser	
	165 170 175	
	aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa	576
	Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys	
	180 185 190	
10	atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt	624
	Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe	
	195 200 205	
	att ccc atc aat	636
	Ile Pro Ile Asn	
	210	
	<210> 6	
	<211> 212	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 6	
	Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala	
	1 5 10 15	
	Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro	
	20 25 30	
20	Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu	
	35 40 45	
	Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg	
	50 55 60	
	Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met	
	65 70 75 80	
25	Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser	
	85 90 95	

10

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

5

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
145 150 155 160

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
165 170 175

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
180 185 190

10

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
195 200 205

Ile Pro Ile Asn
210

15

20

25

Fig. 1A

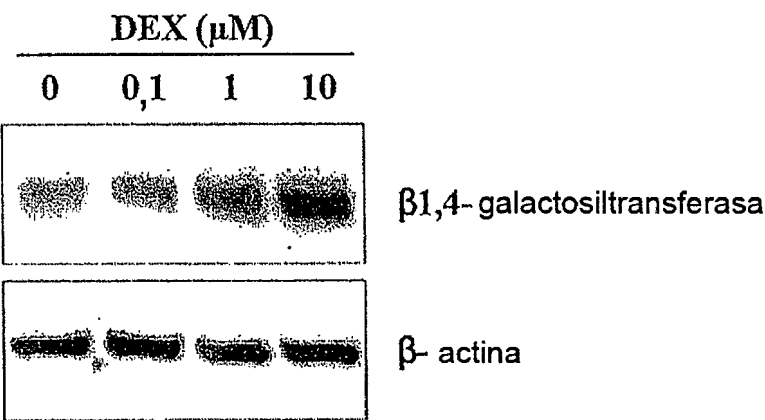


Fig. 1B

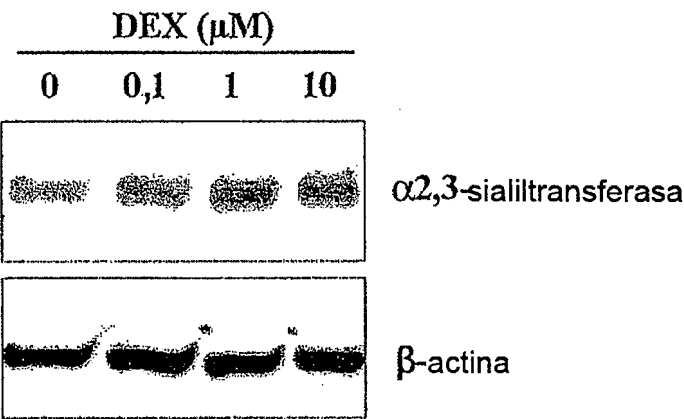


Fig. 2A

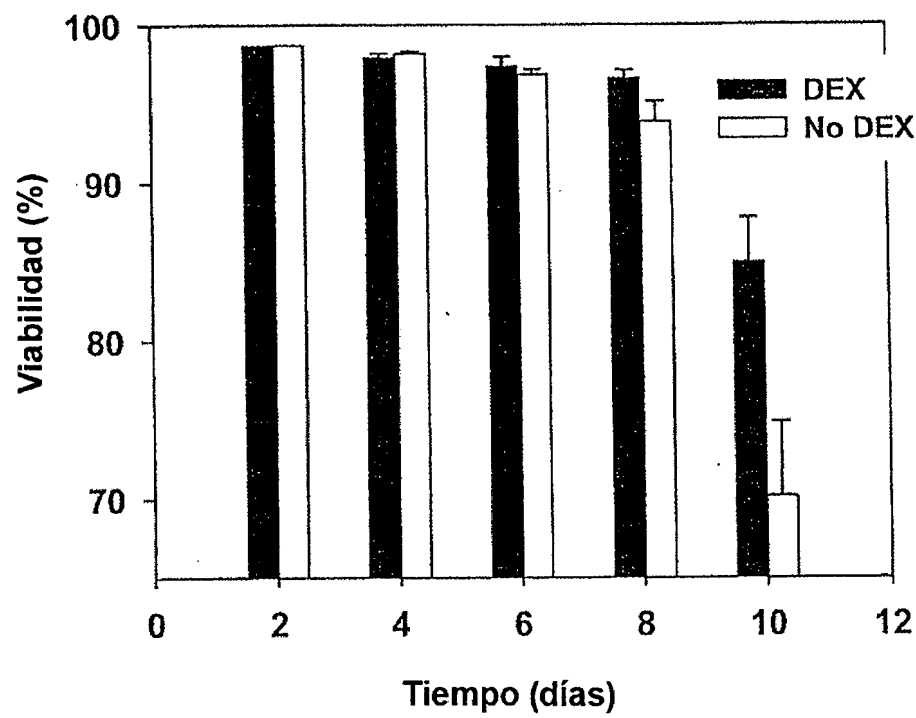


Fig. 2B

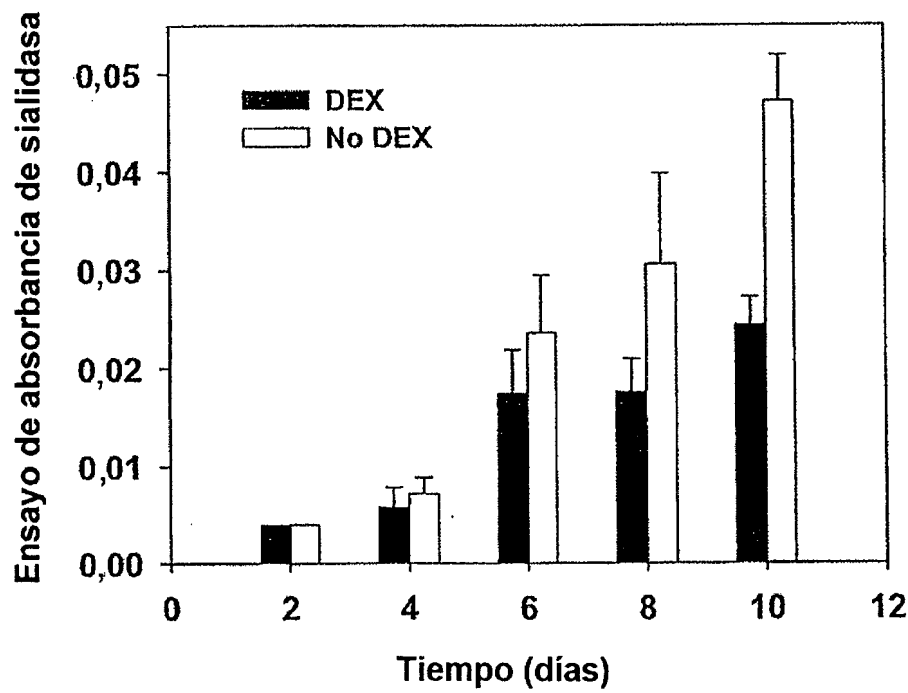


Fig. 3A

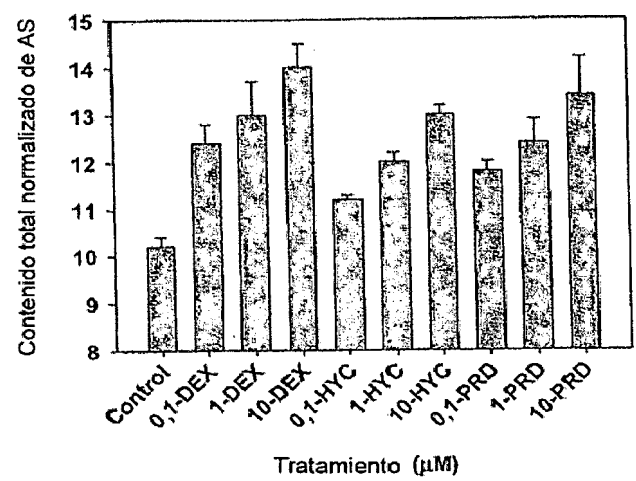
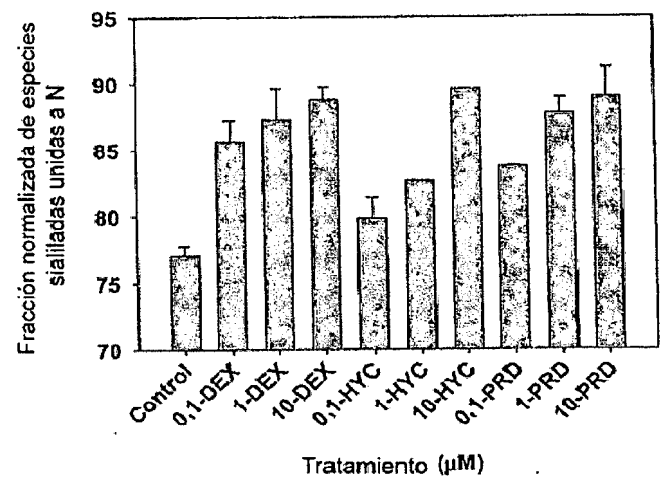
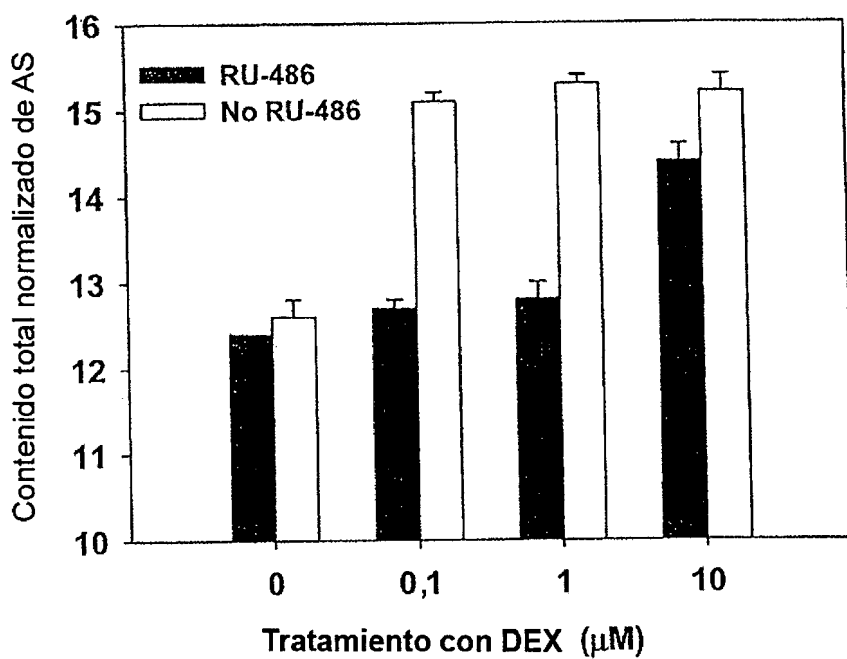
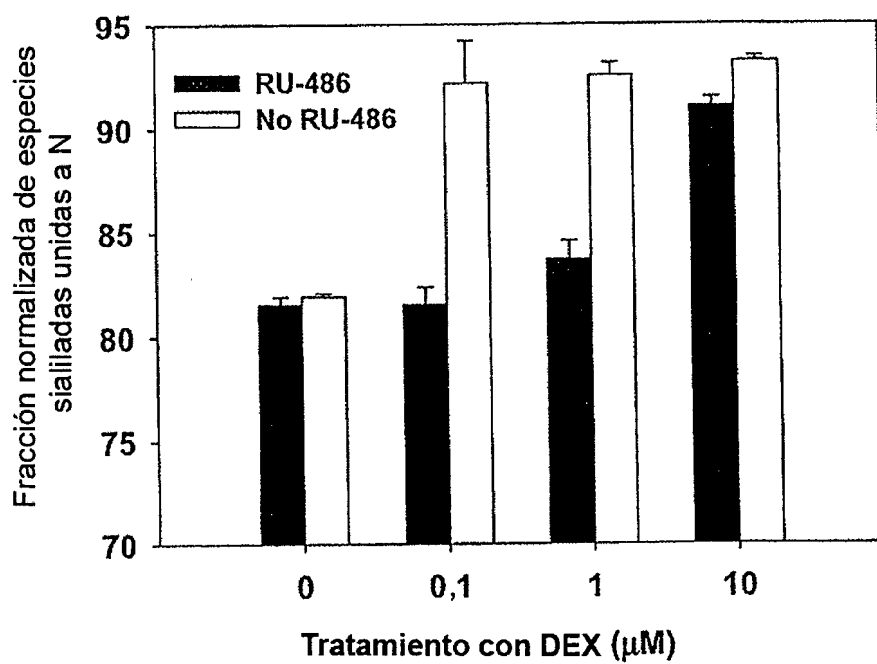


