

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 768**

21 Número de solicitud: 201330946

51 Int. Cl.:

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.12.2014**

71 Solicitantes:

**CURAXIS, S.L. (100.0%)**

**Parque Tecnológico Tecnobahía Ctra. Puerto de  
Santamaría-Sanlúcar de Barrameda, km. 6,2  
11500 PUERTO DE SANTAMARIA (Cádiz) ES**

72 Inventor/es:

**ESTEBAN MORALES, Manuel;  
CURTO RUBIO, Miguel;  
HERNANDEZ RUIZ, Laura;  
SANCHEZ DE MELO, Ivan y  
VILLEGAS MARTINEZ, Enrique**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

54 Título: **Procedimiento para la producción de proteínas recombinantes glicosiladas.**

57 Resumen:

Procedimiento para la producción de proteínas recombinantes glicosiladas.

La presente invención pertenece al campo de la producción de proteínas recombinantes. En concreto, se refiere a un procedimiento para la producción, en células humanas, de proteínas recombinantes con un patrón de glicosilación que se aproxima al obtenido con la línea celular de ovario de hámster chino. Se refiere asimismo a la proteína recombinante obtenible por dicho procedimiento y a su uso para la preparación de un medicamento.

**ES 2 525 768 A1**

## DESCRIPCIÓN

### Procedimiento para la producción de proteínas recombinantes glicosiladas

#### 5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la producción de proteínas recombinantes, más concretamente se refiere a un procedimiento para la producción de proteínas recombinantes en células humanas con un patrón de glicosilación que se aproxima al  
10 obtenido con la línea celular derivada de células de ovario de hámster chino (línea celular CHO, *Chinese Hamster Ovary*).

#### Antecedentes de la invención

15 La demanda creciente de medicamentos para el tratamiento de enfermedades, ha impulsado el desarrollo de biotecnologías para la producción eficiente y efectiva de biofármacos, de forma que cada vez son más las moléculas o proteínas terapéuticas producidas en sistemas biológicos (medicamentos biotecnológicos).

20 Los medicamentos biotecnológicos similares, también denominados biosimilares o medicamentos biosimilares, se definen como aquellos productos medicinales de origen biotecnológico similares, pero no exactamente idénticos, a otros productos medicinales innovadores, la patente de los cuales ha expirado. Desde el punto de vista económico, el desarrollo de biosimilares presenta claras ventajas frente al de nuevos productos pues una  
25 caracterización preclínica similar a la del producto de referencia permite abordar solo las fases clínicas I y III, evitando el alto coste económico y el tiempo invertido en el desarrollo de la fase clínica II.

30 Los sistemas de expresión utilizados para la producción de medicamentos biotecnológicos se basan en vectores que permiten la clonación del gen que codifica la proteína de interés y su expresión en una célula hospedadora como bacterias, levaduras o líneas celulares eucariotas estables.

35 En un principio se utilizaron microorganismos modificados genéticamente para la producción de proteínas terapéuticas, sin embargo algunas de las proteínas producidas por ellos presentaban ciertas carencias estructurales que las hacían inadecuadas para su uso terapéutico humano. Uno de los principales inconvenientes de estos sistemas de producción es la falta de mecanismos que permitan generar modificaciones post-traduccionales que en  
40 muchos casos son fundamentales para la funcionalidad, tiempo de vida e inmunogenicidad de la biomolécula.

Estos problemas fueron resueltos con el uso de líneas celulares eucariotas estables, principalmente células de mamíferos, que sí son capaces de producir proteínas terapéuticas

mínimamente inmunogénicas, como por ejemplo la línea celular CHO. La línea celular CHO es el sistema de expresión por excelencia en la producción de medicamentos biotecnológicos, de manera que éstos presentan una serie de parámetros físico-químicos característicos de células CHO. Dentro de estos parámetros destaca el patrón de glicosilaciones típico de células CHO (referido de aquí en adelante como patrón o perfil de glicosilación CHO), caracterizado por estar altamente fucosilado (alrededor del 90%), y moderadamente galactosilado (aproximadamente 50%), por presentar un ratio fucosilación/galactosilación entre 1,3 y 1,8, y por presentar una relación de especies glicanas mayoritarias de aproximadamente 1: 0,80: 0,26: 0,18 para G0F: G1Fa: G1Fb: G2F, tomando como referencia la especie G0F (Xie *et al.* (Xie H., Chakraborty A., Ahn J., Yu Y. Q., Dakshinamoorthy D.P., Gilar M., Chen W., Skilton S.J. y Mazzeo J.R. (2010) *mAbs* 2:4,379-394, ver página 388)).

La influencia del patrón de glicosilación en el comportamiento biológico de las proteínas es muy elevada, reflejo de ello es el uso de este patrón de glicosilación por las agencias regulatorias como parámetro crítico a evaluar en la aceptación o no de un producto biológico como posible biosimilar. Así, el uso de células distintas a las derivadas de hámster chino, por ejemplo líneas celulares humanas, para la producción de biosimilares de los productos de referencia producidos en la línea CHO, está limitado a la producción de proteínas que no presenten modificaciones post-traduccionales como interferones, vacunas, insulinas, etc.. Las células humanas generan una serie de modificaciones post-traduccionales propias de la línea celular humana y no de células de hámster. La principal consecuencia de estas diferencias es que los productos obtenidos a partir de células humanas no podrán ser considerados por las agencias reguladoras como medicamentos biosimilares a aquellos medicamentos de referencia que hayan sido producidos utilizando la línea celular CHO. Estos productos serán calificados como productos mejorados o "biobetters" (productos biotecnológicos mejorados respecto al producto de referencia), siendo por lo tanto considerados como nuevo registro y debiendo pasar todas las fases clínicas pertinentes.

