



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 046**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05017434 .1**  
96 Fecha de presentación : **06.06.1996**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1609853**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Procedimiento para controlar la sialilación de proteínas producidas por un cultivo de células de mamíferos.**

30 Prioridad: **06.06.1995 US 469348**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.07.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.07.2009**

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**  
**Genentech, Inc.**

72 Inventor/es: **Etcheverry, Tina;**  
**Lesslauer, Werner;**  
**Richter, Wolfgang;**  
**Ryll, Thomas y**  
**Schreitmüller, Thomas**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 324 046 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para controlar la sialilación de proteínas producidas por un cultivo de células de mamíferos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procesos para controlar el contenido de ácido siálico de las glicoproteínas producidas por cultivo de células de mamíferos. La invención proporciona procesos para aumentar y disminuir el contenido de ácido siálico de las glicoproteínas producidas por cultivo de células de mamífero. La invención además se refiere a procesos para producir quimeras de receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR)-inmunoglobulina (Ig), así como nuevas preparaciones TNFR1-IgG<sub>1</sub>, y sus usos en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias e inmunes.

Las diferencias en los patrones de glicosilación de las glicoproteínas producidas de forma recombinante, ha sido recientemente un asunto de gran atención en la comunidad científica, ahora que las proteínas recombinantes producidas como probables agentes preventivos o terapéuticos, se acercan a la clínica. Las cadenas laterales de oligosacáridos de las glicoproteínas afectan la función de la proteína, Witner A, y Howard S.C. (1990) *Biochem.* 29:4175-4180), y la interacción molecular entre las partes de la glicoproteína, que dan como resultado la conformación y presentación de una superficie tridimensional de la proteína (Hart (1992) *Curr. Op. Cell Biol.*, 4:1017-1023; Goochee, *et al.*, (1991) *Bio/Technology*, 9:1347-1355; Parekh, R.B., (1991) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1:750-754). Los oligosacáridos también pueden servir para que un polipéptido determinado haga diana en ciertas estructuras basadas en receptores de carbohidratos celulares específicos (Bevilacqua M.P. y Nelson R.M., (1993) *J. Clin. Invest.* 91:379-387); Nelson R.M. *et al.*, (1993) *J. Clin. Invest.* 91:1157-1166. Norgard, K.E., *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1068-1072; Imai Y., *et al.*, (1993) *Nature* 361:555-557). El componente terminal de ácido siálico de la cadena lateral del oligosacárido afecta a la absorción, la vida media sérica, y el aclaramiento del suero, así como a las propiedades físicas, químicas e inmunogénicas de la glicoproteína (Parekh, R.B., *arriba*; Varki, A., (1993) *Glycobiology* 3:97-100; Paulson J. (1989), *TIBS.* 14:272-276; Goochee, *et al.*, (1991) *Biotechnology* 9:1347-1355; Kobata A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 209:483-501); Es por lo tanto importante mantener el contenido en ácido siálico de la glicoproteína, particularmente de aquellas proteínas que se pretenden utilizar como agentes terapéuticos.

Se ha prestado mucha atención a los factores que afectan a la glicosilación durante la producción de proteína recombinante, tales como el modo de crecimiento (adherente o en suspensión), el suero bovino fetal en la formulación del medio, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares (Werner, R. y Noe W. (1993), *Drug Res.* 43:1134-1248; Hayfer *et al.*, (1992) *Biotech. and Bioeng.* 39:327-335; Borys *et al.*, (1994) *Biotech. and Bioeng.* 43:505-514; Borys *et al.*, (1993) *Bio/technology* 11:720-724; Hearing *et al.*, (1986) *J. Cell Biol.* 108:339-353; Goochee *et al.*, en *Frontiers in Bioprocessing II*, Todd *et al.*, (1992) American Chemical Society pags. 199-240; Patente de EE UU N° 5.096.816; Chotigeat, W., (1994) *Cytotech.* 15:217-221). Varios grupos han investigado los parámetros del proceso que rodean a la producción de proteínas recombinantes, y especialmente el efecto de la composición del medio en la producción de proteínas recombinantes (Park *et al.*, (1992) *Biotech. Bioeng.* 40:686-696; Cox y McClure (1983) *In Vitro* 19:1-6; Mizutani *et al.*, (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187:664-669; Le Gross *et al.*, (1985) *Lymph. Res* 4(3):221-227).

Se sabe que la adición de ácidos alcanóicos, tales como el ácido butírico, afectan la expresión transitoria de DNA extraño en los cultivos celulares recombinantes (Prasad y Sinha (1975) *In Vitro* 12:125-132; Solicitud de Patente Japonesa N° 62-48935; Solicitud de Patente Japonesa N° 55-150440; Klehr *et al.*, (1992) *Biochem.* 31:3222-3229; Gorman y Howard (1983) *Nucleic acid Res.* 11:7631-7648). Sin embargo, el butirato de sodio tiene un intervalo de efectos sobre la expresión génica entre las diversas líneas celulares y las diversas composiciones del medio de cultivo (D'Anna *et al.*, (1980) *Biochem.* 19:2656-2671; Hagopian, H.K., (1977) *Cell* 12:855-860) y sobre la producción de proteína (Milhaud (1980) *J. Cell Physiol.* 104:163-170; Solicitud de Patente de Reino Unido N° GB 2 122 207 A), que sugieren que el butirato puede modificar la expresión génica (Yuan *et al.*, (1985) *J. Biol. Chem.* 3778-3783), o inhibir la expresión de ciertos genes (Yuan *et al.*, *arriba*).

La Patente Europea N° 0 239 292 B1 describe un proceso para aumentar la producción de proteína en presencia de un ácido alcanóico o una de sus sales, tal como el ácido butírico. La publicación, sin embargo, proporciona escasa guía para la selección de las concentraciones apropiadas del aditivo, y además no explica el efecto del aditivo en la glicosilación de la proteína. Otros han descrito que la adición de niveles bajos (0-1,5 mM) de butirato sódico al medio de producción del cultivo celular, para aumentar la productividad específica de la célula, produce un aumento concomitante en las glicofórmulas ácidas (que corresponden a un aumento en el contenido de ácido siálico) de la glicoproteína recombinante producida (Chotigeat, *et al.*, (1994) *Cytotech.* 15:217-221).

Varios grupos han analizado los efectos de la osmolalidad sobre el crecimiento celular y la producción de polipéptidos (Ozturk y Palsson (1991) *Biotech. and Bioeng.* 37:989-993; Stubbiefield *et al.*, (1960) *Cancer Research* 20:1646-1655; Garcia-Perez *et al.*, (1989) *Journal of Biological Chemistry* 264(28):16815-16821; Miner *et al.*, (1981) *Invasion Metastasis* 1:158-174; Documento GB 2.251.249; Documento EP 481.791; Patente de EE UU N° 5.151.359; Patente de EE UU N° 4.724.206; Patente de EE UU N° 5.122.469; y Documento WO 89/04867). Se han propuesto diversos intervalos de osmolalidad para el crecimiento celular o la producción de proteínas. Generalmente, la osmolalidad del medio de cultivo celular se aumenta mediante la adición de NaCl o aminoácidos. Los estreses medioambientales, tales como el aumento de la concentración de sal, llevan, en algunos casos, a un aumento en la producción del producto ce-

lular. Se ha referido la idea de que puede conseguirse una expresión aumentada de productos proteicos de mamíferos, en cultivos de células de mamíferos, a través del estrés producido por solutos, por ejemplo se ha referido la adición de sal de ácido láctico, amonio, al medio de cultivo (Publicación Internacional N° WO 89/04867). Estos estreses son generalmente inhibidores del crecimiento, pero favorecen la producción específica de la célula.

5 Otros han discutido el efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento celular y/o la producción de polipéptidos en el cultivo celular recombinante. Véase, por ejemplo, Park *et al.*, (1992) *Biotechnology and Bioengineering* 40:686-696; Huang *et al.*, (1991) *Journal of Biotechnology* 18:161-162; Documento EP 387.840; Reuveny *et al.*, (1986) *Journal of Immunological Methods*, 86:53-59; Fine *et al.*, (1976) *In Vitro* 12(10):693-701; Dircks *et al.*,  
10 (1987) *Exp. Eye Res.*, 44:951-958; Mizutani *et al.*, (1992) *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187(2):664-669; Sugiura (1992) *Biotechnology and Bioengineering*, 39:953-959; Documento WO 88/01643; Graf *et al.*, (1989) *DECHEMA Biotechnol. Conf.*, 3:615-618; Solicitud de Patente Japonesa N° JP 1-101882; Patente de EE UU N° 3.926.723; Documento WO 87/00195; y Fleischaker, Jr., Ph.D. Thesis, Massachusetts Institute of Technology, pags. 196-229 (Junio 1982). Sin embargo, los estudios previos no han estudiado el efecto de varios parámetros del  
15 proceso, en cuanto al contenido de ácido siálico de la proteína madura, un factor en la producción de glicoproteína que es crucial para el éxito clínico.

La presente invención proporciona procesos para controlar el contenido de ácido siálico de las glicoproteínas producidas por cultivos de células de mamíferos.

### 20 Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que ciertos parámetros del proceso de cultivo de células de mamíferos afectan a la productividad específica de la célula, así como a la extensión y al tipo de glicosilación de las proteínas producidas. Más particularmente, los presentes inventores han encontrado que ciertos factores que aumentan la productividad específica de la célula tienen un efecto inverso sobre el contenido de ácido siálico de la proteína producida. Los presentes inventores han descubierto por lo tanto varios procedimientos de cultivo celular para enriquecer glicofomas o glicoproteínas particulares producidas en cultivos de células de mamíferos.

30 Según esto, la invención proporciona un proceso para controlar el contenido de ácido siálico de una glicoproteína producida por un cultivo de células de mamífero. Según este aspecto de la invención, al variar la tasa de producción de la glicoproteína en la fase de producción del cultivo celular, se producen variaciones en el contenido de ácido siálico de la glicoproteína madura. Más particularmente, un aumento en la productividad específica de la célula durante la fase de producción de la glicoproteína, da como resultado una disminución en el contenido de ácido siálico de la proteína madura. Por el contrario, una disminución en la productividad específica de la célula, da como resultado un aumento en el contenido de ácido siálico en la proteína madura.

La presente invención proporciona, en una realización preferida, la variación de la productividad específica de la célula, en una célula hospedante de mamífero, durante la fase de producción de proteína del cultivo de células de mamífero, mediante el control de los factores que afectan a la productividad específica de la célula. Según un aspecto de la invención, se controla la concentración de factores que aumentan la transcripción de DNA. En otra realización, se controla la productividad específica de la célula, manteniendo la osmolalidad del cultivo celular dentro de ciertos márgenes. Según la invención, cualquiera de los parámetros anteriores es controlado, solo o en combinación, para afectar al contenido de ácido siálico de la glicoproteína madura. En una realización particular de la presente invención,  
45 el factor que aumenta la transcripción de DNA es un ácido alcanoico o una de sus sales, tal como butirato sódico, a una concentración de desde alrededor de 0,1 mM hasta alrededor de 20 mM. Según un segundo aspecto de la invención, la osmolalidad del cultivo celular es mantenida entre alrededor de 250-600 mOsm. En un aspecto más, la temperatura del cultivo celular es controlada entre alrededor de 30°C y 37°C.

50 En una realización preferida la invención proporciona un proceso para aumentar el contenido de ácido siálico de la glicoproteína madura producida por un cultivo de células de mamífero, que comprende mantener una productividad específica de la célula menor, controlando uno cualquiera de los parámetros del proceso identificados anteriormente, opcionalmente junto con otros parámetros conocidos en la técnica. Según este aspecto de la presente invención, cultivando la célula hospedante a una concentración de ácido alcanoico o sus sales de desde alrededor de 0,1 mM hasta  
55 alrededor de 6 mM, y opcionalmente también manteniendo la osmolalidad del cultivo celular desde alrededor de 300-450 mOsm, se produce una proteína con un aumento en el contenido de ácido siálico.