Fig. 3B



4/22

Fig. 4A**Fig. 4B**

5/22

Fig. 5A

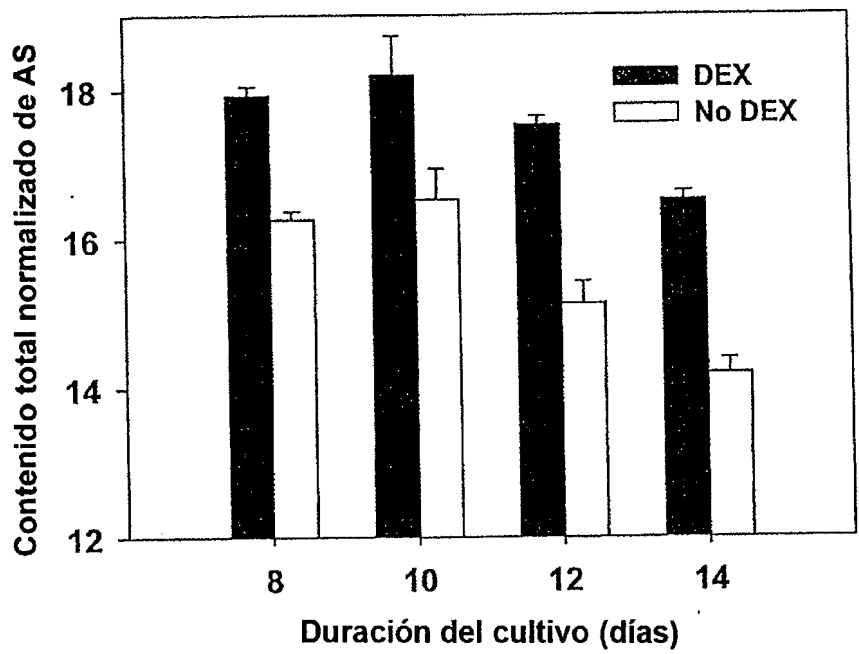


Fig. 5B

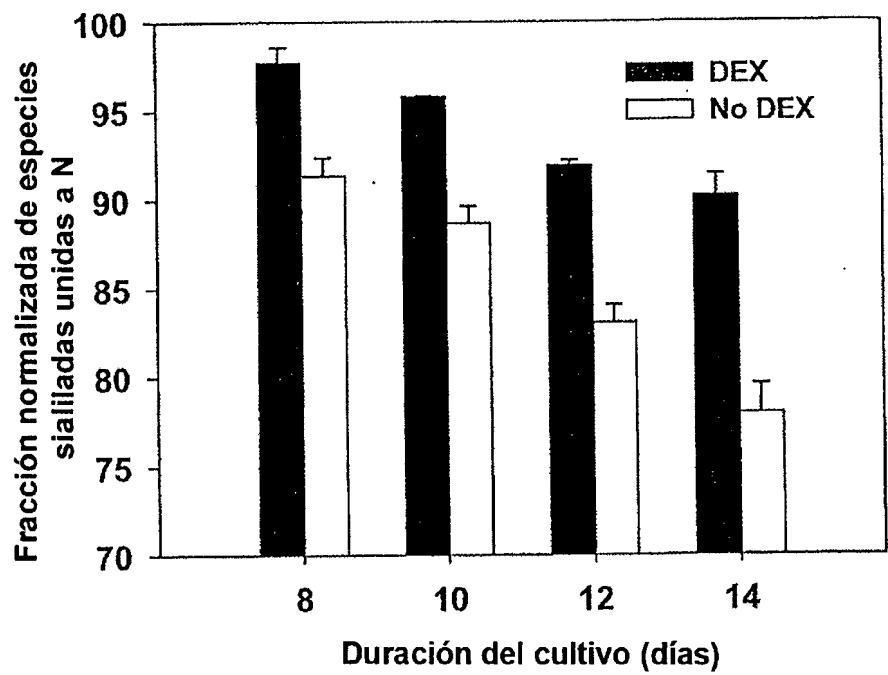
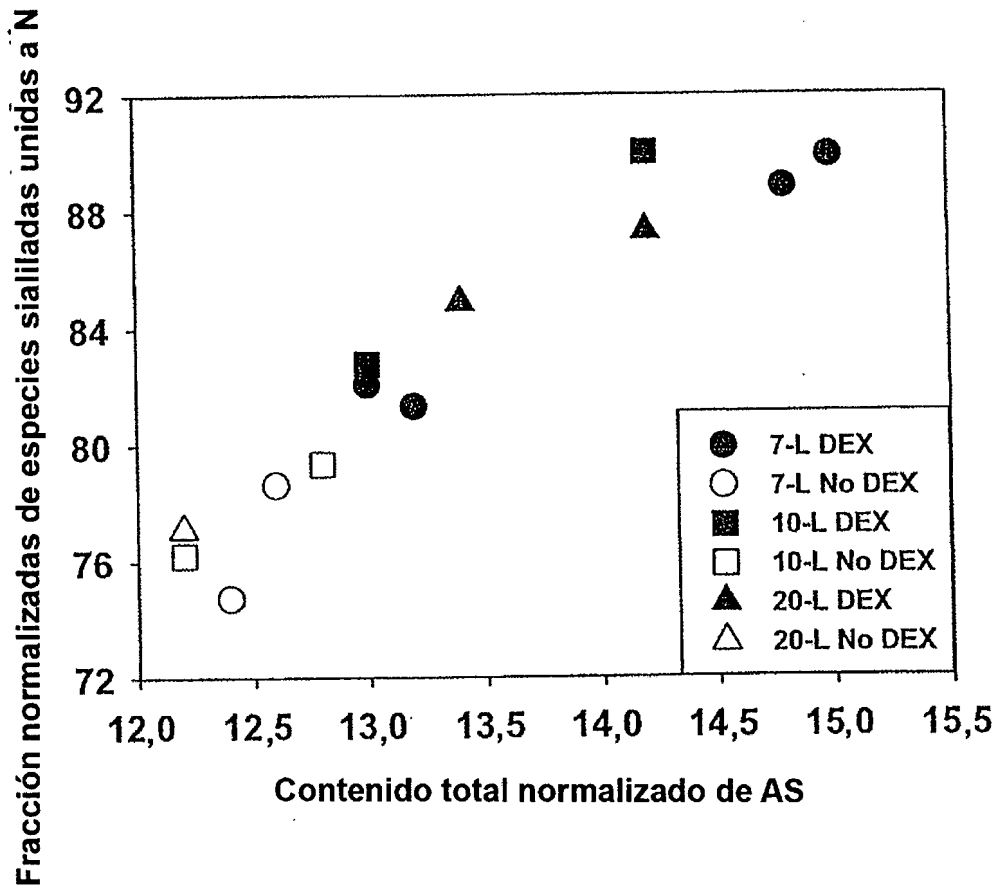


Fig. 6



7/22

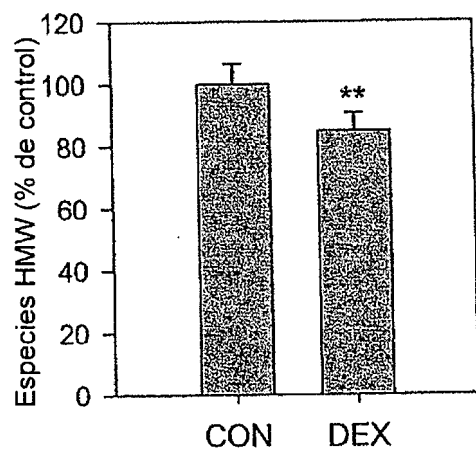
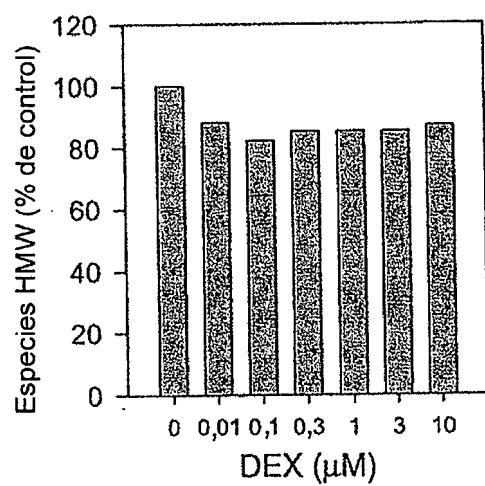
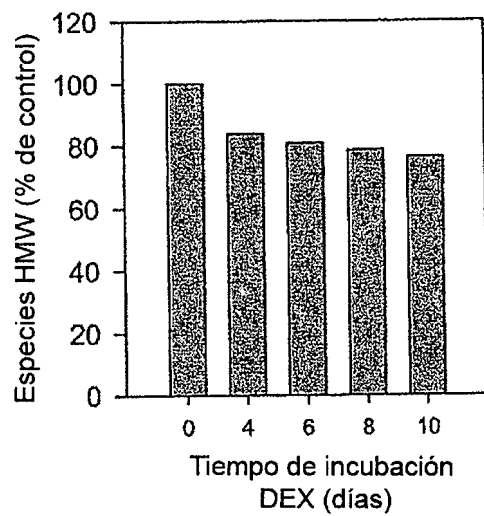
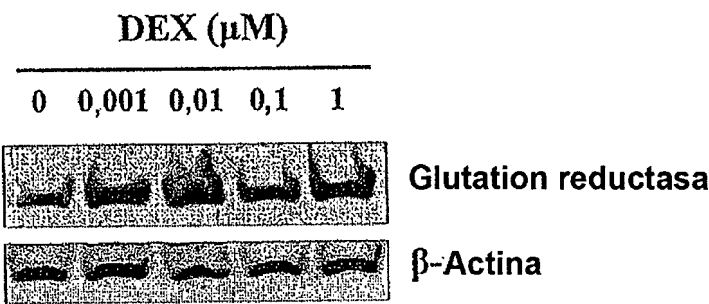
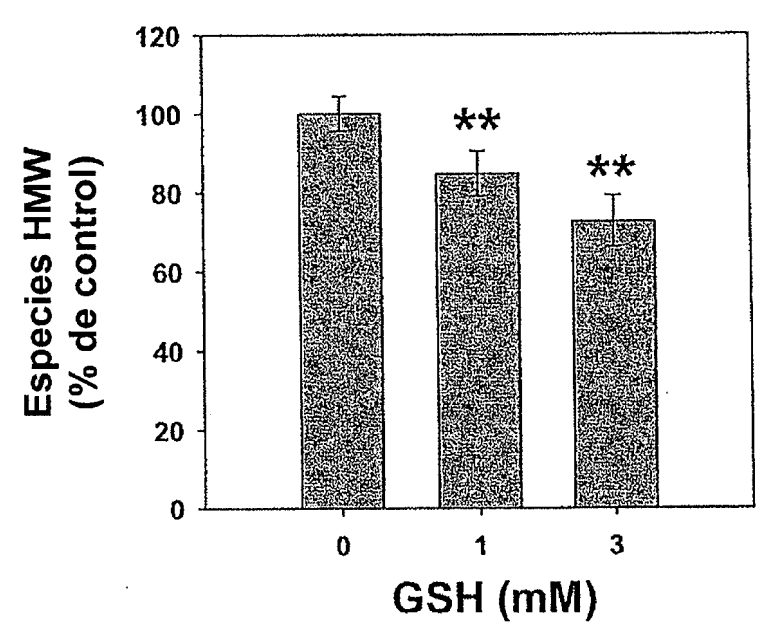
Fig. 7A**Fig. 7B****Fig. 7C**