Por otro lado, cabe destacar que el uso de líneas células eucariotas no humanas, como la línea celular CHO, para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas puede causar problemas, como un plegamiento incorrecto de las proteínas que sucede durante o después de la traducción, el cual puede ser dependiente de la presencia de las proteínas chaperonas apropiadas. Un plegamiento aberrante puede conducir a una disminución o ausencia de actividad biológica de la proteína recombinante, a una disminución del tiempo de vida media en sangre e inclusive a un aumento de la inmunogenicidad. Además, algunas líneas células eucariotas no humanas, como la línea celular CHO, derivan de tumores lo que añade un riesgo adicional al trabajo con ellas y da como resultado procedimientos de aislamiento de proteínas recombinantes muy estrictos, con el objetivo de evitar la actividad transformante o el material tumorigénico en cualquier proteína u otras preparaciones.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los autores de la presente invención, han desarrollado un procedimiento para la producción en células humanas de proteínas recombinantes que,

sorprendentemente, tienen un patrón de glicosilación que se aproxima al obtenido con la línea celular CHO, proporcionando así un sistema de expresión óptimo para la producción de biosimilares.

## 5 **Objeto de la invención**

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (procedimiento de la invención) para la producción de una proteína recombinante caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 10 a) adicionar un hidrolizado de proteínas de cereal a un medio de cultivo,  
b) cultivar una célula humana transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, en el medio de cultivo con hidrolizado de proteínas de cereal de la etapa a), donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana, y  
15 c) aislar la proteína recombinante producida por la célula humana en la etapa b), donde la proteína recombinante contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40.

20 En otro aspecto, se refiere al uso de un hidrolizado de proteínas de cereal para la producción de una proteína recombinante que contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40, en una célula humana transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína recombinante que contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60%, en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40, obtenible por el procedimiento de la invención. También se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicha proteína recombinante y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y al uso de dicha  
35 proteína recombinante para la preparación de un medicamento.

## **Breve descripción de las figuras**

40 La **figura 1** muestra el perfil de N-glicanos de un anticuerpo monoclonal recombinante producido en distintas condiciones (fluorescencia (FLU) frente al tiempo de retención en minutos). En los paneles A-D el anticuerpo ha sido producido en células humanas cultivadas durante 12 días en medio de cultivo sin suplementar (panel A, Medio), suplementado con hidrolizado de trigo (panel B, Medio + H. trigo), suplementado con hidrolizado de trigo y

albúmina (panel C, Medio + H. trigo + Albúmina), suplementado con albúmina (panel D, Medio + Albúmina). En el panel E el anticuerpo ha sido producido en la línea celular CHO (CHO).

5 La **figura 2** muestra la diferencia de los porcentajes relativos de G0F, G1Fa, G1Fb, G2F (panel **A**) y la diferencia de los porcentajes relativos de fucosilación (F), galactosilación (G),  
10 ratio fucosilación/galactosilación (F/G) (panel **B**) de un anticuerpo monoclonal producido en células humanas en distintos medios de cultivo: medio de cultivo solo (A), medio  
suplementado con hidrolizado de trigo (B), medio suplementado con hidrolizado de trigo y  
15 albúmina humana recombinante (C) y medio suplementado con albúmina recombinante (D),  
respecto al mismo anticuerpo producido en la línea celular CHO (E).

La **figura 3** muestra una gráfica en la que se representa la producción de anticuerpo  
15 monoclonal (IgG) en g/L frente al tiempo en días, en células humanas en distintos medios de cultivo: medio solo (A, rombo), medio suplementado con albúmina recombinante (D, cruz),  
medio suplementado con hidrolizado de trigo (B, cuadrado), medio suplementado con  
hidrolizado de trigo y albúmina humana recombinante (C, triángulo).

### Descripción detallada de la invención

20 Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una proteína recombinante caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- a) adicionar un hidrolizado de proteínas de cereal a un medio de cultivo,
- 25 b) cultivar una célula humana transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, en el medio de cultivo con hidrolizado de proteínas de cereal de la etapa a), donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana, y
- 30 c) aislar la proteína recombinante producida por la célula humana en la etapa b), donde la proteína recombinante contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40.

35 En el contexto de la presente invención, el término hidrolizado de proteínas se refiere al producto obtenido tras una reacción de hidrólisis enzimática. El hidrolizado de proteínas de cereal puede ser de origen comercial o puede obtenerse por medios conocidos por el experto en la materia como, por ejemplo, los descritos en Pasapuleti V.K. y Braun S. (*Protein Hydrolysates in Biotechnology*, Editorial Springer, 2010, 229 p, ISBN 987-1-4020-6673-3). En cuanto a las distintas especies de N-glicanos, en el contexto de la presente  
40 invención, G0, G1 y G2 se refieren a estructuras compleja biantena con 0, 1 y 2 residuos terminales de galactosa, mientras que G0F, G1F y G2F son las correspondientes estructuras fucosiladas. Las especies G1Fa y G1Fb son isoformas de la especie G1F (Xie *et al.*, 2010).

A lo largo de toda la memoria, la referencia a células humanas excluye las células madre embrionarias humanas. El medio de cultivo al que se añade el hidrolizado de proteínas de cereal y en el que se cultivan las células humanas depende del tipo celular utilizado y es de conocimiento general para el experto en la materia. Las condiciones a las que se lleva a cabo la etapa b) del procedimiento de la invención, son también dependientes del tipo celular utilizado y son igualmente conocidas por el experto en la materia.

En una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa a) se adiciona un hidrolizado de proteínas de cereal al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal en el medio entre 1 g/L y 20 g/L (gramos de hidrolizado de proteínas de cereal por litro de medio de cultivo). En otra realización particular, en la etapa a) se adiciona un hidrolizado de proteínas de cereal al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal en el medio entre 3 g/L y 10 g/L, y de manera más particular hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal en el medio de 6 g/L.