En una realización preferida más, la invención proporciona un proceso para disminuir el contenido de ácido siálico de la glicoproteína madura producida por un cultivo de células de mamífero, que comprende aumentar la productividad específica de la célula del cultivo celular. La productividad específica de la célula se aumenta, en una realización preferida, proporcionando un proceso de cultivo celular, que comprende cualquiera de los siguientes factores, cultivar la célula hospedante a una concentración de un ácido alcanoico o sus sales de desde alrededor de 6 mM hasta alrededor de 12 mM; y, mantener la osmolalidad del cultivo celular alrededor de 450-600 mOsm.

65 La invención además proporciona, en una realización preferida, un proceso de cultivo celular con tres fases de cultivo celular. La invención proporciona de esta forma un proceso para controlar el contenido de ácido siálico de una glicoproteína producida por un cultivo de células de mamífero, que comprende las etapas de cultivar una célula hospedante que expresa la proteína, en una fase de crecimiento, durante un periodo de tiempo y bajo condiciones tales

que se maximice el crecimiento celular. Según este aspecto de la presente invención, la fase de crecimiento es seguida por una fase de transición en la que se seleccionan y se mantienen los parámetros de cultivo celular para el contenido de ácido siálico deseado de la glicoproteína madura. La fase de transición es seguida por una fase de producción del cultivo celular, en la que se mantienen los parámetros seleccionados en la fase de transición, y el producto de glicoproteína se produce y se recolecta. Variando la productividad específica de la célula en la fase de producción del cultivo celular, mediante la adición al cultivo celular de un ácido alcanoico o su sal sódica a una concentración de desde alrededor de 0,1 mM hasta alrededor de 20 mM, y adecuando la osmolalidad del cultivo celular a alrededor de entre 250 y 600 mOsm, opcionalmente en combinación con otro durante la fase de transición, se produce una proteína con diferentes cantidades de ácido siálico.

En otra realización preferida más, la presente invención proporciona un proceso para controlar la cantidad de ácido siálico presente en una proteína quimérica de receptor soluble de tipo I de factor de necrosis tumoral (TNFR1)-inmunoglobulina G<sub>1</sub>(IgG<sub>1</sub>). Los presentes inventores han descubierto que, bajo ciertas condiciones de producción, pueden obtenerse nuevas preparaciones de glicofórmos TNFR1-IgG<sub>1</sub>, que exhiben las propiedades deseables de un aclaramiento prolongado de la sangre, a la vez que se mantiene una significativa actividad funcional. Una vida media funcional larga permite la administración simplificada de dosis de choque y contribuye a la potencia *in vitro* de la glicoproteína producida, permitiendo formas de dosificación menor de la glicoproteína.

Según este aspecto de la presente invención, se produce una molécula de glicoproteína TNFR1-IgG<sub>1</sub>, que contiene un aumento en los residuos de ácido siálico. Los parámetros del cultivo celular para la fase de producción de la TNFR1-IgG<sub>1</sub> se seleccionan para obtener el contenido deseado en ácido siálico. En una realización preferida, el butirato sódico está presente en la fase de producción a una concentración de desde alrededor de 0,1 mM hasta alrededor de 6 mM, y la osmolalidad se mantiene alrededor de 300-450 mOsm. En un aspecto más preferido la concentración de butirato sódico es de alrededor de 1 mM, y la osmolalidad se mantiene alrededor de 350-400 mOsm.

Todavía en otra realización, la presente invención describe una preparación de glicoproteína TNFR1-IgG<sub>1</sub>, producida por el proceso de la presente invención. Se describe una preparación que comprende TNFR1-IgG<sub>1</sub>, en la que el intervalo de pI de la preparación está entre aproximadamente 5,5 y 7,5. Se describe, además, una preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que tiene una relación molar de ácido siálico a proteína de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 y, en especial, de aproximadamente 5 a aproximadamente 6. Todavía en otro aspecto, la preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> tiene aproximadamente 1 a aproximadamente 2 moles de residuos de N-acetilglucosamina expuestos por cada mol de proteína. En un aspecto adicional, la preparación tiene una relación molar de ácido siálico a N-acetilglucosamina de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,5 y, más preferiblemente, de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,45.

La presente invención también describe una composición terapéutica que comprende la preparación anterior, útil en el tratamiento de estados patológicos mediados por TNF.

### Descripción de los dibujos

Figura 1A y Figura 1B. Las Figuras 1A y 1B muestran el método utilizado para calcular la productividad específica de un proceso de cultivo celular típico en la fase de producción. La productividad específica puede expresarse como una función de los conteos de células viables (días de células viables), como se muestra en la Figura 1A: o volumen celular empaquetado (PCV), como se muestra en la Figura 1B. La tasa de producción específica se da en un intervalo para un intervalo de confianza del 90%.

Figura 2A y Figura 2B. Las Figuras 2A y 2B muestran la correlación entre la productividad específica, basada en días de células viables (Figura 2A), y volumen celular empaquetado (PCV) (Figura 2B), durante la fase de producción, y el contenido de ácido siálico (NANA) del producto recolectado. Se muestran valores para 9 procesos diferentes (A-I). Los puntos representan los datos de procesos de producción independientes, tal como se describen en la Tabla 1.

### Descripción detallada de la invención

#### I. Definiciones

Los restos de carbohidratos de la presente invención, se describirán con referencia a la nomenclatura utilizada normalmente para la descripción de oligosacáridos. Una revisión de la química de carbohidratos que utiliza esta nomenclatura se encuentra en Hubbard e Ivatt (1981) Ann. Rev. Biochem. 50:555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal, que representa galactosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen con referencia a las notaciones cortas NeuNAc, para ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para ácido 5-glicolilneuramínico (J. Biol. Chem. 1982, 257:3347; J. Biol. Chem., 1982, 257:3352).

“Osmolalidad” es una medida de la presión osmótica de las partículas de soluto disueltas en una solución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto los iones como las moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas osmóticamente activas (es decir, osmoles) disueltas en 1 kg de solución (1 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O a 38°C es equivalente a una presión osmótica de 19 mm de Hg). Por el contrario, “osmolaridad” se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de solución. Cuando se utiliza aquí, la abreviatura “mOsm” significa “miliosmoles/kg de solución”.

Como aquí se utiliza, “glicoproteína” se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de alrededor de diez aminoácidos y al menos una cadena lateral de oligosacárido. Las glicoproteínas pueden ser homólogas a la célula hospedante, o preferiblemente, son heterólogas, es decir, extrañas a la célula hospedante que está siendo utilizada, tal como una proteína humana producida por una célula de ovario de hámster Chino. Preferiblemente se utilizan glicoproteínas de mamífero (glicoproteínas que eran originalmente derivadas de un organismo mamífero), más preferiblemente, aquellas que se secretan directamente al medio. Ejemplos de glicoproteínas de mamífero incluyen moléculas tales como citoquinas y sus receptores, así como proteínas quiméricas que comprenden citoquinas o sus receptores, incluyendo, por ejemplo factor de necrosis tumoral alfa y beta, sus receptores (TNFR-1; Documento EP 417.563, publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, Documento EP 417.014, publicado el 20 de marzo de 1991), y sus derivados; renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor liberador de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón, factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor von Willebrand; factores anticoagulantes tales como la Proteína C; factor auricular natriurético; surfactante pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como la uroquinasa o la orina humana o el activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; RANTES (regulado en activación normalmente expresado y secretado por células T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como la albúmina sérica humana; sustancia inhibidora de los conductos de Müller; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; pro-relaxina; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa; DNAsa; inhibina; activita; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ó -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento de nervio tal como NFG- $\beta$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformador (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4, o TGF- $\beta$ 5; factor de crecimiento de tipo insulina -I y -II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro); proteínas de unión a factor de crecimiento de tipo insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética de hueso (BMP); un interferón tal como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleuquinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de superficie de membrana; factor acelerador de desintegración; antígenos virales tales como, por ejemplo, una parte de la cubierta de AIDS; proteínas transportadoras; receptores de migración; adresinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; proteínas quiméricas, tales como inmunoadhesinas; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados.

Las expresiones “medio de cultivo celular” y “medio de cultivo” se refieren a una solución de nutrientes utilizada para cultivar células de mamífero, que típicamente proporciona al menos un componente de una o más de las siguientes categorías:

- 1) una fuente de energía, generalmente en forma de un carbohidrato, tal como glucosa;
- 2) todos los aminoácidos esenciales, y generalmente el grupo básico de veinte aminoácidos más cisteína;
- 3) vitaminas y/o otros compuestos orgánicos requeridos a baja concentración;
- 4) ácidos grasos libres; y
- 5) elementos en trazas, donde los elementos en trazas se definen como compuestos inorgánicos, o elementos naturales que son requeridos típicamente a muy bajas concentraciones, generalmente en el intervalo de concentración micromolar.

La solución de nutrientes puede opcionalmente suplementarse con uno o más componentes, de cualquiera de las siguientes categorías:

- 1) hormonas y otros factores de crecimiento tales como, por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico;
- 2) sales y soluciones de tampón como, por ejemplo calcio, magnesio, y fosfato;
- 3) nucleósidos y bases tales como, por ejemplo, adenosina, timidina, e hipoxantina; y
- 4) proteína e hidrolizados tisulares.

Las expresiones “célula hospedante de mamífero”, “célula hospedante”, “célula de mamífero” y similares, se refieren a líneas celulares derivadas de mamíferos, que son capaces de crecer y sobrevivir cuando se ponen en un cultivo de monocapa o en un cultivo en suspensión, en un medio que contiene los nutrientes y los factores de crecimiento

## ES 2 324 046 T3

apropiados. Los factores de crecimiento necesarios para una línea celular particular, se determinan empíricamente fácilmente, sin experimentación innecesaria, como se describe, por ejemplo en *Mammalian Cell Culture* (Mather, J.P., ed., Plenum Press, N.Y. [1984]) y Barnes y Sato (1980), Cell 22:649. Típicamente, las células son capaces de expresar y secretar grandes cantidades de una glicoproteína particular de interés, en el medio de cultivo. Ejemplos de células hospedantes de mamíferos adecuadas dentro del contexto de la presente invención, pueden incluir células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 [1980]); células dp 12.CHO (Documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989); línea celular CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293, ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59 [1977]); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 [1980]); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3<sup>a</sup>, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562 ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedantes preferidas incluyen células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 [1980]); células dp12.CHO (Documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989).

El término “peptona” dentro del contexto de la presente invención se refiere a un suplemento del medio que es esencialmente un hidrolizado de proteína animal. La fuente de esta proteína puede ser un producto animal secundario de casas de ganado, gelatina purificada, o material de plantas. La proteína es hidrolizada típicamente utilizando ácido, calor o diversas preparaciones de enzimas. Las mezclas de peptona preferidas son, por ejemplo, “Primatone RL” y “Primatone HS”, ambos disponibles comercialmente (Sheffield, Inglaterra).

Las expresiones “productividad específica de la célula”, “tasa específica de la célula”, y similares, como aquí se utilizan, se refieren a la tasa de expresión de producto específica, por ejemplo, por célula, o por medida de masa o volumen celular. La productividad específica de la célula se mide, por ejemplo, en gramos de proteína producidos por célula por día. La productividad específica de la célula puede medirse convenientemente según el método integral:

$$dP/dt = q_p X$$

o

$$P = q_p \int_2^2 X dt$$

donde  $q_p$  es la constante de productividad específica de la célula,  $X$  es el número de células o el volumen celular, o los equivalentes de masa celular, y  $dP/dt$  es la tasa de producción de proteína. De esta forma,  $q_p$  puede obtenerse de una gráfica de concentración de producto contra integral de tiempo de las células viables ( $\int_2^2 X dt$  “días de células viables”). Según esta fórmula, cuando la cantidad de producto de glicoproteína producida se dibuja en la gráfica contra los días de células viables, la curva es equivalente a la tasa específica de la célula. Las células viables pueden determinarse mediante diversas medidas, por ejemplo, biomasa, tasa de obtención de  $O_2$ , lactasa deshidrogenasa (LDH), volumen de células empaquetadas o turbidez.