Fig. 8

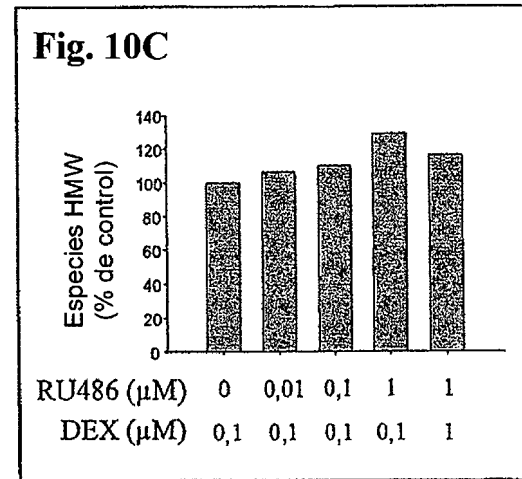
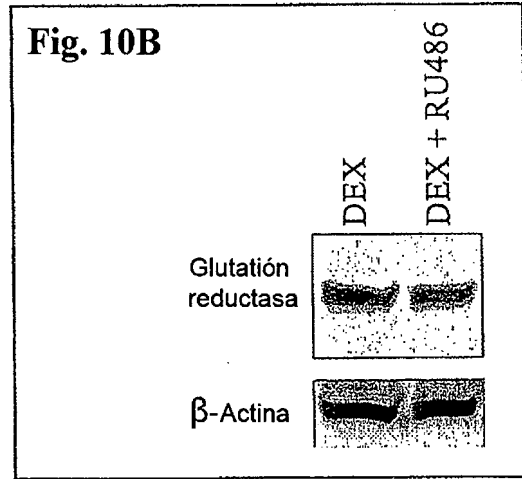
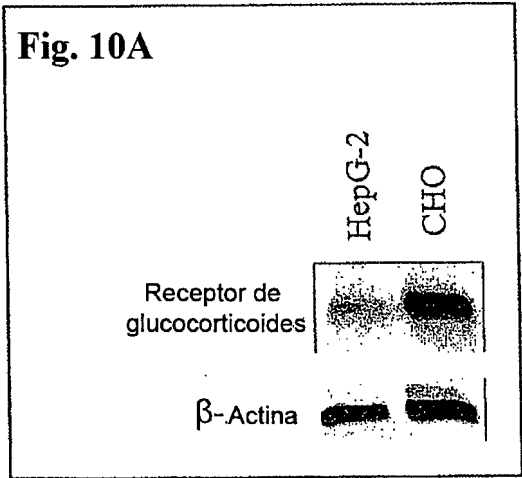


9/22

Fig. 9



10/22



11/22

Fig. 11A

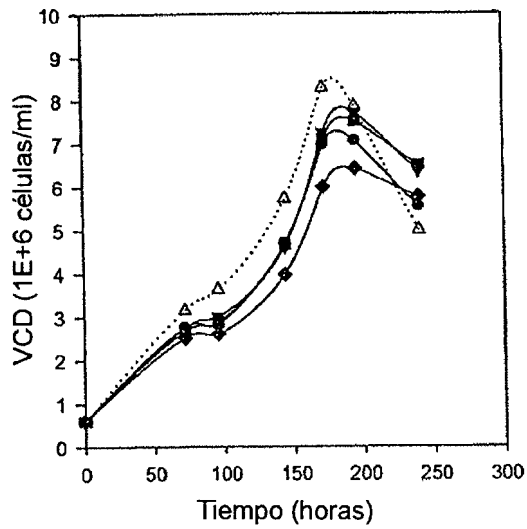


Fig. 11C

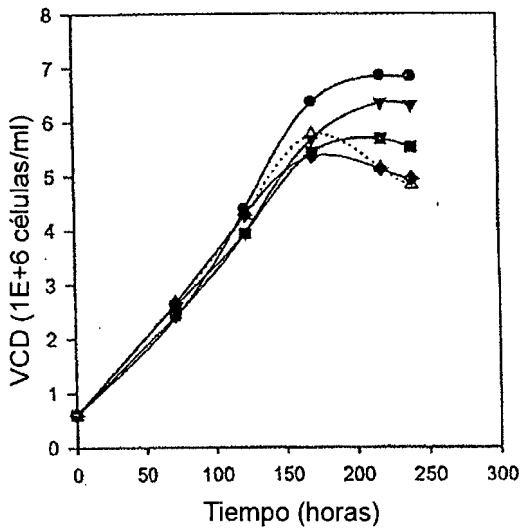


Fig. 11B

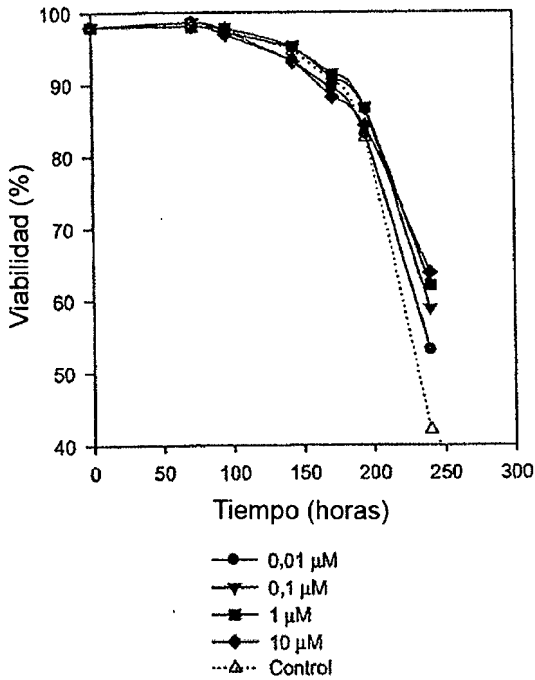
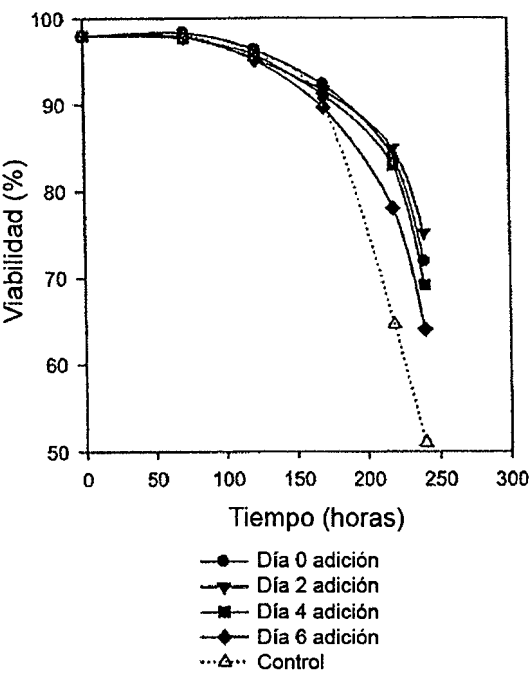