En una realización particular, el hidrolizado de proteínas de cereal es un hidrolizado de un cereal seleccionado del grupo formado por espelta, cebada, avena, mijo, maíz, arroz, centeno, trigo y mezclas de los mismos. En una realización más particular, el hidrolizado de proteínas de cereal es un hidrolizado de proteínas de trigo. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa a) se adiciona un hidrolizado de proteínas de trigo al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de trigo en el medio entre 1 g/L y 20 g/L (gramos de hidrolizado de proteínas de trigo por litro de medio de cultivo). En otra realización particular, en la etapa a) se adiciona un hidrolizado de trigo al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de trigo en el medio entre 3 g/L y 10 g/L, y de manera más particular hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de trigo en el medio de 6 g/L. El hidrolizado de proteínas de trigo puede ser de origen comercial o puede obtenerse por medios conocidos por el experto en la materia como, por ejemplo, los descritos en Pasapuleti V.K. y Braun S. (*Protein Hydrolysates in Biotechnology*, Editorial Springer, 2010, 229 p, ISBN 987-1-4020-6673-3).

Como se ha indicado anteriormente, el hidrolizado de proteínas de cereal es el resultado del tratamiento enzimático del cereal y posterior purificación de las moléculas resultantes, que no son únicamente aminoácidos. En una realización particular, el hidrolizado de proteínas de cereal se caracteriza por que comprende, en mg por g de hidrolizado:

- azúcares libres (mg/g): 3-300 glucosa, 0,001-20 fucosa, 0,001-20 ramnosa, 0,001-20 galactosa, 1-100 fructosa y 0,05-100 sacarosa, siendo mayoritaria la glucosa;

- azúcares totales (mg/g): 5-300 glucosa, 0,1-100 fucosa, 0,5-100 ramnosa, 0,05-100 galactosa, 5-300 fructosa

- aminoácidos libres (mg/g): 0,01-50 alanina, 1-100 arginina, 0,01-50 asparragina, 0,1-100 ácido aspártico, 0,1-100 cisteína, 0,01-50 ácido glutámico, 0,001-10 glutamina, 0,1-100 glicina, 0,5-100 histidina, 0,5-100 isoleucina, 1-100 leucina, 0,05-100 lisina, 0,01-50

metionina, 0,5-100 fenilalanina, 0-10 prolina, 0,5-100 serina, 0,5-100 treonina, 0,5-100 tirosina y 0,5-100 valina;

- aminoácidos totales (mg/g): 5-300 alanina, 5-300 arginina, 0-50 asparragina, 10-350 ácido aspártico, 5-300 cisteína, 50-600 ácido glutámico, 0-10 glutamina, 5-300 glicina, 5-300 histidina, 5-300 isoleucina, 10-300 leucina, 15-400 lisina, 1-100 metionina, 10-350 fenilalanina, 10-300 prolina, 15-400 serina, 5-300 treonina, 5-300 tirosina y 15-400 valina;

- minerales (mg/g): 0,001-20 calcio, 0,0001-10 hierro, 0,001-20 magnesio, 0,05-100 fósforo, 0,01-50 potasio y 2-300 sodio; y

- ácidos orgánicos y otros compuestos químicos (mg/g): 3-300 ácido oxálico, 0,5-100 ácido succínico, 0,01-50 ácido láctico, 3-300 ácido fórmico y 0,1-100 ácido gamma-aminobutírico (GABA).

En otra realización particular, el hidrolizado de proteínas de cereal se caracteriza por que comprende:

- azúcares libres (mg/g): 3-200 glucosa, 0,001-10 fucosa, 0,001-10 ramnosa, 0,001-10 galactosa, 1-50 fructosa y 0,05-50 sacarosa, siendo mayoritaria la glucosa;

- azúcares totales (mg/g): 5-200 glucosa, 0,1-50 fucosa, 0,5-50 ramnosa, 0,05-50 galactosa, 5-200 fructosa,

- aminoácidos libres (mg/g): 0,01-30 alanina, 1-50 arginina, 0,01-30 asparragina, 0,1-50 ácido aspártico, 0,1-50 cisteína, 0,01-30 ácido glutámico, 0,001-5 glutamina, 0,1-50 glicina, 0,5-50 histidina, 0,5-50 isoleucina, 1-50 leucina, 0,05-50 lisina, 0,01-30 metionina, 0,5-50 fenilalanina, 0-5 prolina, 0,5-50 serina, 0,5-50 treonina, 0,5-50 tirosina y 0,5-50 valina;

- aminoácidos totales (mg/g): 5-200 alanina, 5-200 arginina, 0-30 asparragina, 10-200 ácido aspártico, 5-200 cisteína, 50-450 ácido glutámico, 0-5 glutamina, 5-200 glicina, 5-200 histidina, 5-200 isoleucina, 10-250 leucina, 10-200 lisina, 1-50 metionina, 10-200 fenilalanina, 10-250 prolina, 10-200 serina, 5-200 treonina, 5-200 tirosina y 10-200 valina;

- minerales (mg/g): 0,001-10 calcio, 0,0001-5 hierro, 0,001-10 magnesio, 0,05-50 fósforo, 0,01-30 potasio y 2-100 sodio; y

- ácidos orgánicos y otros compuestos químicos (mg/g): 3-200 ácido oxálico, 0,5-50 ácido succínico, 0,01-30 ácido láctico, 3-200 ácido fórmico y 0,1-50 GABA.