La expresión “fase de crecimiento” del cultivo celular se refiere al periodo de crecimiento celular exponencial (la fase logarítmica), en la que las células están generalmente dividiéndose rápidamente. Durante esta fase, las células se cultivan durante un periodo de tiempo, generalmente entre 1-4 días, y bajo tales condiciones, el crecimiento celular se maximiza. La determinación del ciclo de crecimiento de la célula hospedante, puede determinarse para la célula hospedante particular, sin experimentación innecesaria. “Periodo de tiempo y bajo tales condiciones que el crecimiento celular se maximiza” y similares, se refieren a aquellas condiciones de cultivo que, para una particular línea celular, se determinan como óptimas para el crecimiento y la división celular. Durante la fase de crecimiento, las células se cultivan en un medio nutriente que contiene los aditivos necesarios, generalmente alrededor de 30-40°C, en una atmósfera humidificada, controlada, de tal forma que se consigue un crecimiento óptimo para la línea celular particular. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un periodo de alrededor de entre uno y cuatro días, generalmente entre dos y tres días.

La expresión “fase de transición” del cultivo celular se refiere al periodo de tiempo durante el cual se alcanzan las condiciones de cultivo para la fase de producción. Durante la fase de transición, los factores ambientales, tales como la temperatura del cultivo celular, la osmolalidad del medio y similares se cambian desde las condiciones de crecimiento a las condiciones de producción.

La expresión “fase de producción” del cultivo celular se refiere al periodo de tiempo durante el cual el crecimiento celular se ha estabilizado. Durante la fase de producción, el crecimiento celular logarítmico ha finalizado y la producción de proteína es primaria. Durante este periodo de tiempo el medio generalmente se suplementa para ayudar a la producción continuada de proteína, y para alcanzar el producto de glicoproteína deseado.

El término “expresión” o “expresa” se utilizan aquí para referirse a la transcripción y a la traslación que ocurren dentro de una célula hospedante. El nivel de expresión de un producto de un gen en una célula hospedante, puede determinarse sobre la base de la cantidad de mRNA correspondiente que está presente en la célula, o la cantidad de la proteína codificada por el producto del gen que se produce por la célula. Por ejemplo, el mRNA transcrito de un producto de un gen se cuantifica deseablemente mediante hibridación de tipo northern. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, págs. 7.3-7.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La proteína codificada por un gen puede cuantificarse analizando la actividad biológica de la proteína, o empleando análisis que son independientes de dicha actividad, tal como el western blotting o el radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos que son capaces de reaccionar con la proteína. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, págs. 18.1-18.88 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Por ácido alcanoico o sus sales se entiende un ácido alcanoico de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada o sus sales. El ácido alcanoico es generalmente de uno a diez átomos de carbono y es, preferiblemente, de tres a seis átomos de carbono. Un ácido alcanoico a modo de ejemplo es ácido butírico y la correspondiente sal es butirato sódico.

## II. Procedimientos de cultivo celular

Los presentes inventores han descubierto que los factores que aumentan la productividad específica de una célula durante la producción de una glicoproteína producida por un cultivo de células de mamífero, tienen un efecto inverso sobre el contenido de ácido siálico de la glicoproteína producida. Como las proteínas que expresan uno o más residuos de ácido siálico por complejo de estructura de oligosacárido tienen tasas de aclaramiento mayores *in vivo*, la tasa de aclaramiento de la glicoproteína producida puede manipularse dentro de límites amplios mediante el grado global de sialilación de la preparación. La presente invención proporciona procesos para controlar la extensión de la sialilación de una glicoproteína producida por un cultivo de células de mamífero. Siguiendo la metodología descrita aquí, uno es capaz de determinar los parámetros precisos del proceso, que proporcionan el contenido deseado en ácido siálico de una glicoproteína producida por un cultivo de células de mamífero.

Según la presente invención, una célula hospedante de mamífero se cultiva para producir un producto glicoproteína recuperable. El contenido global de ácido siálico en la glicoproteína se controla controlando parámetros del cultivo celular que afectan la productividad específica de la célula. Los factores que afectan la productividad específica de la célula son bien conocido en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, factores que afectan el número de copias de DNA/RNA, factores que afectan al RNA, tales como los factores que estabilizan el RNA, nutrientes del medio y otros suplementos, la concentraciones de activadores de la transcripción, la osmolalidad del ambiente del cultivo, la temperatura y el pH del cultivo celular, y similares. Según la presente invención, el ajuste de estos factores, solos o en combinación, para aumentar la productividad específica de la célula, genera una proteína con un contenido en ácido siálico disminuido. El ajuste de estos factores, solos o en combinación, para disminuir la productividad específica de la célula, genera una glicoproteína madura con un contenido aumentado de ácido siálico.

La invención se describirá a continuación, con referencia a varios principios y técnicas de cultivo celular, incluyendo algunos bien conocidos en la técnica.

Según la presente invención, se cultivan células de mamífero para producir un producto glicoproteína deseado. Cuando se elige una célula hospedante para la producción de la glicoproteína dentro del contexto de la presente invención, es importante reconocer que diferentes células hospedantes tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación translacional y post-translacional (por ejemplo, glicosilación, escisión) de las proteínas expresadas. Deben elegirse líneas celulares apropiadas, para asegurarse de que son posibles las modificaciones post-translacionales deseadas. Alternativamente, las células hospedantes pueden modificarse para expresar un producto de un gen requerido para la modificación post-translacional específica.

En particular, las células de mamífero que expresan la proteína deseada, deben expresar, o deben ser manipuladas para expresar las enzimas particulares, de tal forma que bajo las condiciones apropiadas, aquí descritas, ocurra la modificación post-translacional apropiada *in vivo*. Las enzimas incluyen aquellas enzimas necesarias para la adición y la terminación de los carbohidratos ligados a N- y O-, tales como las descritas por Hubbard e Ivan, *arriba*, para los oligosacáridos ligados a N-. Las enzimas incluyen opcionalmente oligosacariltransferasa, alfa-glucosidasa I, alfa-glucosidasa II, ER alfa (1,2)manosidasa, Golgi alfa manodasa I, N-acetilglucosaminiltransferasa I, Golgi alfa-manodasa II, N-acetilglucosaminiltransferasa II, alfa(1,6)fucosiltransferasa, y  $\beta(1,4)$ galactosiltransferasa. Adicionalmente, la célula hospedante expresa la sialil transferasa apropiada, de la que puede esperarse que se una al ácido siálico terminal en una posición específica, y ligarse como parte del genoma de la célula hospedante. Opcionalmente la célula hospedante puede prepararse para expresar las sialil transferasas apropiadas, mediante, por ejemplo, la transfección de la célula hospedante con el DNA que codifica la sialil transferasa.

Se espera que las sialil transferasas descritas anteriormente añadan el residuo de ácido siálico terminal a la estructura nuclear del oligosacárido apropiado, tal como Gal $\beta$ 1-4GlcNAc. Sialil transferasas apropiadas dentro del contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a aquellas sialil transferasas que catalizan la sialilación del complejo y la ramificación de los oligosacáridos ligados a N- y a O-.

Para que el cultivo de células de mamífero exprese la proteína deseada, y sea capaz de añadir los carbohidratos apropiados en posición y unión específicas, pueden utilizarse numerosas condiciones de cultivo, poniendo particular

atención a la célula hospedante que se está cultivando. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células de mamífero son bien conocidas en la técnica (J. Immunol. Methods (1983) 58:221-234), o pueden determinarse fácilmente por los expertos (véase por ejemplo, *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd Ed., Rickwood D, y Hames, B.D., eds. Oxford University Press. New York (1992)), y varían según la célula particular seleccionada.

5 El cultivo de células de mamífero de la presente invención se prepara en un medio adecuado para la célula particular que se está cultivando. Medios disponibles comercialmente, tales como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MED], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ([DMEM], Sigma), son ejemplos adecuados de soluciones de nutrientes. Además, cualquier medio descrito por Ham y Wallace, (1979), Meth. Enz., 58:44; Barnes y Sato, (1980) Anal. Biochem., 102:255; Patentes de EE UU números 4.767.704; 4.657.866; 10 4.927.762; 5.122.469 ó 4.560.655; Publicaciones Internacionales números WO 90/03430; y WO 87/00195; cuyas declaraciones se incorporan aquí mediante referencia, y pueden utilizarse como medios de cultivo. Cualquiera de estos medios puede suplementarse como sea necesario, con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), 15 soluciones de tampón (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina<sup>TM</sup>), elementos en trazas (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo de microgramos), lípidos (tales como ácido linoleico u otros ácidos grasos), y sus vehículos apropiados, y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario, a concentraciones apropiadas, que serán conocidas por los expertos en la técnica.

20 En una realización particular, la célula hospedante de mamífero es una célula CHO, preferiblemente una célula dp12.CHO, y un medio adecuado contiene un componente de medio basal tal como una formulación basada en DMEM/HAM F-12 (para la composición de medios DMEM y HAM F12, véase formulación de medios de cultivo en American Type Culture Collection of Cell Lines and Hybridomas. Sexta edición, 1988, páginas 346-349) (la formulación del medio como la descrita en la Patente de EE UU n° 5.122.469 y particularmente apropiada con concentraciones 25 modificadas de algunos componentes tales como aminoácidos, sales, azúcar, y vitaminas, y conteniendo opcionalmente glicina, hipoxantina, y timidina, insulina humana recombinante, peptona hidrolizada, tal como Primatone HS o Primatone RL (Sheffield, Inglaterra)), o el equivalente: un agente protector de la célula, tal como Pluronic F68 o el equivalente polioli plurónico:Gentamicina, y elementos en trazas.

30 Las glicoproteínas de la presente invención pueden ser producidas por células en crecimiento que expresan la proteína deseada bajo una diversidad de condiciones de cultivo celular. Por ejemplo, los procedimientos de cultivo celular para producción de proteínas a gran o pequeña escala, son potencialmente útiles dentro del contexto de la invención. Pueden utilizarse procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, un biorreactor de lecho fluidificado, 35 un biorreactor de fibra hueca, cultivo en botellas giratorias, o un sistema de biorreactor de tanque en agitación, en los dos últimos sistemas, con o sin microvehículos, y operarse alternativamente en un lote, alimentación en lotes, o de modo continuo.

40 En una realización preferida, el cultivo celular de la presente invención se realiza en un sistema de biorreactor de tanque de agitación, y se emplea un procedimiento de alimentación en lotes. En el cultivo de alimentación en lotes preferido, las células hospedantes de mamífero y el medio de cultivo se ponen inicialmente en un vaso de cultivo, y se añaden, continuamente o con discretos incrementos, nutrientes adicionales al cultivo durante el crecimiento, con o sin recolección periódica de células y/o de producto, antes de finalizar el cultivo. El cultivo de alimentación en lotes puede incluir, por ejemplo, un cultivo de alimentación en lotes semi-continuo, en el que periódicamente, 45 el cultivo completo (incluyendo las células y el medio), se recolecta y se reemplaza con medio fresco. El cultivo de alimentación en lotes se distingue del cultivo en un lote simple, en que todos los componentes del cultivo celular (incluyendo las células y los nutrientes del cultivo), se ponen en el vaso de cultivo al comienzo del proceso de cultivo. El cultivo de alimentación en lotes puede también distinguirse del cultivo en perfusión en que el sobrenadante no se recolecta del vaso de cultivo durante el proceso (en el cultivo de perfusión, las células están limitadas en el cultivo, por 50 ejemplo, mediante filtración, encapsulación, anclaje a microtransportadores, etc, y el medio de cultivo es continuamente o intermitentemente introducido y recolectado del vaso de cultivo).