Fig. 11D



12/22

Fig. 12A

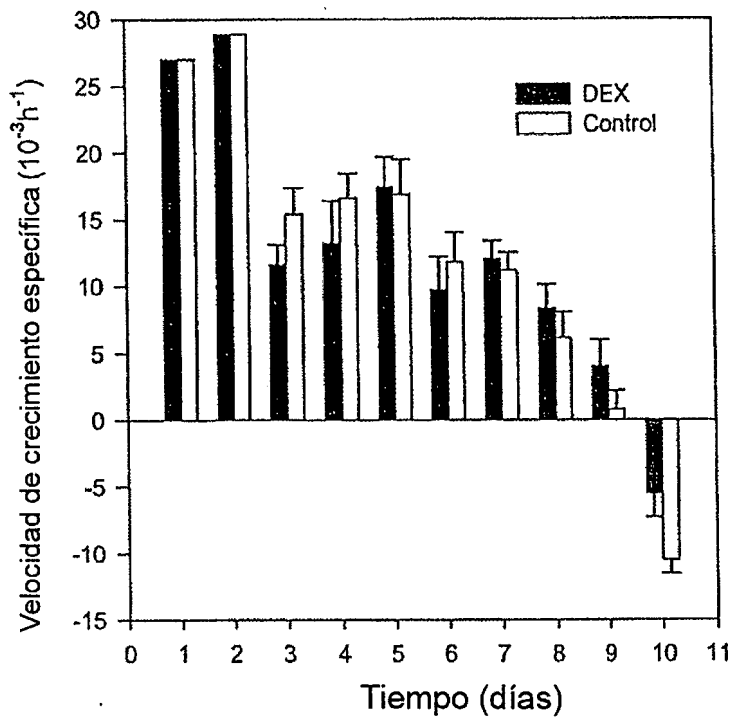


Fig. 12B

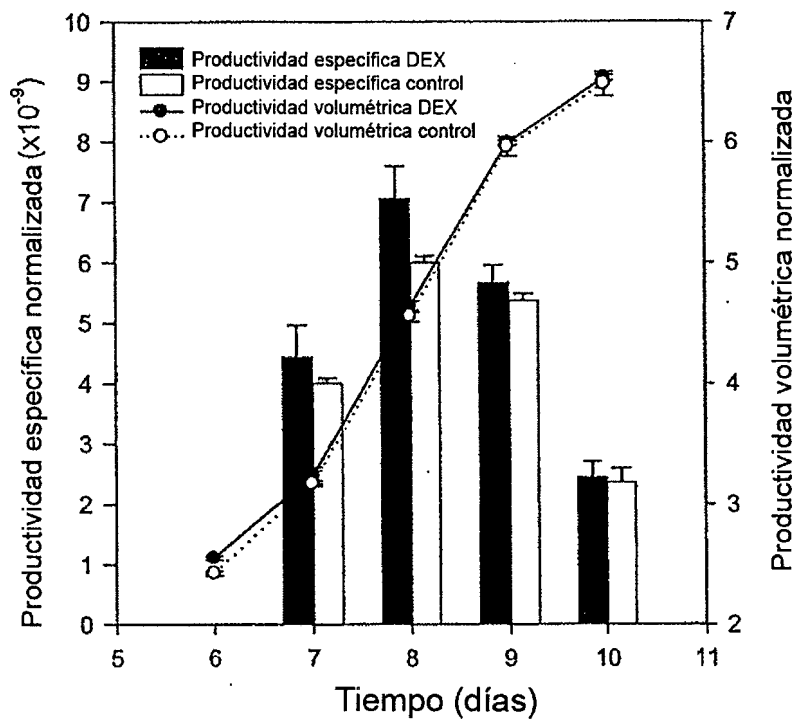


Fig. 13A

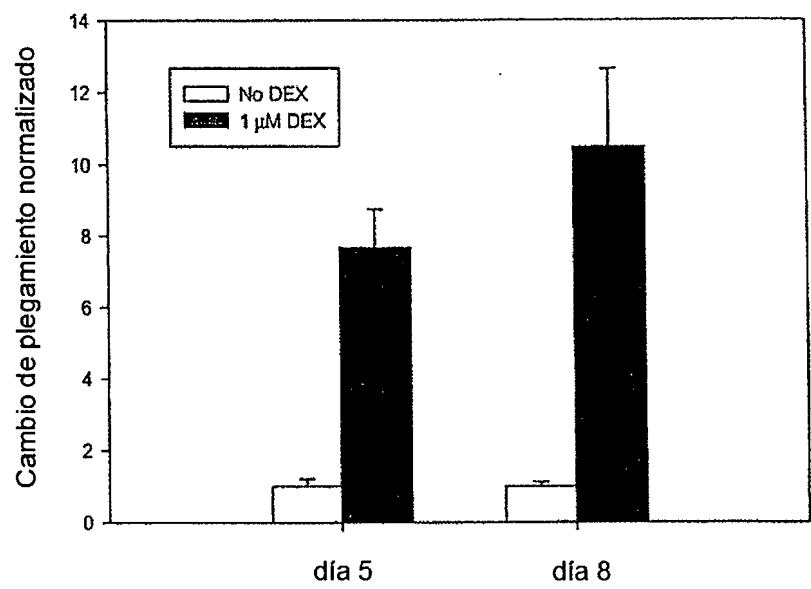


Fig. 13B

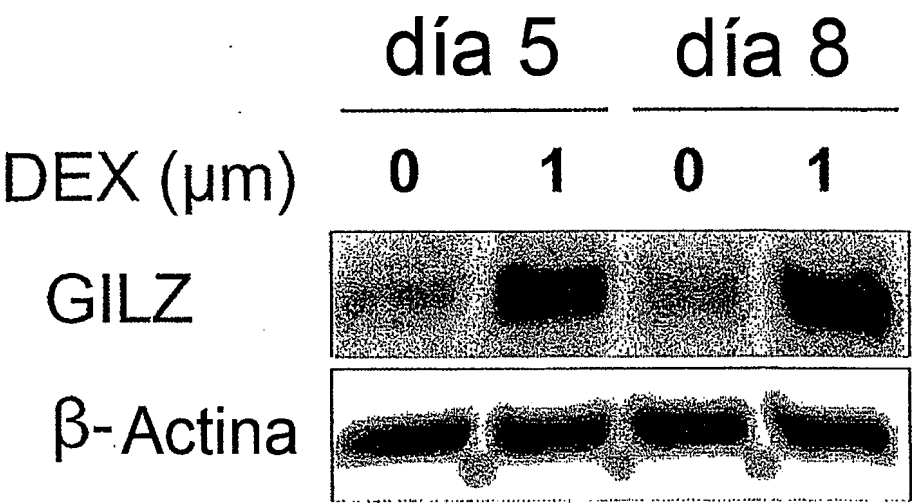


Fig. 14a

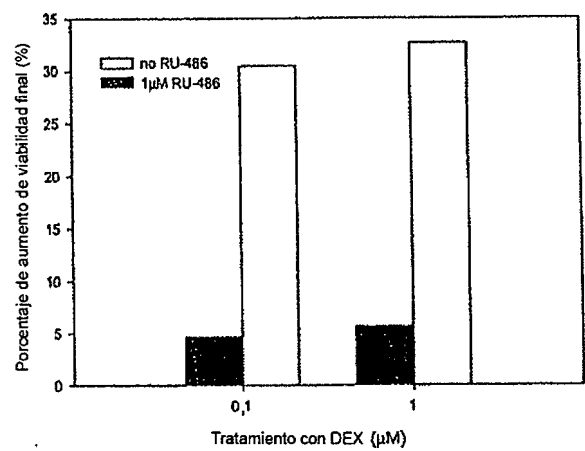
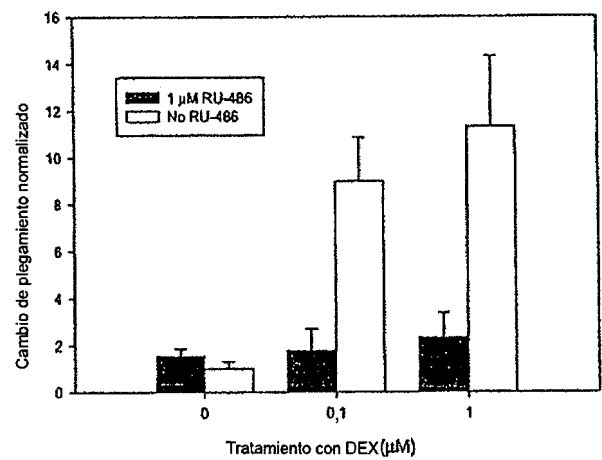