En otra realización particular, el hidrolizado de proteínas de cereal se caracteriza por que comprende, en mg por g de hidrolizado;

- azúcares libres (mg/g): 8-30 glucosa, 0,01-1,5 fucosa, 0,1-2 ramnosa, 0,05-1,5 galactosa, 3-18 fructosa y 0,2-8 sacarosa, siendo mayoritaria la glucosa;

- azúcares totales (mg/g): 20-45 glucosa, 0,2-5 fucosa, 1-10 ramnosa, 0,9-5 galactosa, 15-45 fructosa,

- aminoácidos libres (mg/g): 0,5-50 alanina, 3-15 arginina, 0,5-5 asparragina, 0,2-5 ácido aspártico, 0,2-5 cisteína, 0,5-5 ácido glutámico, 0,05-2 glutamina, 0,2-5 glicina, 0,5-10 histidina, 1-10 isoleucina, 3-20 leucina, 0,2-9 lisina, 0,5-8 metionina, 1-10 fenilalanina, 0-1 prolina, 1-7 serina, 2-10 treonina, 0,5-10 tirosina y 2-10 valina;

- aminoácidos totales (mg/g): 20-55 alanina, 20-50 arginina, 0-1 asparragina, 30-60

ácido aspártico, 10-35 cisteína, 200-300 ácido glutámico, 0-1 glutamina, 10-35 glicina, 10-35 histidina, 10-35 isoleucina, 40-130 leucina, 25-65 lisina, 3-15 metionina, 30-70 fenilalanina, 70-130 prolina, 25-60 serina, 15-50 treonina, 15-50 tirosina y 25-65 valina;

5 - minerales (mg/g): 0,05-2 calcio, 0,005-1 hierro, 0,05-2 magnesio, 1-5 fósforo, 0,5-3 potasio y 4-25 sodio; y

- ácidos orgánicos y otros compuestos químicos (mg/g): 5-20 ácido oxálico, 1-10 ácido succínico, 0,05-3,5 ácido láctico, 10-25 ácido fórmico y 0,2-5 GABA.

10 En otra realización particular, en la etapa a) el medio de cultivo es un medio de cultivo libre de suero y de proteínas de origen animal. En otra realización particular, dicho medio de cultivo libre de suero y de proteínas de origen animal no tiene lactato y comprende glutamina, glucosa y ácido glutámico. En una realización más particular el medio de cultivo es el medio PerMab® (Thermofisher Scientific/15 Hyclone, número de catálogo SH30871.01).

15 Siguiendo el procedimiento de la invención, se producen proteínas recombinantes con un patrón de glicosilación que se aproxima al obtenido con la línea celular CHO (Figura 1, panel E). Sorprendentemente, este patrón de glicosilación que se aproxima al obtenido con la línea celular CHO (denominado de aquí en adelante patrón o perfil de glicosilación "hamsterizado") se consigue utilizando como sistema de expresión células humanas. El patrón de glicosilación "hamsterizado" de las proteínas recombinadas producidas por el procedimiento de la invención se caracteriza por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y por que la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40, tomando como referencia la especie G0F, es decir, considerando como valor máximo el contenido del N-glicano G0F.

25 En una realización particular, la proteína recombinante obtenida por el método de la presente invención contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 40% y un 50% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40, tomando como referencia la especie G0F.

35 En otra realización particular, las proteínas recombinantes producidas por el método de la invención tienen un porcentaje de fucosilación de entre un 70% y un 96% y un porcentaje de galactosilación de entre un 40% y 85%, presentando una relación fucosilación/galactosilación de entre 1,13 y 1,8.

40 El patrón de glicosilación de la proteína recombinante puede analizarse usando cromatografía de líquidos, como por ejemplo cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC) y/u otros métodos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo análisis de espectroscopía de masas.

Entre las distintas células humanas (excluyendo células madre embrionarias humanas) que se pueden utilizar como sistema de expresión de proteínas recombinantes, cabe destacar la línea celular PER.C6® (Crucell N.V. (Leiden, The Netherlands), Percivia), depositada en la *European Collection of Cell Cultures* (ECAAC) con el número 96022940, que se obtiene de células de retina embrionaria humana (EP 0833934 B1, también publicada como ES 2231813 T). Una de las ventajas que ofrece el uso de células PER.C6® es su capacidad de crecer en cultivos de extrema densidad celular lo cual le permite producir títulos de producción 5 veces superiores a los tradicionalmente obtenidos con la línea celular CHO. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa b) la célula humana es una célula de retina embrionaria humana, preferentemente la célula la línea celular ECACC con el número 96022940 (PER.C6®). La línea celular PER.C6® se transfecta con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante que se quiere producir (proteína recombinante de interés). En una realización particular dicha molécula ácido nucleico es una molécula de ADN. En una realización particular, la célula humana transfectada es la línea celular ECACC con el número 96022940 (PER.C6®) transfectada con el vector v074 (SEQ ID NO 1) linealizado mediante digestión enzimática con Scal, la cual ha sido depositada en la institución *Health Protection Agency Culture Collections* (HPACC, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido) el 7 de marzo de 2012, con el número de depósito 12030701, es decir, la célula humana transfectada es la célula depositada en la HPACC con el número de depósito 12030701. El vector v074 codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal contra el receptor de membrana Her2.

La mayoría de los medicamentos biotecnológicos producidos actualmente son anticuerpos monoclonales cuya producción se lleva a cabo, en la mayoría de casos, en células CHO. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, la proteína recombinante producida es un anticuerpo y de manera más particular es un anticuerpo monoclonal.

En una realización particular del procedimiento descrito en los párrafos anteriores, la etapa b) se lleva a cabo en Fed-Batch o por perfusión, de manera más particular en Fed-Batch.