Además, las células del cultivo pueden propagarse según cualquier esquema o rutina que pueda ser adecuada para la célula hospedante particular y en la que se contemple un plan de producción particular. De este modo, la presente 55 invención contempla un procedimiento de cultivo de una etapa o de múltiples etapas. En un cultivo de una única etapa, las células hospedantes se inoculan en un ambiente de cultivo y los procesos de la presente invención se emplean durante una fase de producción única del cultivo celular. Alternativamente, se contempla un cultivo con múltiples etapas. En el cultivo de múltiples etapas, pueden cultivarse las células en un número de etapas o fases. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en una primera etapa o fase de crecimiento del cultivo, en el que las células, posiblemente 60 recolectadas desde el almacenamiento, se inoculan en un medio adecuado para promover el crecimiento y una alta viabilidad. Las células pueden mantenerse en la fase de crecimiento durante un periodo de tiempo, mediante la adición de medio fresco al cultivo de las células hospedantes.

Según un aspecto preferido de la invención, se proponen condiciones de cultivo de alimentación en lotes o continua, 65 para aumentar el crecimiento de las células de mamífero en la fase de crecimiento del cultivo celular. En la fase de crecimiento, las células se cultivan bajo unas condiciones, y durante un periodo de tiempo, que están maximizados para el crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto (dO<sub>2</sub>) y similares, son las utilizadas con el hospedante particular, y serán aparentes a los expertos en la técnica. Generalmente, el pH se ajusta

## ES 2 324 046 T3

a un nivel entre alrededor de 6,5 y 7,5, utilizando bien un ácido (por ejemplo CO<sub>2</sub>) o bien una base (por ejemplo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o NaOH). Un intervalo adecuado de temperatura para cultivar células de mamífero tales como las células CHO, está entre alrededor de 30 y 38°C, y un adecuado dO<sub>2</sub> está entre 5-90% de la saturación del aire.

5 En un estadio particular, las células pueden utilizarse para inocularlas en una fase o etapa de producción del cultivo celular. Alternativamente, como se ha descrito anteriormente, la fase o etapa de producción puede ser la continuación de la fase o etapa de inoculación o crecimiento.

10 Según la presente invención, se controla el ambiente de cultivo celular durante la fase de producción del cultivo celular. Según el proceso de la presente invención, se manipulan los factores que afectan la productividad específica de la célula de las células de mamífero hospedantes, de tal modo que se consigue el contenido deseado de ácido siálico en la glicoproteína resultante. En particular, se controlan los factores que aumentan la productividad específica de la célula durante la fase de producción del proceso de cultivo celular, de tal forma que la glicoproteína resultante tiene el contenido deseado de ácido siálico.

15 En un aspecto preferido, la fase de producción del proceso de cultivo celular es precedida por una fase de transición del cultivo celular, en la que se establecen los parámetros para la fase de producción del cultivo celular.

20 Según un aspecto de la presente invención, se manipula la concentración de un estimulador de la transcripción, tal como un ácido alcanoico, para afectar la productividad específica de célula, y de esta forma el contenido en ácido siálico resultante de la glicoproteína producida por la célula hospedante. El ácido alcanoico puede ser uno cualquiera de un cierto número de ácidos alcanoicos de cadena sencilla o ramificada que estimulan la transcripción de proteínas de mamífero. En una realización preferida, el ácido alcanoico es ácido butírico y, en especial, su sal, butirato sódico.

25 Según la presente invención, la concentración de butirato sódico se controla, para controlar la productividad específica de la célula. Se utilizan concentraciones de butirato sódico de entre 0,1 y 20 mM, y se modifican según la particular célula hospedante que se está cultivando, y según el contenido de ácido siálico deseado en la glicoproteína producida. Para generar una proteína con el contenido en ácido siálico deseado, se selecciona una concentración de butirato sódico que proporcione la productividad específica de la célula más elevada, con el perfil de ácido siálico más aceptable. Así, según la presente invención, se selecciona una concentración de un estimulador de la transcripción tal como el butirato sódico, para obtener el contenido de ácido siálico deseado.

30 Para aumentar el contenido de ácido siálico de la glicoproteína madura, generalmente se utilizan concentraciones menores del estimulador de la transcripción. La concentración menor proporciona una estimulación de la transcripción, pero mantiene una productividad específica de la célula menor, mientras que mantiene la viabilidad del cultivo de la célula hospedante. Generalmente, se utilizan concentraciones del estimulador de la transcripción, tal como el butirato sódico, de entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 8 mM. Más preferiblemente, se utilizan concentraciones entre alrededor de 1,0 y 6,0 mM. En una realización particular, se utiliza alrededor de 6 mM de butirato sódico. En otra realización se utiliza alrededor de 1 mM de butirato sódico.

40 En otra realización, se produce una glicoproteína con un nivel de ácido siálico disminuido. Según este aspecto de la presente invención, las células de mamífero se cultivan bajo condiciones tales que la productividad específica de la célula se aumenta. Según este aspecto de la presente invención, se selecciona una concentración de ácido alcanoico u otro estimulador de la transcripción apropiado, de tal forma que el aumento de productividad específica de la célula genera una proteína con el perfil deseado de ácido siálico. En una realización preferida, la concentración del ácido alcanoico o de su sal está entre aproximadamente 5 y 20 mM, y más preferiblemente entre alrededor de 6 mM y 12 mM. En una realización particular, la concentración de butirato sódico está alrededor de 12 mM.

50 Para determinar la concentración apropiada del estimulador de la transcripción, tal como ácido alcanoico o de su sal de sodio, puede hacerse referencia a la Figura 2, así como a la Tabla I *más adelante*, en el Ejemplo I. Según la presente invención, las concentraciones menores de butirato generalmente dan como resultado una menor productividad específica de la célula. Según la presente invención, se seleccionan las concentraciones de butirato sódico, teniendo en mente otros parámetros del proceso, tales como la osmolalidad de la fase de producción. Como se discute más adelante, la osmolalidad puede afectar la productividad específica de la célula. Las concentraciones de butirato se seleccionan teniendo en cuenta la osmolalidad particular que debe mantenerse durante la fase de producción.

55 Alternativamente, para otras células hospedantes de mamífero y otras glicoproteínas, pueden prepararse pequeños ensayos de cultivo para tasar la producción de glicoproteína producida, es decir, puede determinarse la productividad específica de la célula y puede utilizarse el contenido en ácido siálico resultante para preparar una tabla y una figura similares, apropiadas para la particular célula hospedante que está siendo cultivada, teniendo en mente que la disminución de la producción específica de la célula, lleva a un aumento en el contenido de ácido siálico de la glicoproteína producida. El ácido alcanoico, o su sal, tal como butirato sódico, u otro estimulador de la transcripción apropiado se añade al cultivo de la célula hospedante, al mismo tiempo, o alrededor del mismo, en que se ha iniciado la fase de producción del cultivo celular. Convenientemente, se emplea una fase de transición, durante el proceso de cultivo celular, que precede a la fase de producción, en la que se discuten y se establecen las condiciones de cultivo celular, para conseguir la productividad específica de la célula deseada, y de este modo el perfil de glicoproteína deseada.

## ES 2 324 046 T3

El ácido alcanico o su sal se añade mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización preferida, el butirato sódico se añade en lote al sistema de cultivo de alimentación en lotes, con o sin otros nutrientes apropiados, como se describe aquí, o mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica de cultivo de células de mamífero.

Según la invención, la osmolalidad del ambiente del cultivo celular se controla, además de los factores descritos anteriormente, para regular la extensión de la sialilación de la glicoproteína madura. En una realización, la osmolalidad se controla para controlar el contenido de ácido siálico de la proteína madura, independientemente de otros factores, que afectan a la productividad específica de la célula. En otra realización, la osmolalidad se controla, además de controlar otros factores que afectan a la productividad específica de la célula. En una realización preferida, se controlan tanto la osmolalidad como la concentración de ácido butírico.

La osmolalidad del ambiente del cultivo celular se controla para producir el balance deseado entre la productividad específica de la célula y el perfil de ácido siálico de la glicoproteína resultante. Generalmente, la productividad específica de la célula aumenta cuando se aumenta la osmolalidad. Se selecciona una osmolalidad que produce una proteína con el contenido deseado de ácido siálico, teniendo en mente que el aumento en la osmolalidad generalmente lleva al aumento en la tasa de producción de la proteína particular. Para disminuir la tasa de producción y aumentar el contenido de ácido siálico de la glicoproteína, la osmolalidad generalmente se mantiene a un nivel menor para el tipo particular de célula que está siendo cultivada.

Para el cultivo de células de mamífero, la osmolalidad del medio de cultivo generalmente es de alrededor de 290-330 mOsm. Sin embargo, los aumentos en la osmolalidad generalmente llevan al aumento en la tasa de producción de proteínas. Se selecciona una osmolalidad de tal modo que la tasa de producción se corresponde con el perfil del producto deseado. Para aumentar el contenido de ácido siálico, la tasa de producción se disminuye y la osmolalidad se mantiene generalmente dentro de un estrecho margen, teniendo en mente la particular célula hospedante que se está cultivando. Una osmolalidad en el intervalo de desde alrededor de 250 mOsm hasta alrededor de 450 mOsm es apropiada para aumentar el contenido en ácido siálico. Más preferiblemente, la osmolalidad se mantiene entre alrededor de 300 y 450 mOsm, según este aspecto de la invención, y más preferiblemente entre alrededor de 350 y 400 mOsm, y más preferiblemente alrededor de 400 mOsm.

Para un contenido menor en ácido siálico, se selecciona una osmolalidad que proporciona un aumento de la tasa de producción. Según este aspecto de la invención, la osmolalidad se mantiene entre alrededor de 350 - 600 mOsm, y está preferiblemente entre alrededor de 450 - 550 mOsm, según este aspecto de la invención.

Los expertos en la técnica reconocerán que la osmolalidad de los medios depende de la concentración de partículas osmóticamente activas en el líquido de cultivo, y que un número de variables presentes en un medio de cultivo de células de mamífero impactan a la osmolalidad. La osmolalidad inicial del medio de cultivo se determina por la composición del medio de cultivo. La osmolalidad puede medirse utilizando un osmómetro como el que vende Fisher Scientific, Pittsburg, Pennsylvania, bajo el nombre de OSMETTE (o el modelo Osmette 2007, disponible de Precision Systems, Inc., Natick MA), por ejemplo. Para conseguir una osmolalidad en el intervalo deseado, puede ajustarse la concentración de diversos constituyentes en el medio de cultivo.

Los solutos que pueden añadirse al medio de cultivo para que aumente su osmolalidad incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, proteínas animales hidrolizadas tales como las peptonas, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, sales, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos y similares. En una realización, la osmolalidad se controla mediante la adición de una peptona al cultivo celular, junto con otros componentes del medio de cultivo durante un procedimiento de cultivo celular de alimentación en lotes.

Según la presente invención, la osmolalidad se mantiene o se ajusta al intervalo deseado, a través de la adición de, por ejemplo, una formulación de medio de base que incluye aminoácidos, varias sales (por ejemplo, NaCl), además de una peptona. En una realización preferida, el medio de cultivo se suplementa con, por ejemplo, un medio de cultivo de base que contiene un exceso de aminoácidos (véase, por ejemplo, el "Super" medio de la Patente de EE UU N° 5.122.469), glucosa, y una peptona.