Fig. 14b



RU-486 (μM)	0	0	0	1	1	1
DEX (μM)	0	0,1	1	0	0,1	1

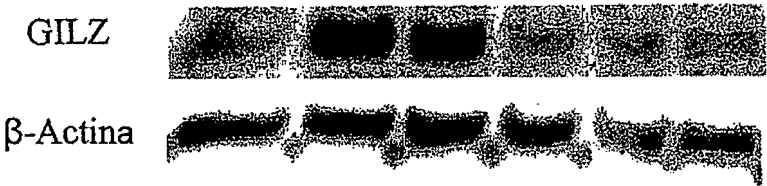


Fig. 14c

15/22

Fig. 15A

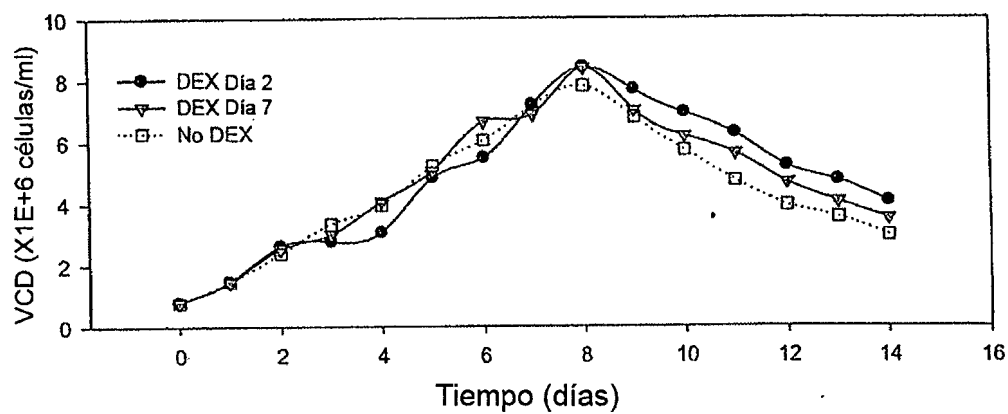


Fig. 15B

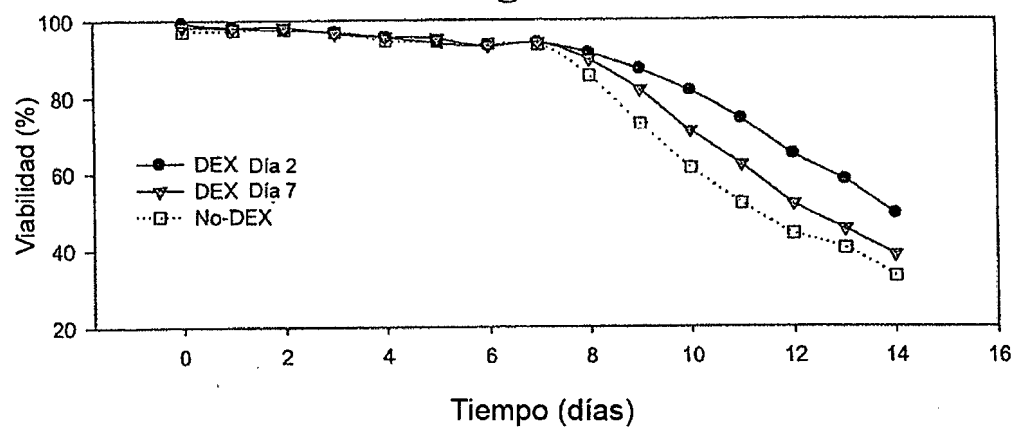


Fig. 15C

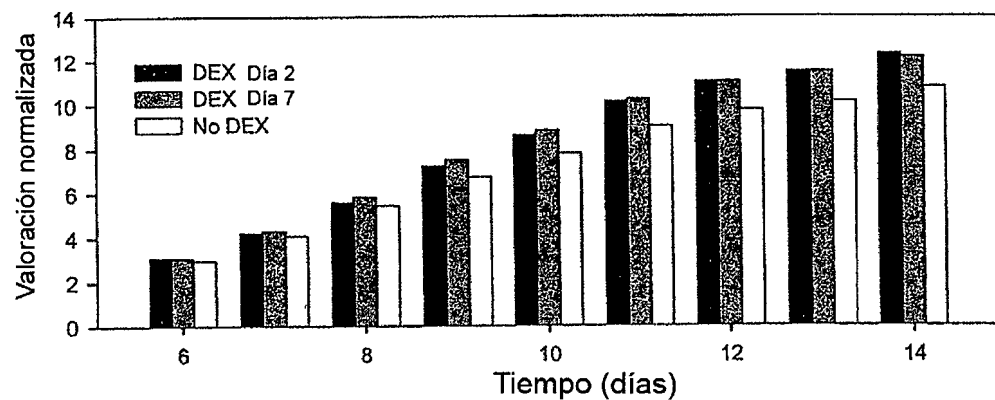


Fig. 16A

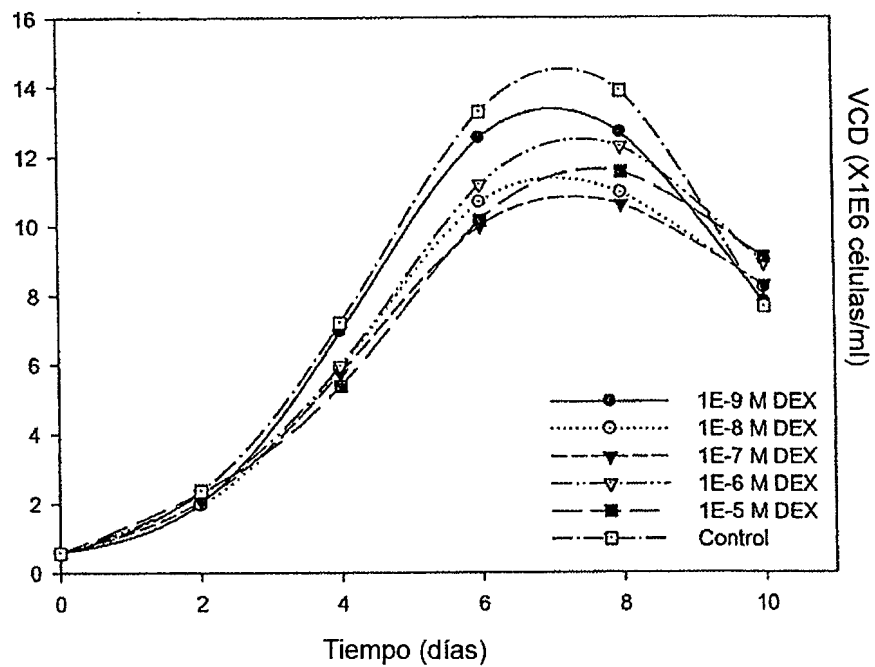


Fig. 16B