Como se ha indicado anteriormente, con el procedimiento de la invención, caracterizado por la adición de un hidrolizado de proteínas de cereal al medio de cultivo, se producen proteínas recombinantes con un perfil de glicosilación "hamsterizado" pero utilizando como sistema de expresión células humanas. Sorprendentemente, la adición de albúmina al medio de cultivo de la etapa a) provoca un aumento de la producción de la proteína recombinante sin afectar negativamente a su patrón de glicosilación, es decir, la proteína recombinante producida en medio de cultivo con hidrolizado de proteínas de cereal y albúmina sigue manteniendo un perfil de glicosilación "hamsterizado" (Figuras 1, panel C). Además, inesperadamente, la combinación del hidrolizado de proteínas de cereal y la albúmina tiene un efecto sinérgico en cuanto al aumento de la producción de proteína recombinante con un perfil de glicosilación "hamsterizado" (Figura 3, triángulo).

Otra importante ventaja de la combinación del hidrolizado de proteínas de cereal y albúmina es que se consigue en un menor tiempo la misma producción de proteína que en células humanas crecidas en medio sin suplementar, suplementado solo con hidrolizado de proteínas de cereal o solo con albúmina (Figura 3). Por tanto, con la combinación de hidrolizado de proteínas de cereal y albúmina se consigue aumentar y acelerar la producción de proteína recombinante. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa a) se adiciona albúmina al medio de cultivo. En una realización particular, en la etapa a) se adiciona albúmina al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 0,5 g/L y 20 g/L (gramos de albúmina por litro de medio de cultivo). En otra realización particular, se adiciona albúmina al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 1 g/L y 15 g/L y de manera más particular hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 2 g/L y 10 g/L, y preferentemente hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio de 4 g/L.

La albúmina puede ser comercial u obtenerse por medios conocidos por el experto en la materia. En otra realización particular, la albúmina es albúmina recombinante, preferentemente albúmina humana recombinante. En otra realización particular, la albúmina recombinante se produce en planta de arroz, libre de proteínas animales, evitándose así, los riesgos que supone la utilización de suero bovino fetal.

En una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa a) se adiciona al medio de cultivo un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal, en particular de hidrolizado de proteínas de trigo, en el medio entre 1 g/L y 20 g/L y se adiciona también albúmina hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 0,5 g/L y 20 g/L. En otra realización particular, se adiciona un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, hasta alcanzar una concentración en el medio entre 3 g/L y 10 g/L y se adiciona también albúmina hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 1 g/L y 15 g/L. En una realización preferente del procedimiento de la invención, en la etapa a) se adiciona al medio de cultivo un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, en el medio entre 3 g/L y 10 g/L y se adiciona albúmina hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 2 g/L y 10 g/L, y más preferentemente el hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, se adiciona hasta alcanzar una concentración de 6 g/L y la albúmina hasta alcanzar una concentración de 4 g/L.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, para la producción de una proteína recombinante que contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40:

0,02-0,40, en una célula humana transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana. En una realización particular, la invención se refiere al uso de una combinación de un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular de trigo, y albúmina para la producción de una proteína recombinante con un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40, en una célula humana transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana. En otra realización particular, la célula humana es una célula de retina embrionaria humana, de manera más particular una célula PER.C6®. En una realización aún más particular la célula humana transfectada es la línea celular depositada en la institución HPACC con el número de depósito 12030701.

Como se ha indicado anteriormente, la combinación de hidrolizado de proteínas de cereal y albúmina aumenta y acelera la producción de proteína recombinante. Así, en una realización particular, la invención se refiere al uso de un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, y albúmina para aumentar la producción, en células humanas, de una proteína recombinante con un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40. En otra realización particular, la célula humana, que se transfecta con el vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante de interés, es una célula de retina embrionaria humana, de manera más particular una célula PER.C6®. En una realización aún más particular la célula humana transfectada es la línea celular depositada en la institución HPACC con el número de depósito 12030701.

La presente invención se refiere en otro aspecto a una proteína recombinante obtenible por el procedimiento de la invención tal y como se ha descrito en los párrafos anteriores (proteína recombinante de la invención), es decir, una proteína recombinante con un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40. Así, en una realización particular la proteína recombinante es obtenible por el procedimiento de la invención adicionándose en la etapa a) un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal, en particular de hidrolizado de proteínas de trigo, en el medio entre 1 g/L y 20 g/L, de manera más particular entre 3 g/L y 10 g/L, y de manera preferente hasta alcanzar una concentración en el medio de 6 g/L. En otra realización particular la proteína recombinante es obtenible por el procedimiento de la invención, en el que la célula humana que se transfecta con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que

codifica la proteína recombinante de interés es una célula de retina embrionaria humana, de manera más particular es una célula PER.C6®. En una realización preferente la célula humana transfectada es la línea celular depositada en la institución HPACC con el número de depósito 12030701. En otra realización particular, la proteína recombinante obtenible por el procedimiento de la invención es un anticuerpo, de manera más particular, un anticuerpo monoclonal. En otra realización particular, la proteína recombinante es obtenible por el procedimiento de la invención llevando a cabo la etapa b) en Fed-Batch o en perfusión. En otra realización particular la proteína recombinante es obtenible por el procedimiento de la invención donde en la etapa a) se adiciona albúmina al medio de cultivo. En una realización particular, se adiciona albúmina al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 0,5 g/L y 20 g/L. En otra realización particular, dicha concentración de albúmina en el medio es de entre 1 g/L y 15 g/L, de manera más particular es de entre 2 g/L y 10 g/L, y de manera preferente es de 4 g/L. En otra realización particular la proteína recombinante es obtenible por el procedimiento de la invención donde en la etapa a) se adiciona al medio de cultivo un hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal, en particular de hidrolizado de proteínas de trigo, en el medio entre 1 g/L y 20 g/L y se adiciona también albúmina hasta alcanzar una concentración de albúmina en el medio entre 0,5 g/L y 20 g/L. En otra realización particular, el hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, se adiciona al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de entre 3 g/L y 10 g/L y la albúmina hasta alcanzar una concentración de entre 1 g/L y 15 g/L, de manera más particular de entre 2 g/L y 10 g/L de albúmina, y más preferentemente el hidrolizado de proteínas de cereal, en particular un hidrolizado de proteínas de trigo, se adiciona hasta alcanzar una concentración de 6 g/L y la albúmina hasta alcanzar una concentración de 4 g/L.