Debe apreciarse, sin embargo, que pueden modificarse la(s) concentración(es) de otros constituyentes del medio de cultivo, para conseguir un intervalo de osmolalidad como el que se ha establecido anteriormente. Controlando de forma intermitente o continuamente la concentración de glucosa (la fuente de energía primaria), por ejemplo, en el medio de cultivo, puede mantenerse la osmolalidad del medio alrededor del intervalo deseado especificado, a lo largo del cultivo. Controlar la concentración de glucosa sirve para proporcionar una fuente de carbono adecuada para las células, y simultáneamente para controlar la producción de ácido láctico por las células hospedantes. Esto es ventajoso porque limita la disminución del pH en el medio de cultivo, que necesita la adición de un neutralizante (por ejemplo, una base tal como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o NaOH), lo que ocasiona un aumento de la osmolalidad.

El medio puede suplementarse para mantener la osmolalidad dentro de los márgenes apropiados según el esquema que esté siendo utilizado para mantener el cultivo celular. En una realización preferida, el sistema de cultivo es un sistema de cultivo de alimentación en lotes, y el medio se suplementa en lotes de alimento durante la fase de producción del cultivo celular. Adicionalmente, el medio puede suplementarse durante la fase de producción como se describe más adelante.

Alternativamente, puede llevarse a cabo el muestreo intermitente exterior del medio de cultivo. La osmolalidad del medio de cultivo puede modificarse mediante la modulación de una solución de alimento según se requiera.

Los expertos en la técnica entenderán que los procesos de cultivo celular de la presente invención se seleccionan para alcanzar el nivel deseado de sialilación de la proteína producida. Otros parámetros del proceso, además de los descritos aquí, que influyen en el grado de sialilación, incluyen el nivel de oxígeno y el nivel de glucosa. La densidad del cultivo, el tiempo y las condiciones de almacenamiento tales como la temperatura, también influyen en la sialilación. La presente invención pretende incluir todos estos parámetros del proceso que son adicionalmente los más adecuados para aumentar la sialilación.

### III. Recuperación de la glicoproteína

Después de la fase de producción del polipéptido, el polipéptido de interés se recupera del medio de cultivo, utilizando métodos que están bien establecidos en la técnica.

El polipéptido de interés preferiblemente se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también puede recuperarse de lisados de las células hospedantes.

Como una primera etapa, el medio de cultivo o el lisado se centrifuga para eliminar restos celulares en partículas. Después el polipéptido se purifica de las proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siendo ejemplo adecuados los siguientes procedimientos de purificación: mediante fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol, HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía: SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columna de Sepharose A para eliminar contaminantes tales como IgG. Un inhibidor de proteasa, tal como fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación. Un experto en la técnica podrá apreciar que los métodos de purificación adecuados para el polipéptido de interés pueden requerir modificaciones debidas a los cambios en el carácter del polipéptido cuando se expresa en un cultivo celular recombinante.

En el contexto de la presente invención son especialmente preferidos los procesos y técnicas de purificación que seleccionan los carbohidratos de la invención. Las glicofomas deseadas de la presente invención pueden enriquecerse en el contenido de ácido siálico por molécula mediante, por ejemplo, cromatografía en gel suave de intercambio iónico o HPLC utilizando resinas de intercambio catiónico o aniónico, en las que se recolecta más fracción ácida.

### IV. Análisis de la glicoproteína

La parte del complejo carbohidrato de la glicoproteína producida mediante los procedimientos de la presente invención puede analizarse fácilmente si se desea, mediante técnicas convencionales de análisis de carbohidratos. Así, por ejemplo, técnicas como el blotting de lectina, bien conocida en la técnica, revela las proporciones de manosa u otros azúcares tal como la galactosa, en posición terminal. La terminación de los oligosacáridos mono-, bi-, tri- o tetra-antenarios con ácidos siálicos puede confirmarse mediante la liberación de azúcares de la proteína, utilizando hidracina anhidra o métodos enzimáticos, y fraccionamiento de oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio iónico o de exclusión de tamaño, u otros métodos bien conocidos en la técnica. También puede medirse el pl de la glicoproteína, antes o después del tratamiento con neuraminidasa para eliminar los ácidos siálicos. Un aumento en el pl después del tratamiento con neuraminidasa indica la presencia de ácidos siálicos en la glicoproteína.

Las estructuras de los carbohidratos de la presente invención aparecen en las proteínas expresadas, como carbohidratos ligados a N o ligados a O. Los carbohidratos ligados a N o ligados a O difieren primariamente en sus estructuras nucleares. La glicosilación ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a través de GlcNAc a un residuo de asparagina en la cadena peptídica. Todos los carbohidratos ligados a N contienen una estructura nuclear común Man1-6(Man1-3)ManB1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -R. De este modo, en la estructura nuclear descrita, R representa un residuo de asparagina de la proteína producida. La secuencia peptídica de la proteína producida contendrá una asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina, y asparagina-X-cisteína, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina. Los carbohidratos ligados a O, por el contrario, se caracterizan por una estructura nuclear común, que es el GalNAc ligado al grupo hidroxilo de una treonina o una serina. De los carbohidratos ligados a N y ligados a O, los más importantes son los carbohidratos ligados a N y a O complejos. Tales carbohidratos complejos contendrán varias estructuras antenarias. Las estructuras exteriores mono-, bi-, tri- y tetra-, son importantes por la adición de ácidos siálicos terminales. Dichas estructuras de cadena exterior proporcionan lugares adicionales para los azúcares específicos y para uniones que comprenden los carbohidratos de la presente invención.

Los carbohidratos resultantes pueden analizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo aquellos métodos aquí descritos. Se conocen varios métodos en la técnica para el análisis de la glicosilación y son útiles en el contexto de la presente invención. Tales métodos proporcionan información en cuanto a la identidad y la composición de los oligosacáridos ligados al péptido. Métodos para el análisis de carbohidratos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a cromatografía de lectina; HPAEC-PAD, que utiliza cromatografía de intercambio iónico de pH alto para separar los oligosacáridos en base a su carga; NMR; espectrometría de masas, HPLC, GPC; análisis de composición de monosacáridos; digestión enzimática secuencial.

## ES 2 324 046 T3

Adicionalmente, se conocen métodos de liberación de oligosacáridos: Estos métodos incluyen 1) enzimático, que se realiza habitualmente utilizando péptido-N-glucosidasa F/endo- $\beta$ -galactosidasa; 2) eliminación de  $\beta$  utilizando ambiente alcalino fuerte, para liberar principalmente estructuras ligadas a O; y 3) métodos químicos utilizando hidracina anhidra para liberar tanto los oligosacáridos ligados a N como los ligados a O.

El análisis puede realizarse utilizando las siguientes etapas:

1. Diálisis de la muestra contra agua desionizada, para eliminar las sales de la solución de tampón, seguida de liofilización
2. Liberación de cadenas de oligosacáridos intactas con hidracina anhidra
3. Tratamiento de las cadenas de oligosacáridos intactas con HCl metanólico anhidro para liberar monosacáridos individuales como los derivados O-metilo
4. N-acetilación de cualquier grupo de aminoácidos primarios
5. Derivación para proporcionar per-O-trimetilsilil metil glucósidos
6. Separación de esos derivados, mediante GLC capilar (cromatografía de gas-líquido), sobre una columna CP-SIL8
7. Identificación de derivados de glucósido individuales mediante tiempo de retención de GLC y espectroscopia de masa, comparada con estándares conocidos
8. Cuantificación de derivados individuales mediante FID con un estándar interno (13-O-metil-D-glucosa).

Los azúcares neutros y amino pueden determinarse mediante cromatografía de intercambio iónico de alta resolución, combinada con detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD Carbohydrate System. Dionex Corp.). Por ejemplo, los azúcares pueden liberarse mediante hidrólisis en ácido trifluoroacético al 20% (v/v) a 100°C durante 6 horas. Los hidrolizados se secan después mediante liofilización o con un Speed-Vac (Savant Instruments). Los residuos se disuelven después en una solución de acetato sódico trihidratado al 1%, y se analizan en una columna HPLC-AS6 como describen Anumula *et al.*, (Anal. Biochem. 195:269-280 (1991)).

El ácido siálico puede determinarse separadamente mediante el método colorimétrico de Yao *et al.* (Anal. Biochem. 179:332-335 (1989)), en muestras triplicadas. En una realización preferida, se utiliza el ácido tiobarbitúrico (TBA) de Warren L., J. Biol. Chem. 238:(8) (1959).

Alternativamente, puede realizarse análisis de carbohidratos mediante inmunoblot. Según este procedimiento, se detectan los carbohidratos unidos a proteína utilizando un sistema de detección de glicano comercial (Boehringer), que se basa en el procedimiento de inmunoblot oxidativo descrito por Haselbeck y Hosel [Haselbeck *et al.* Glycoconjugate J., 7:63 (1990)]. Se sigue el protocolo de tinción recomendado por el fabricante, excepto en que la proteína se trasfiere a una membrana de difluoruro de polivinilideno en vez de a una membrana de nitrocelulosa, y las soluciones de tampón bloqueantes contienen albúmina sérica bovina al 5% en solución de tampón tris 10 mM, pH 7,4, con cloruro sódico al 0,9%. La detección se realiza con anticuerpos anti-digoxigenina ligados a un conjugado de fosfatasa alcalina (Boehringer), a una dilución 1:1000 en solución salina tamponada con tris, utilizando los sustratos de la fosfatasa, tetrazolio cloruro de 4-nitroazul al 0,03% (peso/volumen) y 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato al 0,03% (peso/volumen) en solución de tampón tris 100 mM, pH 9,5, que contiene cloruro sódico 100 mM y cloruro de magnesio 50 mM. Las bandas de proteína que contienen carbohidratos se visualizan generalmente en alrededor de 10 ó 15 minutos.

El carbohidrato también puede analizarse mediante digestión con péptido-N-glucosidasa. Según este procedimiento, el residuo se suspende en 14  $\mu$ l de una solución de tampón que contiene SDS al 0,18%, beta-mercaptoetanol 18 mM, fosfato 90 mM. EDTA 3,6 mM, a pH 8,6, y se calienta a 100°C durante 3 minutos. Después de enfriarlo a temperatura ambiente, la muestra se divide en dos partes iguales. Una parte alícuota no se trata más, y sirve como un testigo. La segunda fracción se ajusta a alrededor de 1% de detergente NP-40, seguido de 0,2 unidades de péptido-N-glucosidasa F (Boehringer). Ambas muestras se calientan a 37°C durante 2 horas y se analizan mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

### V. Quimeras de receptor del factor de necrosis tumoral e inmunoglobulina

En una realización preferida, los procedimientos de la presente invención se utilizan para producir quimeras de receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) e inmunoglobulina (Ig). Especialmente preferida entre esta clase de proteínas quiméricas es la TNFR soluble de tipo I IgG<sub>1</sub>. Las quimeras TNFR1-IgG<sub>1</sub> producidas, son útiles en el tratamiento o el diagnóstico de muchas enfermedades o desórdenes mediados por TNF o relacionados con TNF. El término "tratamiento" en este contexto, incluye tanto la profilaxis (prevención), la supresión (por ejemplo, de un síntoma), como el tratamiento de una enfermedad existente. Las condiciones patológicas asociadas con TNF incluyen, pero no se limitan a bacteriemias por gram negativos y gram positivos, shock endotóxico, fenómenos de rechazo de trasplan-

tes, artritis reumatoide, lupus eritematoso, enfermedad de Crohn y otras enfermedades autoinmunes e inflamatorias asociadas con TNF.