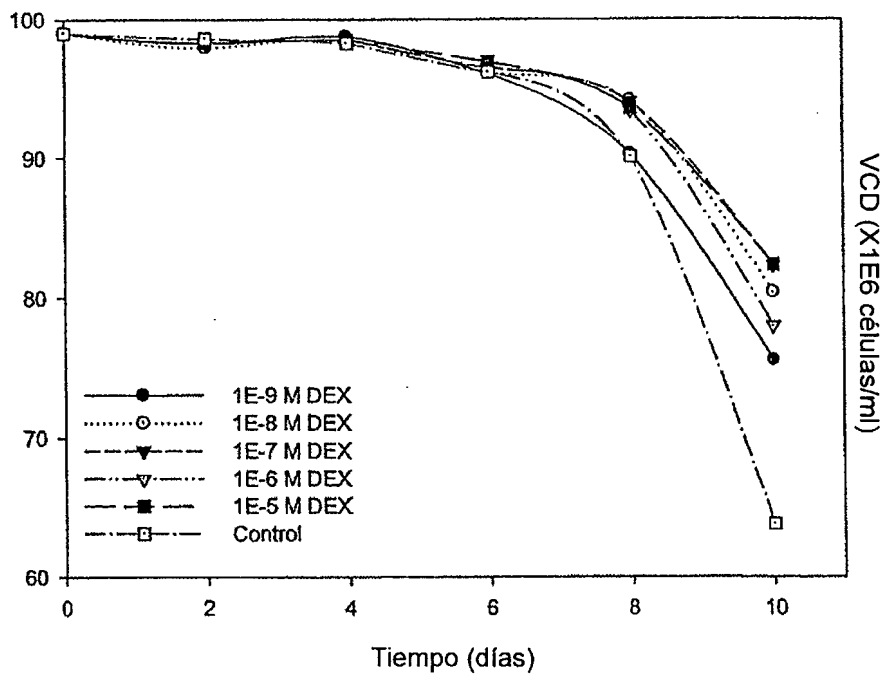


Fig. 17A

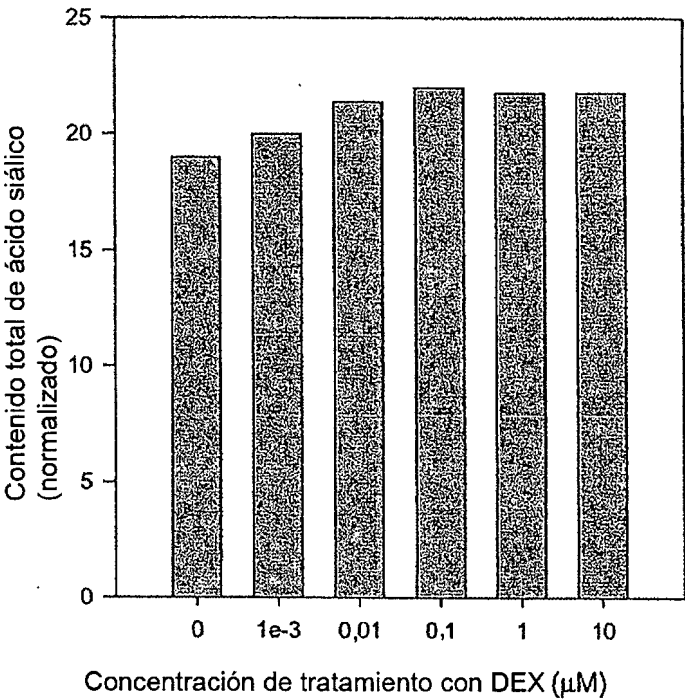
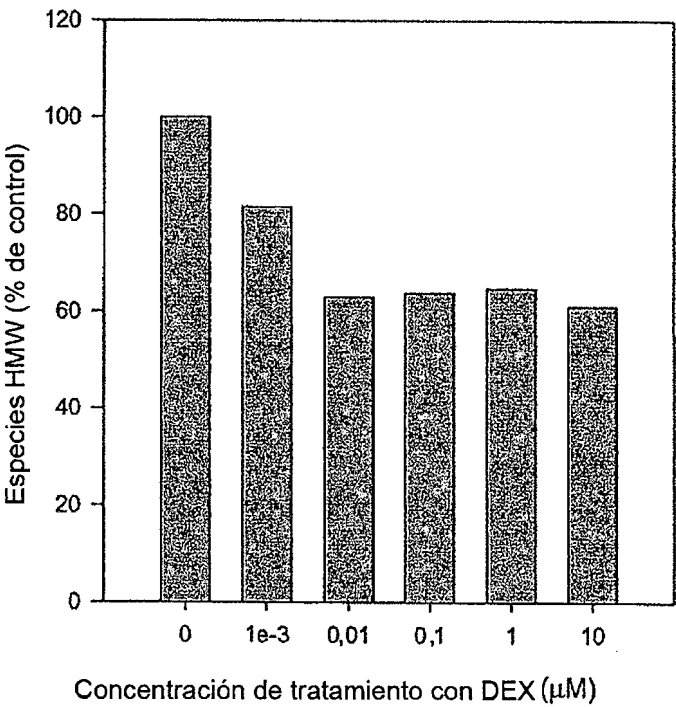


Fig. 17B



18/22

Fig. 18A

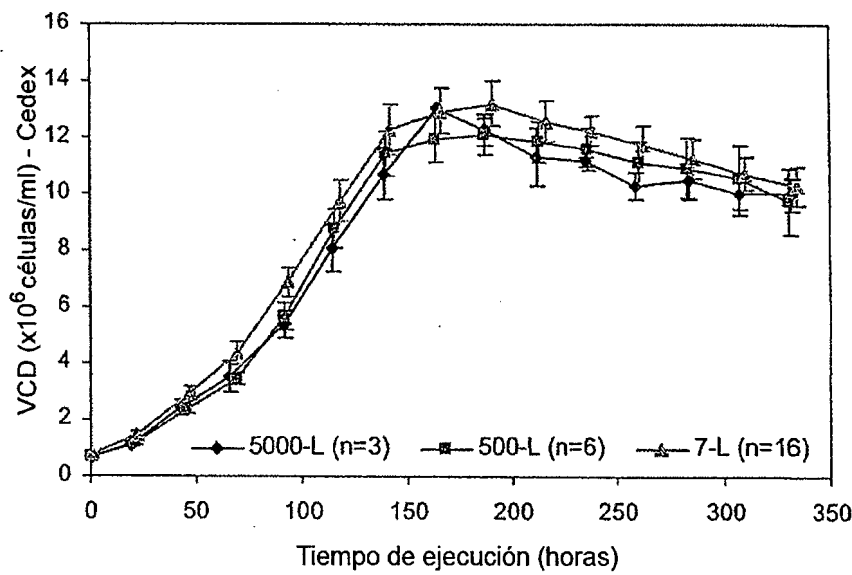


Fig. 18B

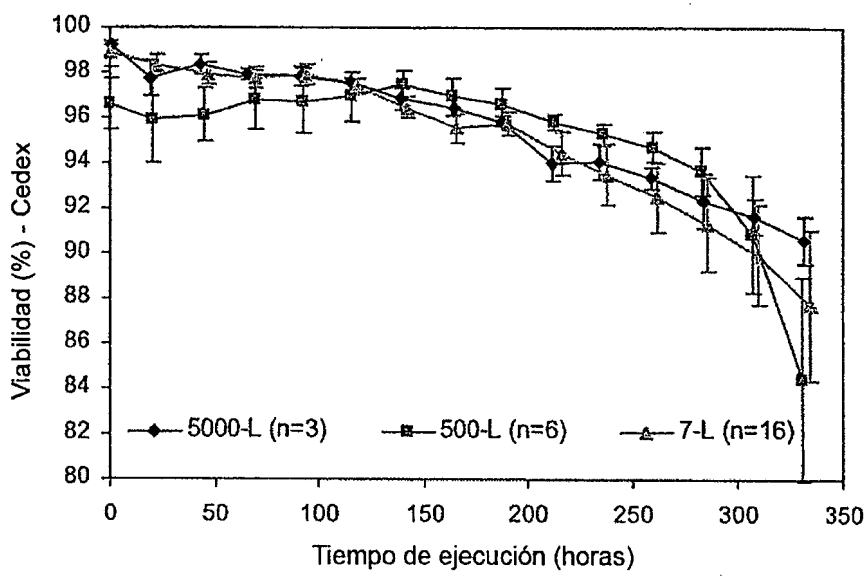


Fig. 18C

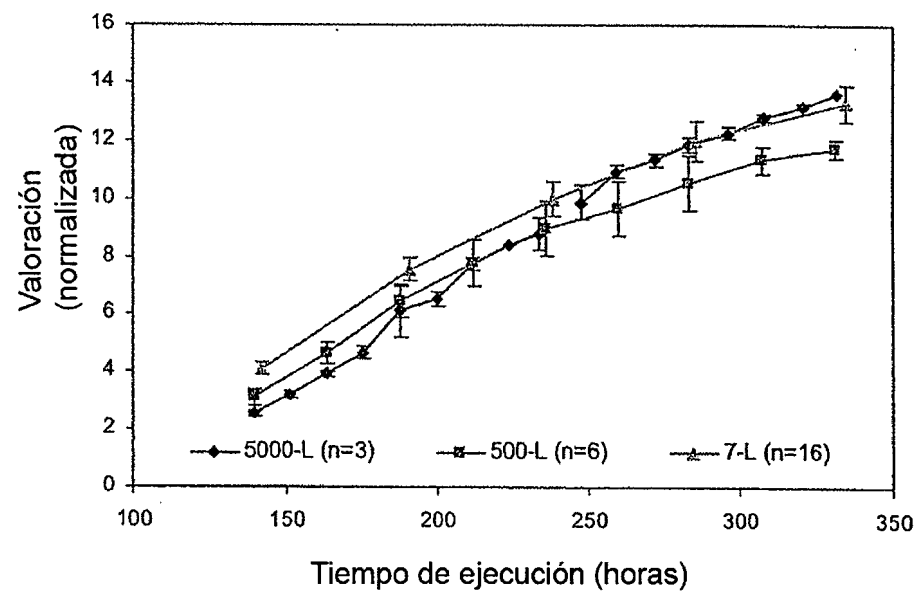
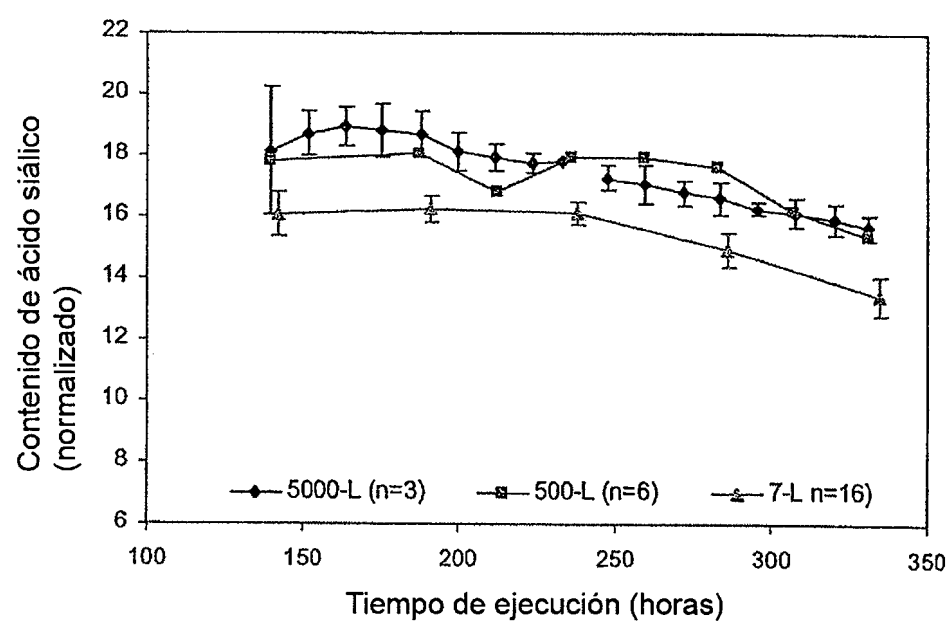