Por último, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la proteína recombinante de la invención, es decir, la proteína recombinante obtenible por el procedimiento de la invención tal y como se ha descrito en el párrafo anterior para la preparación de un medicamento, en particular un medicamento biosimilar, y también se refiere a dicha proteína recombinante para su uso como medicamento, en particular como medicamento biosimilar. Asimismo, se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Asimismo, se refiere al uso de dicha composición farmacéutica para la preparación de un medicamento, en particular un medicamento biosimilar, y también se refiere a dicha composición farmacéutica para su uso como medicamento, en particular como medicamento biosimilar.

#### **DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA**

La línea celular ECACC con el número 96022940 (PER.C6®) transfectada con el vector v074 (SEQ ID NO 1) linealizado mediante digestión enzimática con Scal ha sido depositada en la institución *Health Protection Agency Culture Collections* (HPACC, Porton Down,

Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido) el 7 de marzo de 2012, con el número de depósito 12030701 (solicitud de patente española P201200465).

### Ejemplos

5

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

10

En los presentes ejemplos, se hace referencia a un anticuerpo monoclonal anti-HER2, al que se denomina CRX01, codificado por el vector de expresión de secuencia SEQ ID NO 1, expresado en la línea celular depositada en la institución HPACC con el número de depósito 12030701.

### **EJEMPLO 1.- Producción de un anticuerpo monoclonal**

15

#### Cultivo de las células HPACC nº 12030701

20

En todo el proceso de cultivo, las células PER.C6® fueron crecidas siguiendo las instrucciones indicadas por la empresa propietaria de la línea celular PER.C6® (Crucell-DSM). Brevemente, las células PER.C6® fueron crecidas en medio PerMab (Thermo Fisher Scientific / HyClone, número de catálogo SH30871.01), que está especialmente diseñado para permitir el crecimiento de células en alta densidad. El medio PerMab se completó con la adición del aminoácido glutamina (Ajinomoto) 3mM y del detergente ácido plurónico F-68 (Sigma, número de catálogo P1300) a una concentración final de 1g/L y en ningún caso se añadió ningún tipo de suero al medio. Dicho medio PerMab complementado con 3mM de glutamina y 1g/L de ácido plurónico se denomina "medio PerMab completo" de aquí en adelante.

25

30

Se descongeló un vial de células HPACC nº 12030701 y las células se sembraron a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  células/ml en T-flask en estático durante una semana, a 36,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub> haciéndose un subcultivo a los 3 / 4 días. Después de este período de adaptación, las células pasaron a cultivarse en agitación a 75 rpm para después de 4 días pasar a 125 rpm de agitación.

35

Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las células a 300g, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en:

A. Medio PerMab completo.

B. Medio PerMab completo e hidrolizado de trigo a una concentración de 6 g/L.

C. Medio PerMab completo, hidrolizado de trigo a una concentración de 6 g/L y albúmina recombinante humana a una concentración de 4 g/L.

40

D. Medio PerMab completo y albúmina recombinante humana a una concentración de 4 g/L.

El hidrolizado de trigo y la albúmina son de *Kerry Bioscience*, referencia U1-5X00792 y 5X00163, respectivamente.

45

La estrategia de cultivo C, es decir, en la que se adiciona al medio PerMab completo tanto hidrolizado de trigo como albúmina se denomina CURAMAB.

Las células HPACC n° 12030701 fueron cultivadas en Fed-Batch durante 12 días siguiendo las instrucciones indicadas por la empresa propietaria de la línea celular PER.C6® (CruCell-DSM).

## 5 **EJEMPLO 2.- Purificación del anticuerpo monoclonal**

El proceso de purificación del anticuerpo producido en medio control (A) y suplementado (B-D) se inicia con una centrifugación para eliminar las células y restos celulares del cultivo. Obtenida la solución clarificada que tiene la proteína de interés, la separación de las otras proteínas producidas por la célula se lleva a cabo usando una combinación de diferentes técnicas cromatográficas. Estas técnicas separan mezclas de proteínas en base a su carga, grado de hidrofobicidad, afinidad y tamaño. Varias resinas de cromatografía diferentes están disponibles comercialmente para cada una de esas técnicas, permitiendo una adaptación precisa del esquema de purificación a la proteína involucrada.

15 El proceso de purificación realizado consta de tres etapas cromatográficas, que comienzan por un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad usando una columna con Proteína A inmovilizada. La mayor parte de los contaminantes (proteínas de la célula hospedadora) pasan a través de la columna mientras que la proteína de interés es adsorbida a la proteína A inmovilizada además de otros contaminantes que se unen inespecíficamente a la fase sólida. La elución de las IgG1 se realizó por cambios de pH.

La siguiente etapa de purificación consiste en una cromatografía de intercambio catiónico. La columna se cargó con el *pool* de Proteína A acondicionado en conductividad y pH, tras varios lavados, la elución de la proteína de interés se realizó mediante un cambio de conductividad.