Las preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> de la presente invención son útiles, en general, en aquellas indicaciones en las que se han encontrado útiles anticuerpos monoclonales contra TNF. Por ejemplo, en modelos con animales, se ha encontrado que anticuerpos monoclonales contra TNF-alfa tienen efecto protector cuando se emplean profilácticamente (Tracey, K.J. *et al.*, (1987) *Nature* 330:662). En un estudio clínico en fase I reseñado por Exley, A.R. *et al.*, (1990) *Lancet* 335:1275, se encontró que un anticuerpo monoclonal murino contra TNF-alfa humana recombinante era seguro cuando se administraba a pacientes humanos con shock séptico grave. TNFR1-IgG<sub>1</sub> se utiliza adecuadamente en el tratamiento de artritis reumatoide, así como en shock séptico.

En un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con TNF, se administra una cantidad terapéuticamente activa de TNFR1-IgG<sub>1</sub> a un sujeto que necesita un tratamiento de este tipo. El sujeto preferido es un ser humano.

Una cantidad eficaz de una preparación de glicofoma TNFR1-IgG<sub>1</sub> de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o trastorno está en el intervalo de dosis de 0,01-100 mg/paciente, preferiblemente 1 mg-75 mg/paciente y, lo más preferiblemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/paciente.

Para la administración, la preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> debería formularse en una composición farmacéutica o terapéutica apropiada. Una composición de este tipo contiene, típicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz de la preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> y un excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa o agua. Composiciones pueden comprender también agentes estabilizantes específicos tales como azúcares, incluidos manosa y manitol, y anestésicos locales para composiciones inyectables, incluida, por ejemplo, lidocaína.

La presente invención proporciona composiciones que comprenden, además, una cantidad terapéuticamente activa de un ingrediente activo adicional tales como anticuerpos monoclonales (p. ej. anticuerpos anti-TNF, anticuerpos contra Mac1 o LFA 1) u otros receptores asociados con la producción de TNF, p. ej. receptores de IL-1 o IL-2, etc.

Una composición terapéutica preferida para una terapia sencilla o combinada, tal como antes, comprende una nueva preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> de esta invención que exhibe un aclaramiento prolongado a partir de la sangre, al tiempo que conserva una actividad funcional significativa. Una semivida funcional prolongada de este tipo permite una administración simplificada de dosis de bolo y contribuye a potencia *in vivo*. Quimeras de TNFR1-IgG<sub>1</sub> preferidas en la composición terapéutica incluyen la TNFR1-IgG<sub>1</sub> y preparaciones descritas en esta memoria, por ejemplo:

- (1) preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que comprenden un oligosacárido complejo que termina con uno o más residuos de un ácido siálico;
- (2) preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub>, en donde el intervalo del punto isoeléctrico, pI, de la preparación está entre 5,5 y 7,5, según se determina por cromatoenfoque, en que el pI es sensible al tratamiento con neuroaminidasa;
- (3) preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que tienen aproximadamente 1-2 moles de residuos de N-acetilglucosamina expuestos por mol de proteína;
- (4) preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que tienen una relación molar de ácido siálico a proteína de aproximadamente 4-7, en especial aproximadamente 5-6;
- (5) preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que tienen una relación molar de ácido siálico a N-acetilglucosamina de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,5, y más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,45.

Vías de administración para las composiciones terapéuticas individuales o combinadas de la presente invención incluyen vías estándares tales como, por ejemplo, infusión intravenosa o inyección en bolo.

También se proporciona el uso de una preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> de esta invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano o animal.

Habiendo ahora descrito, de forma general, la invención, la misma resultará más fácilmente comprensible haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

## 65 Ejemplos

Los efectos biológicos del TNF-alfa y del TNF-beta están mediados a través de receptores específicos (Dambic *et al.* (1990) *Cytokines*, 2:231). La clonación molecular ha demostrado la existencia de dos tipos diferentes de receptores

de TNF (TNFR) con unas masas moleculares aparentes de 55 kD (tipo 1) (Schall *et al.*, (1990) Cell 61:361) y 75 kD (tipo 2) (Smith *et al.* (1990) Science 248:1019), cada uno de los cuales se une naturalmente tanto al TNF alfa como al TNF beta (Loetscher *et al.* (1990) Cell 61:351; Shall *et al.* (1990) Cell 61:361; Kohno *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8331). Las partes extracelulares de ambos receptores se encuentran naturalmente como proteínas de unión al TNF soluble (Khono *et al.*, *arriba*). Se han creado agonistas de TNF, que bloquean los efectos deletéreos del TNF en diversos eventos inmunes e inflamatorios (Poppel *et al.*, (1991) J. Exp. Med., 174:1483-1489; Ulich (1993) Am. J. Path., 142:1335-1338; Howard, O.M.Z., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2335-2339; Wooley, P.H., (1993) J. Immunol. 151:6602-6607). Uno de tales agonistas (Werner *et al.*, (1991) J. Cell Biochem. Abstracts, 20th annual meeting, pág. 15), combina el dominio extracelular del TNFR humano de tipo 1 de 55 kD, con una parte de las regiones bisagra y Fc de la cadena pesada de la Inmunoglobulina G1.

En estos Ejemplos, se cultivan células de mamífero transfectadas con un vector que contiene el cDNA que codifica la quimera TNFR1-IgG<sub>1</sub>.

## 15 Métodos

### A. Línea celular

La línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) utilizada como célula hospedante de mamífero, se derivó de la CHO-K1 (ATCC N° CCL61 CHO-K1). Una línea celular CHO-K1 mutante deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR<sup>-</sup>), denominada CHO-K1 DUX-B11 (DHFR<sup>-</sup>) (obtenida del Dr. L. Chasin de la Universidad de Columbia: Simonsen, C.C., y Levinson, A.D., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-2499; Urlaub G., y Chasin L., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220), se utilizó para obtener una línea celular con un requerimiento reducido de insulina, para transfección con el vector que contiene el cDNA de la pre-pro-insulina (Sures *et al.*, (1980) Science, 208:57-59). El clon seleccionado designado como dp 12.CHO requiere glicina, hipoxantina, y timidina para el crecimiento, verificando así el genotipo DHFR.

### B. Construcción de la Quimera TNFR Soluble de Tipo 1-IgG<sub>1</sub>

Se construyó una quimera TNFR soluble de tipo 1-IgG<sub>1</sub> mediante fusión génica del dominio extracelular del TNFR de tipo 1 humano, con la región bisagra y los dominios C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 de la cadena pesada de IgG<sub>1</sub> (de aquí en adelante denominada TNFR1-IgG<sub>1</sub>).

La secuencia de DNA que codifica el TNFR de tipo 1 (véase Loetscher *et al.*, *arriba*) se obtuvo del plásmido pRK-TNF-R [Schall *et al.*, Cell 61, 361 (1990)]. Para construir este plásmido inicial, un clon de cDNA de placenta de 2,1 kb (Schall *et al.*, *arriba*), se insertó en el vector de expresión de mamífero pRK5, cuya construcción se describe en el Documento EP Pub. N° 307.247, publicado el 15 de Marzo de 1989. Este cDNA comienza en la posición del nucleótido 64 de la secuencia descrita por Loetscher *et al.*, con la metionina de iniciación, 118 pares de bases aguas abajo.

La fuente de la secuencia de codificación de IgG<sub>1</sub> fue el CD4-IgG, en el plásmido de expresión pRKCD<sub>4</sub>F<sub>C1</sub> [Capon, D.J. *et al.*, Nature 337, 525 (1989); Bym *et al.*, Nature 344, 667 (1990), que contiene una secuencia de cDNA que codifica un polipéptido híbrido que consiste en los residuos 1-180 de la proteína CD4 humana madura (dos dominios variables del extremo N de CD4), fusionados a las secuencias de IgG<sub>1</sub> humana, comenzando en el ácido aspártico en la posición 216 (tomando el aminoácido 114 como el primer residuo de la región constante de la cadena pesada [Rabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest 4ª edición (1987)], que es el primer residuo de la bisagra de IgG<sub>1</sub>, después del residuo de cisteína implicado en la unión de las cadenas pesada y ligera), y finalizando con el residuo en la posición 441, para incluir los dominios C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 de la IgG<sub>1</sub>.

El TNFR1-IgG<sub>1</sub> se construyó mediante generación de fragmentos de restricción de los plásmidos pRK-TNF-R y pRKCD<sub>4</sub>F<sub>C1</sub>, y ligándolos después, utilizando mutagénesis delecional, de tal forma que el residuo de treonina en la posición 171 de los TNFR maduros se yuxtapone al residuo de ácido aspártico en la posición 216 de la cadena pesada de la IgG<sub>1</sub> [Rabat *et al.*, *arriba*]. El plásmido resultante pRKTNFR-IgG contiene la secuencia de codificación de TNFR<sub>1</sub> IgG<sub>1</sub> de longitud completa.

### C. Cultivo celular

El gen que codifica el TNFR soluble de tipo 1-IgG<sub>1</sub>, se introdujo en células dp12.CHO mediante transfección. Esto se realizó utilizando la técnica del fosfato cálcico para introducción de DNA en células de mamífero. Dos días después de la transfección las células se trataron con tripsina, y se replantaron en un medio selectivo (Ham's F12 DMEM libre de glicina-hipoxantina y timidina, 1,1 (volumen/volumen, con suero dializado al 2%). Los aislados subsiguientes se cribaron para secreción de TNFR1-IgG<sub>1</sub>. Los clones que expresaban TNFR1-IgG<sub>1</sub> se amplificaron en metotrexato para proporcionar clones de elevada expresión, y después se adaptaron a medio libre de suero. Estas células estaban bajo una presión selectiva continuada, hasta que se transfirieron a un medio no selectivo, para el crecimiento y la expansión del inóculo.

Para proporcionar células para la producción de TNFR1-IgG<sub>1</sub>, los cultivos de las poblaciones de células descritas previamente se expandieron a partir de un medio que contenía metotrexato, mediante subcultivos seriados, en vasos

## ES 2 324 046 T3

de volúmenes crecientes para medios de crecimiento que no contenían metotrexato. Para estas etapas del proceso, el medio de crecimiento no selectivo era una formulación basada en DMEM/HAM F-12 (véase Patente de EE. UU. 5.122.469, por ejemplo), con concentraciones modificadas de algunos componentes, tales como glucosa, aminoácidos, sales, azúcar, vitaminas, glicina, hipoxantina, y timidina; insulina humana recombinante, peptona hidrolizada (Primatec HS o Primatone RL), un agente protector celular tal como Pluronic F68 (poliol-plurónico) o un equivalente; Gentamicina, Lípido y elementos en trazas.

Los cultivos se controlaron a  $\text{pH } 7,2 \pm 0,4$  mediante la utilización de gas  $\text{CO}_2$  (ácido) y/o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (base). La temperatura se controló cerca de  $37^\circ\text{C}$  durante el periodo de crecimiento. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 5% de la saturación del aire, mediante mezcla directa del aire con el gas oxígeno.

La osmolalidad durante la fase de expansión del inóculo se mantuvo entre alrededor de 250 mOsm y 350 mOsm.

La fase de crecimiento para cada cultivo fue seguida por una segunda fase o fase de transición en la que los parámetros del cultivo se cambiaron de condiciones óptimas para crecimiento a condiciones de producción. Durante esta fase de transición la temperatura del sistema de cultivo se disminuyó, generalmente a alrededor de entre  $30$  y  $35^\circ\text{C}$ . Se añadió butirato, y se consiguió un cierto intervalo de osmolalidad. El producto acumulado durante esta fase de producción se analizó para el contenido en ácido siálico.