Fig. 18D



ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--P--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAGCCACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--Q--K--A--T--E--V--R--V--	+34
AEAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCACCGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCCAAAGGACACCTTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCAGGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCTACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGGAGAGCAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

Fig. 19

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCAGTCTGCTCTGCACTCCTGTTTCCA -19
 M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
 S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
 +1
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG +102
 G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V-- +34
 ACAGTGTCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54
 GGGAAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
 G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74
 GTGAUUCTACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
 V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94
 GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAAACCCAGATTATGTA +342
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114
 ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC +402
 I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134
 ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC +462
 T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154
 CCARAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG +522
 P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
 D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC +642
 H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214
 GTCCCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC +702
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCGAGCCCCBA +762
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGC +822
 E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCATTT +882
 L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294
 GGGCAGCCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGAACGTCTTCTCA +1002
 F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
 C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354
 CCGGGTAAATGA
 P--G--K--*

Fig. 20

PÉPTIDO DE SEÑALIZACIÓN ONCOSTATINA M

M	G	V	L	L	T	Q	R	T	L	L	S	L	V	L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT	45													
A	L	L	F	P	S	M	A	S	M	A	M	H	V	A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC	90													
Q	P	A	V	V	L	A	S	S	R	G	I	A	S	F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT	135													
V	C	E	Y	A	S	P	G	K	A	T	E	V	R	V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG	180													
T	V	L	R	Q	A	D	S	Q	V	T	E	V	C	A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG	225													
A	T	Y	M	M	G	N	E	L	T	F	L	D	D	S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC	270													
I	C	T	G	T	S	S	G	N	Q	V	N	L	T	I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC	315													
Q	G	L	R	A	M	D	T	G	L	Y	I	C	K	V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG	360													
SITIO DE GLUCOSILACIÓN														
E	L	M	Y	P	P	P	Y	Y	L	G	I	G	N	G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA	405													
T	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C	P	D	S	D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC	450													
F	L	L	W	I	L	A	A	V	S	S	G	L	F	F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT	495													
Y	S	F	L	L	T	A	V	S	L	S	K	M	L	K
TAT AGC TTT CTC CTC AGA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG	540													
K	R	S	P	L	T	T	G	V	Y	V	K	M	P	P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA	585													
T	E	P	E	C	E	K	Q	F	Q	P	Y	F	I	P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC	630													
I	N													
ATC AAT	636													

Fig. 21

CESIÓN DEL INVENTOR
AL SOLICITANTE

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from JING, Ying to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 05 October 2010 (05.10.2010)
VIII-2-2(i v)		an assignment from LI, Zhengjian to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 05 October 2010 (05.10.2010)
VIII-2-2(i v)		an assignment from QIAN, Yueming to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 05 October 2010 (05.10.2010)

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

PODER OTORGADO POR BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

APOSTILLA

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
SALLY B. HANSEN
3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. LLEVA EL SELLO DE:
SALLY B. HANSEN, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 28 DE JUNIO DE 2007
7. POR BRADLEY ABELOW, TESORERO DE
8. N° A295716
9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)
10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW



Texto en inglés y en español mediante el cual **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** domiciliada en Nueva York, Nueva York, otorga poder a **ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE y/o JUAN PABLO CONCHA**

Dado y suscrito el 30 de mayo de 2007

(Firmado) Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior)

Jaime A. Garavito B.
JAIME A. GARAVITO B
TRADUCCION OFICIAL
RES. 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito Notario certifica el 30 de mayo de 2007 la existencia legal de la sociedad **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** así como las funciones y firma de su representante autorizado Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior) para lo cual se basó en los documentos relacionados en inglés en el punto 6 de la certificación los cuales se traducen aquí al español, a saber:

Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.

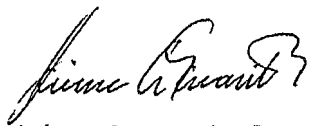
Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado mayo 24, 2005.

[Firmado] SALLY B. HANSEN, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "SALLY B. HANSEN. Notario Público de Nueva York. Mi comisión vence el 6 de junio de 2010"]

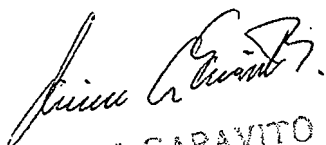
[Aparece sello realizado]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 82106


JAIME A. GARAVITO B
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 Res. 034 de Enero 11 de 1983
 MINISTERIO DE JUSTICIA

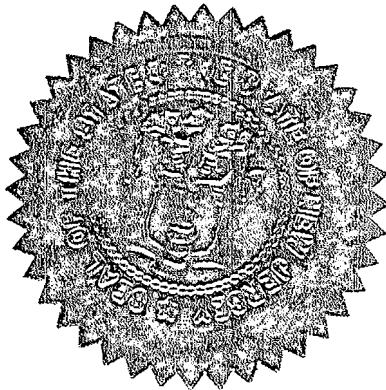

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
SALLY B HANSEN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
SALLY B HANSEN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JUNE 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A295716
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow



BASKIN & MCKENZIE

Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 82 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 880.088.840-3
Tel: +57 1 834 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bskemet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 30 day of May of 2007

Signature of the person issuing the Power of Attorney



Anastasia P. Winslow
Senior Patent Counsel

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciliada en

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de ésta sociedad.

Dado y firmado en

A los 30 días del mes de mayo de 2007

Firma de la persona que firma el Poder



279

2

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 30 day of May
2007, the undersigned Notary

CERTIFIES

- That Name of the person issuing the power
Anastasia P. Winslow
of legal age and domiciled in
Princeton, NJ USA
Address, city, state, country
- set his hand on the foregoing document.
- That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

- That the grantor has executed the foregoing document as
Senior Patent Counsel
Position of the person issuing the Power
of the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

- That the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

having its home office in

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

- That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

- That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

(Please indicate here the documents such as the articles of incorporation, by laws or resolution from the Board of Directors and their dates, on which the notary relied to grant the certification)

- Certification executed by Sr. Vice President and General Counsel of Bristol-Myers Squibb Company on April 7, 2007
- Amended and Restated Certificate of Incorporation of Bristol-Myers Squibb Company dated May 24, 2005

Notary Public
Sally B. Hansen
SALLY B. HANSEN
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 6, 2010

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 30 días del mes de mayo
de 2007, el suscrito Notario

DA FE

- 1 Que Anastasia P. Winslow
mayor y domiciliado en Princeton, NJ
Estados Unidos de América
- suscribió de su puño y letra el documento que antecede.
2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

- 3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Abogados de Patentes Senior
de la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

- 4 Que la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY**

con sede en

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

- 5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

- Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.
- Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado el 4 de mayo de 2005.





No. 12-058562- -00000-0000

Fecha: 2012-04-10 16:09:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 279

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