Finalmente, se realizó un último paso de cromatografía de pulido o “polishing” de la preparación proteica eluida para reducir las proteínas contaminantes a niveles de ppm y disminuir la cantidad de agregados. Para esta etapa se utilizó una cromatografía bimodal cuyo ligando unido a la fase sólida es una amina N-bencil-N-metil-etanol que exhibe varios grupos funcionales con diferentes comportamiento de interacción. La más pronunciada es la interacción iónica, comportándose como un intercambiador fuerte de aniones, y la interacción hidrofóbica.

35 El *pool* de la proteína recuperada fue formulado por diafiltración con un sistema de filtración tangencial en una serie de excipientes farmacéuticamente adecuados para mantener su estabilidad. En particular, se utilizó L-histidina como buffer para mantener un pH=6, Trehalosa dihidrato como agente tonificante y polisorbato 20 como estabilizador, que reduce la potencial agregación que puede sufrir la proteína en solución.

40

## **EJEMPLO 3.- Perfil de glicosilación**

Los anticuerpos monoclonales producidos en las distintas condiciones (medio de cultivo solo (A), suplementado con hidrolizado de trigo (B), suplementado con hidrolizado de trigo y albúmina (C, CURAMAB) y suplementado con albúmina (D) fueron desglicosilados mediante una primera etapa de desnaturalización con RapidGest SF (Water, Water, Milford, MA, USA, ref. 186001861), seguida de dos etapas de reducción y alquilación, con ditioneitol y iodoacetamida, respectivamente. Los N-glicanos de los anticuerpos desglicosilados fueron digeridos mediante adición de PNGasa F e incubación a 37°C *overnight*. Las muestras digeridas fueron purificadas mediante extracción en fase sólida en placas de 96 pocillos HILIC microELUTION SPE (Water, Milford, MA, USA, ref. 186002780) de acuerdo al protocolo descrito por Xie *et al.* (2010). Los glicanos purificados fueron marcados con 2-amino-benzamida (2-AB) mediante el Kit Sigma GlycoProfile 2-AB (St. Louis, MO, USA). Seguidamente, una segunda purificación en fase sólida con HILIC microELUTION SPE fue llevada a cabo para eliminar el exceso de 2-AB. Los glicanos marcados con 2-AB fueron separados en una columna HILIC (Water, Milford, MA, USA, ref. 186006095) a 60°C y detectados por un L-2485 LaChrom ELITE. Las separaciones de las diferentes especies de glicanos fueron realizadas mediante un gradiente de 40 minutos (28%-38% B) con 100 mM de formiato amónico pH 2,7 (fase móvil B) y 100% de acetonitrilo (fase móvil A) a 0,6 ml/min de flujo lineal.

El análisis mostró un perfil de glicanos del anticuerpo de referencia producido en la línea celular CHO, altamente fucosilados (alrededor del 90%) y moderadamente galactosilados (aproximadamente 50%), presentando un ratio fucosilación/galactosilación de 1,68±0,002, característico de este cultivo celular (Tabla 1). Este valor es propio de células CHO donde las especies mayoritarias de este cultivo presentaron para G0F, G1Fa, G1Fb y G2F una relación G0F:G1Fa:G1Fb:G2F de 1: 0,86: 0,30: 0,24, considerando como máximo valor el porcentaje de la especie G0F (Tabla 1; Figura 1, panel E).

Tabla 1.- Porcentajes relativos de intensidad de glicanos mayoritarios del anticuerpo monoclonal producido en células HPACC n° 12030701.

	A	B	C	D	E
G0F	24,03±0,117	38,43±0,014	32,75±0,075	22,50±0,149	36,99±0,226
G1Fa	31,30±0,262	30,15±0,049	30,30±0,066	33,15±0,080	31,89±0,148
G1Fb	10,82±0,225	11,73±0,014	11,21±0,037	11,93±0,036	11,15±0,02
G2F	14,58±0,273	9,96±0,001	12,01±0,077	16,91±0,115	8,80±0,09
F	87,07±0,465	94,44±0,014	92,68±0,104	92,25±0,358	92,49±0,494
G	94,63±0,485	70,47±0,001	79,53±0,263	97,41±0,319	54,93±0,212
F/G	1,09±0,011	1,34±0,002	1,16±0,002	0,94±0,006	1,68±0,002

Tabla 2.- Diferencia de los porcentajes relativos de la Tabla 1 respecto al mismo anticuerpo producido en la línea celular CHO.

	B-E	C-E	A-E	D-E
G0F	1,44	-4,24	-12,96	-14,49
G1Fa	-1,74	-1,59	-0,59	1,26
G1Fb	0,58	0,06	-0,33	0,78
G2F	1,16	3,21	5,78	8,11
F	1,95	0,19	-5,42	-0,24
G	15,54	24,6	39,7	42,48
F/G	-0,34	-0,52	-0,59	-0,74

5 En las tablas 1 y 2 las letras de la A a la E hacen referencia a que el anticuerpo haya sido producido en células humanas en distintos medios cultivos: medio PerMab (A), medio PerMab suplementado con hidrolizado de trigo (B), suplementado con hidrolizado de trigo y albúmina humana recombinante (C) y suplementado con albúmina recombinante (D), o haya sido producido en la línea celular CHO (E).

10 El perfil de oligosacáridos del anticuerpo producido en el cultivo celular humano sin suplementar (A) presentó mayores niveles de galactosilación (aproximadamente 94,63%) que el perfil obtenido en CHO (E) (Tabla 1). Este perfil de glicanos, altamente galactosilados, típico de proteínas humanas, presentó unos valores de especies mayoritarias G0F, G1Fa, G1Fb y G2F con una relación G0F:G1Fa:G1Fb:G2F de 0,76: 1: 0,34: 0,46, considerando como valor máximo el porcentaje de la especie G1Fa (Tabla 1 y Figura 1, panel A). En este caso el ratio entre fucosilación/galactosilación fue menor que en CHO, de  $1,09 \pm 0,011$  (Tabla 1), típico de cultivos celulares humanos.