En una organización típica de producción, aproximadamente  $1,2 \times 10^6$  células derivadas de la expansión del inóculo del estadio selectivo, se cultivaron en una fase de crecimiento con una osmolalidad inicial de 300 mOsm. El medio de cultivo se suplementó con trazas de elementos, insulina humana recombinante y peptona hidrolizada. Las células se cultivaron bajo estas condiciones durante 2 días. Al comienzo del tercer día la temperatura del cultivo celular se disminuyó. Simultáneamente, o después del cambio de temperatura, se añadió butirato sódico al cultivo celular, y se alcanzó la osmolalidad de producción deseada mediante la adición de diversos componentes del medio. Las células se cultivaron bajo estas condiciones con alimentación durante 9-10 días. Las células se alimentaron cuando fue necesario con diversos componentes del medio.

La tabla I describe las condiciones de producción de varios procesos de producción.

TABLA I

Versión del proceso	Concentración de butirato (mmol/l)	Osmolalidad en la fase de producción (mOsm/kg)	Productividad específica de célula entre el día 5 y el día 10 (pg/d)	Contenido en ácido siálico de la TNFR1-IgG <sub>1</sub> en el día 10 (mol/mol)	
A	1	360-420	0,6-1,5	6,4-7,2	N=4
B	1	480-510	1,7-2,2	6,0-6,3	N=3
C	6	480	4,8	4,7	N=1
D	6	370-420	2,4-2,8	5,5-5,6	N=3
E	6	350-370	1,4-2,3	5,4-6,3	N=3
F	12	390	4,0	5,3	N=1
G	12	490-510	2,9-5,2	4,0-5,2	N=4
H	12	400-430	2,0-2,8	5,8-6,0	N=3
I	12	370-380	2,0-2,2	5,5-5,9	N=3

### D. Recuperación de la TNFR-IgG

La quimera TNFR1-IgG<sub>1</sub> se purificó hasta más del 95% de homogeneidad mediante cromatografía de afinidad sobre Proteína A de *Staphylococcus aureus* inmovilizada, como describieron Capon *et al.*, Arriba.

## E. Análisis de Carbohidratos

El contenido en ácido siálico se analizó mediante el método de Warren, L. (1959), J. Biol. Chem. 234:1971-1975.

5 *Resultados*

La productividad específica de la célula para cada uno de los cultivos de producción descritos en la Tabla I se dibujó en un gráfico contra el contenido de ácido siálico del producto recolectado. Los resultados se presentan en la Figura 1. El contenido más elevado de ácido siálico se observó cuando los parámetros del proceso se mantuvieron a una osmolalidad de producción de entre alrededor de 360 y 420 mOsm, y a una concentración de butirato de alrededor de 1 mM. El contenido de ácido siálico podía controlarse sobre un amplio intervalo de valores, ajustando los parámetros del proceso.

15 *Ejemplo II*

Se determinó la farmacocinética en plasma, vidas medias y/o tasas de aclaramiento de diferentes preparaciones. Las preparaciones que tenían un mayor contenido en ácido siálico en general exhibían una vida media plasmática aumentada y/o unas tasas de aclaramiento menores, comparadas con las preparaciones que tenían un contenido disminuido de ácido siálico.

20 *Métodos*

Diecisiete ratas macho derivadas de las ratas Sprague-Dawley, que pesaban 272-315 gramos, se asignaron de forma randomizada a uno de los tres grupos de tratamiento con proteínas de fusión TNFR1-IgG<sub>1</sub> (N = 5 ó 6 por grupo). A los animales se les inyectó intravenosamente una dosis nominal de 5 mg/kg del material de ensayo, a través de una cánula en la vena femoral. Los materiales de ensayo elegidos incluían dos preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que procedían de un proceso en el que la concentración de butirato durante la fase de producción era de 6 mM, y la osmolalidad durante la fase de producción se mantuvo a alrededor de 400 mOsm. Proceso I, y una tercera preparación de TNFR1-IgG<sub>1</sub> que provenía de un proceso en el que la concentración de butirato era de 12 mM, y la osmolalidad durante la fase de producción era de alrededor de 500 mOsm., Proceso II. Se recolectaron muestras de sangre de dos ml en EDTA (8,5%), pre-dosis, y a 5 minutos, y a 2, 6, 10, 24, 34, 48, 56, 72, 96 y 120 horas post-dosis. Las muestras de sangre se centrifugaron, se recolectó el plasma, y las muestras se analizaron para la concentración de la proteína de fusión TNFR1-IgG<sub>1</sub>.

Se utilizaron un ensayo inmunológico ligado a enzima y un ensayo de unión biológico (ELIBA), para cuantificar la TNFR1-IgG<sub>1</sub> en el plasma de rata. Este ensayo está basado en la capacidad del TNF-alfa conjugado a peroxidasa de rábano picante (TNF-alfa-HRP), para unirse a la parte del receptor de la proteína de fusión TNFR1-IgG<sub>1</sub>. En este ensayo, los fragmentos Fab de cabra anti IgG<sub>1</sub> humana, que recubren los pocillos de placas de microtitulación, se utilizaron para capturar la TNFR1-IgG<sub>1</sub>, mediante la interacción con la parte Fc de la molécula. El TNF-alfa-HRP se añadió a los pocillos y se le permitió unirse a la parte receptor de la TNFR1-IgG<sub>1</sub> capturada. Se determinó la cuantificación mediante la medición del color producido por la reacción de la peroxidasa con el peróxido y con un sustrato orto-fenilenediamino (OPD). El intervalo del ensayo está entre 0,003 y 0,02 mg/ml. La presencia de EDTA en las muestras de plasma demostró no tener efecto sobre la realización del ensayo.

La dosis se normalizó para tener en cuenta las diferencias de concentración en la solución de dosificación. Todos los cálculos se basaron en los datos de concentración contra tiempo, a lo largo del periodo de tiempo de 120 horas. El área truncada bajo la curva (AUC<sub>0-120</sub>), se calculó utilizando la regla trapezoidal. y el aclaramiento truncado normalizado por peso (CL<sub>0-120</sub>/W) se calculó como dosis/AUC<sub>0-120</sub>.

50 *Resultados*

Las tasas de aclaramiento variaron dependiendo de la versión del proceso utilizado (Proceso I comparado con el Proceso II), y la cantidad de ácido siálico presente en el producto. Las tasas de aclaramiento para animales individuales y las medias y desviaciones estándares resultantes de este estudio se presentan en la Tabla II, más adelante. El Proceso I exhibe una tasa de aclaramiento más lenta y más favorable.

60

65

TABLA II

ACLARAMIENTO 0-120 (mL/hora/kg)			
	Proceso I	Proceso I	Proceso II
5	2,12	2,08	2,144
10	2,03	2,31	2,99
	1,63	2,20	2,61
	1,89	2,22	3,27
15	1,85	1,99	2,82
		1,66	3,42
20	<b>Media</b>	2,08	2,88
	<b>STDEV</b>	0,23	0,45

## Ejemplo III

*Composición de monosacáridos de TNFR1-IgG<sub>1</sub>*

La determinación de la composición de carbohidratos oligosacáridos y la estructura de TNFR1-IgG<sub>1</sub>, preparada como se describió en el Ejemplo I, mostró que el contenido en ácido siálico de las diversas versiones del proceso variaba. El aclaramiento plasmático rápido se asoció con una alta exposición a GlcNAc, menor ácido siálico en las cadenas de oligosacárido y (por inferencia), la accesibilidad de la proteína a los receptores de manosa o galactosa. Un aclaramiento plasmático más lento se asoció con más residuos de ácido siálico terminales.

*A. Fuentes del Material de Ensayo*

La TNFR1-IgG<sub>1</sub> se produjo según los métodos descritos en el Ejemplo 1 más arriba. El material del Proceso I se obtuvo del cultivo celular, utilizando butirato 6 mM y una osmolalidad de alrededor de 400 mOsm durante la fase de producción. El material del Proceso II se obtuvo del cultivo celular, utilizando butirato 12 mM y una osmolalidad de alrededor de 500 mOsm durante la fase de producción.

*B. Métodos*

La liberación de azúcares neutros y amino intactos, se determinó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto pH, combinada con detección amperométrica pulsada. El análisis se realizó utilizando las siguientes etapas:

1. El intercambio de solución de tampón se realizó con TNFR1-IgG<sub>1</sub> (aproximadamente 50 µg/ml), y las muestras de referencia apropiadas, de tal forma que la muestra final contuviera ácido acético al 1%.
2. Aproximadamente 90 µg de TNFR1-IgG<sub>1</sub>, así como los materiales de las muestras de referencia, se congelaron en hielo seco y baño de alcohol, y las muestras congeladas se liofilizaron durante la noche.
3. Las muestras congeladas y secas se reconstituyeron en 500 µl de ácido trifluoroacético y se incubaron a 120°C durante 1 hora.
4. Después de la hidrólisis ácida, la TNFR1-IgG<sub>1</sub> y las muestras de referencia se enfriaron y se evaporaron hasta que estuvieron secas.
5. Las muestras se reconstituyeron con agua hasta una concentración final de aproximadamente 0,6 mg/ml.
6. La separación de los monosacáridos se realizó a temperatura ambiente, mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto pH, con detección amperométrica pulsada, utilizando una columna Dionex Carbo-Pac PA1 (4 x 250 mm) (Dionex Corp., Sunnyvale, CA).
7. La cuantificación de los monosacáridos individuales se hizo mediante comparación con los monosacáridos de referencia.

## C. Resultados

Los contenidos molares relativos de cada monosacárido en las dos preparaciones se muestran en la Tabla III, a continuación.

TABLA III

CONTENIDO MOLAR RELATIVO DE LOS MONOSACÁRIDOS EN DOS PREPARACIONES DE TNFR1-IgG <sub>1</sub>		
Monosacárido	Proceso I	Proceso II
Fucosa	4,3 ± 0,2	4,4
Galactosa	8,5 ± 0,0	4,7
Manosa	12,2 ± 0,6	12,5
N-acetilglucosamina	14,1 ± 0,6	14,3
Ácido siálico	4,9 ± 0,3	3,7 ± 0,3
N-acetilgalactosamina	0,5 ± 0,1	0,3
Razón ácido siálico/GlcNAc	0,35	0,26

Los resultados anteriores demuestran que los parámetros seleccionados para la fase de producción de la glicoproteína afectan a la composición de carbohidratos de la glicoproteína madura. Las preparaciones que tienen un mayor contenido en ácido siálico generalmente exhiben una vida media sérica prolongada.

Las Tablas IV y V, presentadas más adelante, demuestran la composición de carbohidratos de las cadenas laterales de oligosacáridos de las preparaciones de la quimera TNFR1-IgG<sub>1</sub>, producidas bajo las condiciones del proceso I y del proceso II. La Tabla V presenta datos para carbohidratos en la parte del receptor de la molécula quimérica, substrayendo el lugar de glicosilación F<sub>c</sub>.

TABLA IV

	PI	PI	PI	PI	PII	PII
Ácido siálico	5,8	5,8	5,7	5,8	3,7	3,5
Fucosa	4,0	4,0	3,6	4,1	4,4	4,3
GalNAc	0,3	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4
GlcNAc	12,9	15,0	14,8	14,3	14,3	14,4
Gal	7,4	7,6	7,1	7,0	4,7	4,1
Man	12,0	12,0	10,0	12,0	12,5	11,9
Razón SA/GlcNAc	0,45	0,39	0,39	0,41	0,26	0,24

TABLA V

	PII	PII	PI	PI
5 Moles expuestos GlcNAc por mol	3,18	3,2	1,11	1,32
Moles expuestos Gal por mol	0,97	-0,08	1,45	-0,26
10 Antenas Gal	4,47	4,72	6,45	6,24
Ácido siálico por mol	3,5	4,8	5,00	6,5

15 Los resultados mostrados en las Tablas IV y V demuestran que la composición de la TNFR1-IgG<sub>1</sub> es típica de los oligosacáridos complejos mono-, bi- y triantenarios terminados en ácido siálico. Puede concluirse que la TNFR1-IgG<sub>1</sub> preparada mediante el Proceso I contiene una proporción significativamente mayor de ácido siálico, y una proporción significativamente menor de GlcNAc expuesto. El ácido siálico por mol de proteína indica que este material podría tener un punto isoeléctrico menor que el material producido mediante el Proceso II. Por comparación de los resultados  
20 en la Tabla II, estos resultados también indican que el aclaramiento plasmático más lento del material del Proceso I se correlaciona con menor GlcNAc expuesto y generalmente con un mayor contenido en ácido siálico.

Las Tablas IV y V demuestran que las preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> contienen un oligosacárido complejo terminado por uno o más residuos de ácido siálico. Las preparaciones preferidas de TNFR1-IgG<sub>1</sub> contienen moléculas de  
25 TNFR1-IgG<sub>1</sub> que tienen 1-2 moles de residuos de N-acetilglucosamina expuestos por mol de proteína. La razón molar de ácido siálico a proteína es de alrededor de 4-7. Las preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> tienen una razón molar de ácido siálico a N-acetilglucosamina de alrededor de 0,4 a alrededor de 0,45.

#### Ejemplo IV

30 El pI de la preparación altamente sialilada es menor que el pI de la preparación débilmente sialilada.

#### Métodos

35 Se realizó enfoque isoeléctrico para las diversas preparaciones descritas en el Ejemplo II. Los geles de enfoque isoeléctrico separan las glicoproteínas de la preparación según su punto isoeléctrico, pI, utilizando un gradiente de pH creado con amfolitos de diferente pH. En este estudio, el análisis de las preparaciones se realizó utilizando un gradiente de pH de 10 a 4.

#### 40 Resultados

Las preparaciones de TNFR1-IgG<sub>1</sub> exhibían un intervalo de puntos isoeléctricos de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,5, como se determinó mediante cromato-enfoque, en el que el pI es sensible al tratamiento con nuraminidasa.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para controlar la cantidad de ácido siálico presente en una cadena lateral de oligosacárido de una glicoproteína producida en la fase de producción de cultivo en una célula hospedante de mamífero, proceso que comprende seleccionar, captar y mantener parámetros del cultivo celular para la fase de producción para el contenido de ácido siálico deseado de la glicoproteína madura, en el que dichos parámetros del cultivo celular afectan a la productividad específica de la célula y se seleccionan de acuerdo con el criterio de que el contenido de ácido siálico varía inversamente con la productividad específica de la célula durante la fase de producción.
- 10 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos parámetros del cultivo celular se seleccionan de uno o más de los siguientes:
- factores que refuerzan la transcripción de ADN;
- 15 mantener la osmolalidad del cultivo celular dentro de ciertos márgenes;
- controlar la temperatura entre aproximadamente 30°C y 37°C.
- 20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se añade un ácido alcanoico o una sal del mismo en calidad de reforzador de la transcripción de ADN.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el ácido alcanoico es ácido butírico.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la sal es butirato de sodio.
6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el ácido alcanoico o sal del mismo se controla dentro del intervalo de 0,1 mM a 20 mM.
- 30 7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido alcanoico o sal del mismo se controla dentro del intervalo de 0,1 mM a 6 mM.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido alcanoico o sal del mismo se controla dentro del intervalo de 0,1 mM a 8 mM.
- 35 9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido alcanoico o sal del mismo se controla dentro del intervalo de 1 mM a 6 mM.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido alcanoico o sal del mismo se controla dentro del intervalo de 6 mM a 12 mM.
- 40 11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la osmolalidad se controla dentro del intervalo de 250-600 mOsm.
- 45 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la osmolalidad se controla dentro del intervalo de 300-450 mOsm.
13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la osmolalidad se controla dentro del intervalo de 300-600 mOsm.
- 50 14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la osmolalidad se controla dentro del intervalo de 450-600 mOsm.
15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se aumenta la cantidad de ácido siálico presente en la cadena lateral del oligosacárido, y en el que se disminuye la tasa de producción con la osmolalidad mantenida dentro del intervalo de 250-450 mOsm.
- 55 16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la osmolalidad se mantiene dentro del intervalo de 300-450 mOsm.
- 60 17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la osmolalidad se mantiene dentro del intervalo de 350-450 mOsm.
18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se disminuye la cantidad de ácido siálico presente en la cadena lateral del oligosacárido de la glicoproteína, y en el que se aumenta la tasa de producción con la osmolalidad mantenida dentro del intervalo de 350-600 mOsm.
- 65

## ES 2 324 046 T3

19. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la osmolalidad se mantiene dentro del intervalo de 450-550 mOsm.

5 20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se disminuye la cantidad de ácido siálico presente en la cadena lateral del oligosacárido de la glicoproteína, y en el que se aumenta la productividad específica del cultivo celular al cultivar la célula hospedante a una concentración de ácido alcanoico o sal del mismo en el intervalo de 6-12 mM y manteniendo la osmolalidad dentro del intervalo de 450-600 mOsm.

10 21. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula hospedante es una célula CHO.

22. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la glicoproteína es una glicoproteína de mamífero.

15 23. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la glicoproteína es una quimera de receptor del factor de necrosis tumoral-inmunoglobulina.

20 24. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que la célula hospedante es una célula CHO DHFR- menos transfectada con un vector que porta el cDNA que codifica una quimera de receptor soluble de tipo 1 del factor de necrosis tumoral-inmunoglobulina.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

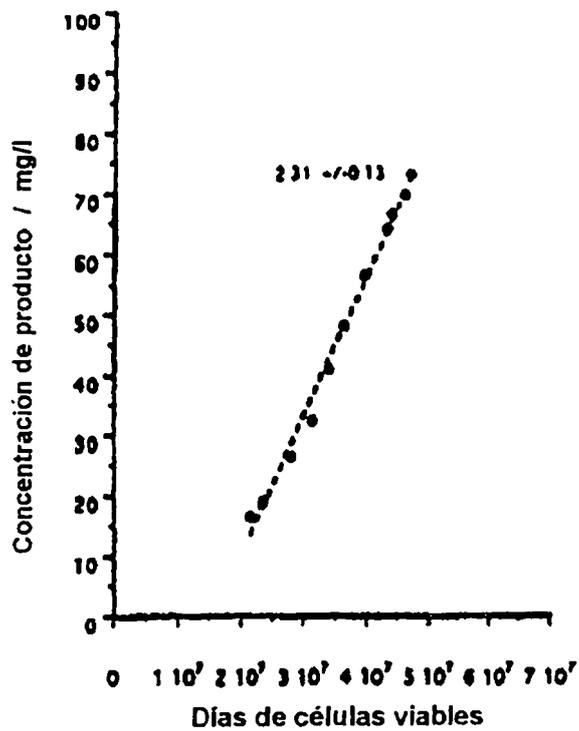


Figura 1A

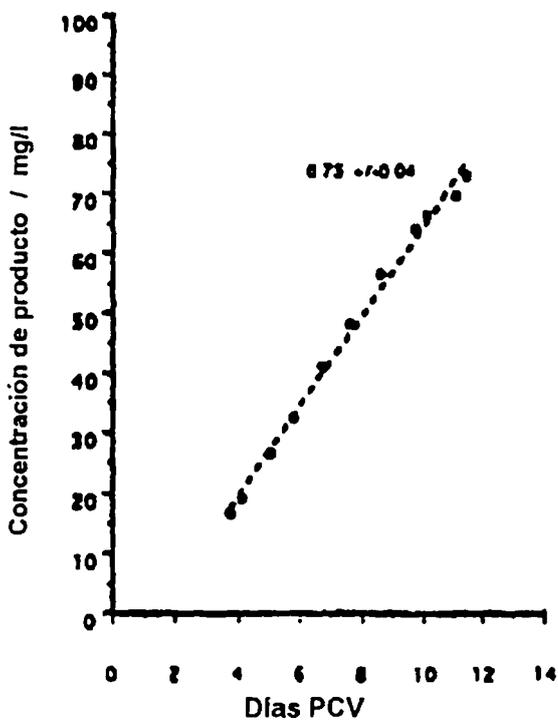


Figura 1B

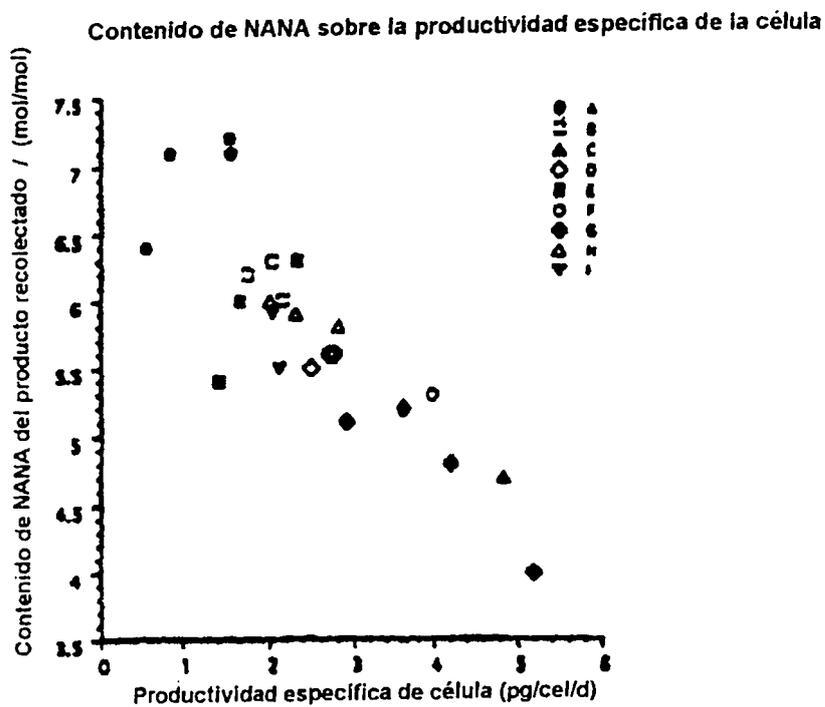


Figura 2A

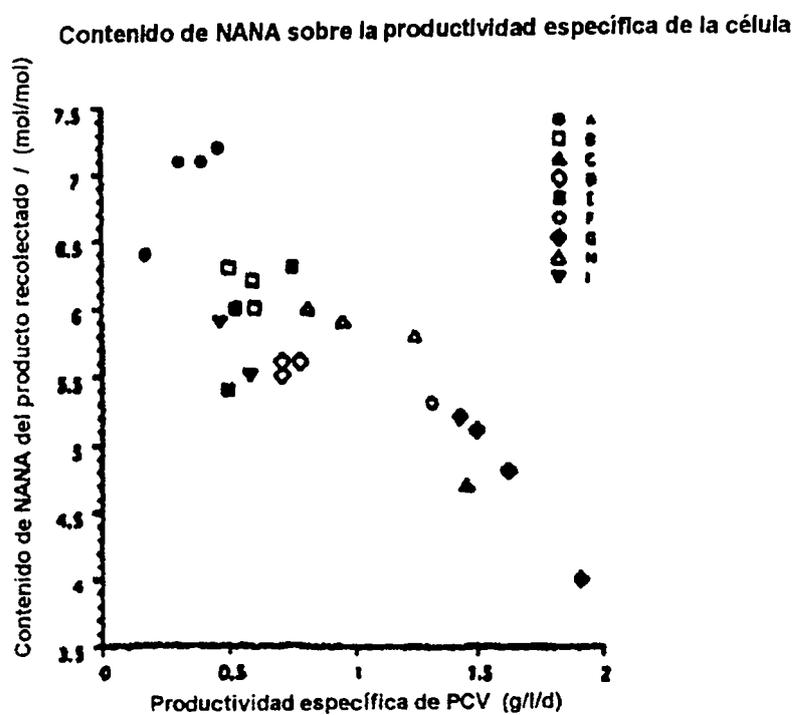


Figura 2B