20 Sorprendentemente, el perfil de glicanos de las proteínas producidas en el cultivo celular humano HPACC n° 12030701 suplementado solamente con el hidrolizado de trigo (B) o con hidrolizado de trigo más albúmina (C), fue más similar al obtenido con células CHO (E) que en condiciones sin suplementar (Figura 1, paneles B, C y E; Figura 2). Este perfil de oligosacáridos obtenido con medio de cultivo suplementado con hidrolizado de trigo y albúmina o suplementado solo con hidrolizado de trigo presentó valores de fucosilación y galactosilación muy próximo al obtenido con células CHO. Más en detalle, el perfil obtenido en el medio suplementado con el hidrolizado de trigo más albumina (C), presentó unos valores de especies mayoritarias G0F, G1Fa, G1Fb y G2F con una relación G0F:G1Fa:G1Fb:G2F de 1: 0,92: 0,34: 0,36, considerando como máximo valor el porcentaje de la especie G0F y presentó un ratio entre fucosilación/galactosilación de  $1,16 \pm 0,002$  (Tabla 1).

35 Los resultados obtenidos muestran que el hidrolizado de trigo permite modificar el perfil de glicosilación de células PER.C6®, haciéndolo similar al producido por la línea celular CHO. Además este perfil es obtenido a tiempos de cultivo estándar de 12 días, lo que supone una

importante ventaja en cuanto a la calidad del producto. Los cultivos longevos de células PER.C6® (más de 12 días) tienen el inconveniente de producir modificaciones en algunos parámetros físico-químicos que afectan a la calidad del producto, por ejemplo en el perfil de heterogeneidad de carga. A nivel cualitativo el perfil de glicanos analizados, de un total de 23 (datos no mostrados), de la proteína recombinante producida en la línea celular Per.C6® en medio de cultivo sin suplementar, suplementado con hidrolizado de trigo y suplementado con hidrolizado de trigo y albúmina no presentó diferencias significativas, siendo el porcentaje de glicanos mayoritarios G0F, G1Fa, G1Fb y G2F (suponen entre el 80% y 91% de las especies glicanas) los que caracterizan el perfil.

#### **EJEMPLO 4.- Rendimiento de la producción de anticuerpo monoclonal**

La figura 3 muestra que en las células PER.C6® cultivadas en medio PerMab sin suplementar (A, rombo) la producción máxima de IgG1 es de 3,7 g/L a día 12 de cultivo. La adición al medio de cultivo de albúmina recombinante (D, cruz) o hidrolizado de trigo (B, cuadrado) generó niveles de producción de IgG1 a día 12 de 4,3 g/L y 3,3 g/L, respectivamente. Sorprendentemente, cuando se añadió al medio de cultivo una mezcla de hidrolizado de trigo y albúmina humana recombinante (C, triángulo) se observó un efecto sinérgico en cuanto a la producción, llegándose a producir 4,9 g/L de IgG1.

La combinación del hidrolizado de trigo con albúmina humana recombinante (C, CURAMAB) produce un aumento significativo en la producción de proteínas alcanzando niveles muy similares al máximo absoluto de 5,1 g/L obtenido por el cultivo no suplementado a día 18. Esta mejora en la eficiencia del proceso, desde el punto de vista industrial, permite una reducción de hasta 6 días en el tiempo necesario para conseguir una producción de proteínas recombinantes máxima, aumentando considerablemente la rentabilidad del proceso ya que:

- Da lugar a una reducción de costes asociados a los medios de cultivo, energía, personal etc.
- Permite un aumento de la capacidad anual de producción de una planta biofarmacéutica al poderse realizar un mayor número de lotes.

## REIVINDICACIONES

1- Procedimiento para la producción de una proteína recombinante glicosilada caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

5 a) adicionar un hidrolizado de proteínas de cereal a un medio de cultivo,

b) cultivar una célula humana transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante en el medio de cultivo con hidrolizado de proteínas de cereal de la etapa a), donde la célula humana no es una célula madre embrionaria humana, y

10 c) aislar la proteína recombinante producida por la célula humana en la etapa b), donde la proteína recombinante contiene un perfil de N-glicanos caracterizado por que el glicano mayoritario es G0F, el cual representa entre un 30% y un 60% en función del contenido total de N-glicanos, y la relación de N-glicanos G0F:G1Fa:G1Fb:G2F es 1: 0,40-0,95: 0,1-0,40: 0,02-0,40.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación anterior, donde en la etapa a) se adiciona un hidrolizado de proteínas de cereal al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración de hidrolizado de proteínas de cereal en el medio entre 1 g/L y 20 g/L.

20 3.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el hidrolizado de proteínas de cereal es un hidrolizado de proteínas de trigo.

4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en la etapa b) la célula humana es una célula de retina embrionaria humana.

25 5.- Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la célula de retina embrionaria humana es la célula ECAAC No 96022940.

30 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proteína recombinante es un anticuerpo monoclonal.

35 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde en la etapa b) la célula humana transfectada es la célula depositada en la HPACC con el número de depósito 12030701.

8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa b) se lleva a cabo en Fed-Batch o perfusión.

40 9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en la etapa a) se adiciona albúmina al medio de cultivo.

10.- Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la albúmina se adiciona hasta alcanzar una concentración entre 0,5 g/L y 20 g/L en el medio de cultivo.

11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, donde la albúmina es albúmina humana recombinante.

5 12.- Uso de un hidrolizado de proteínas de cereal para la producción de una proteína recombinante glicosilada según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10 13. Uso de una combinación de un hidrolizado de proteínas de cereal y albúmina para la producción de una proteína recombinante glicosilada según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

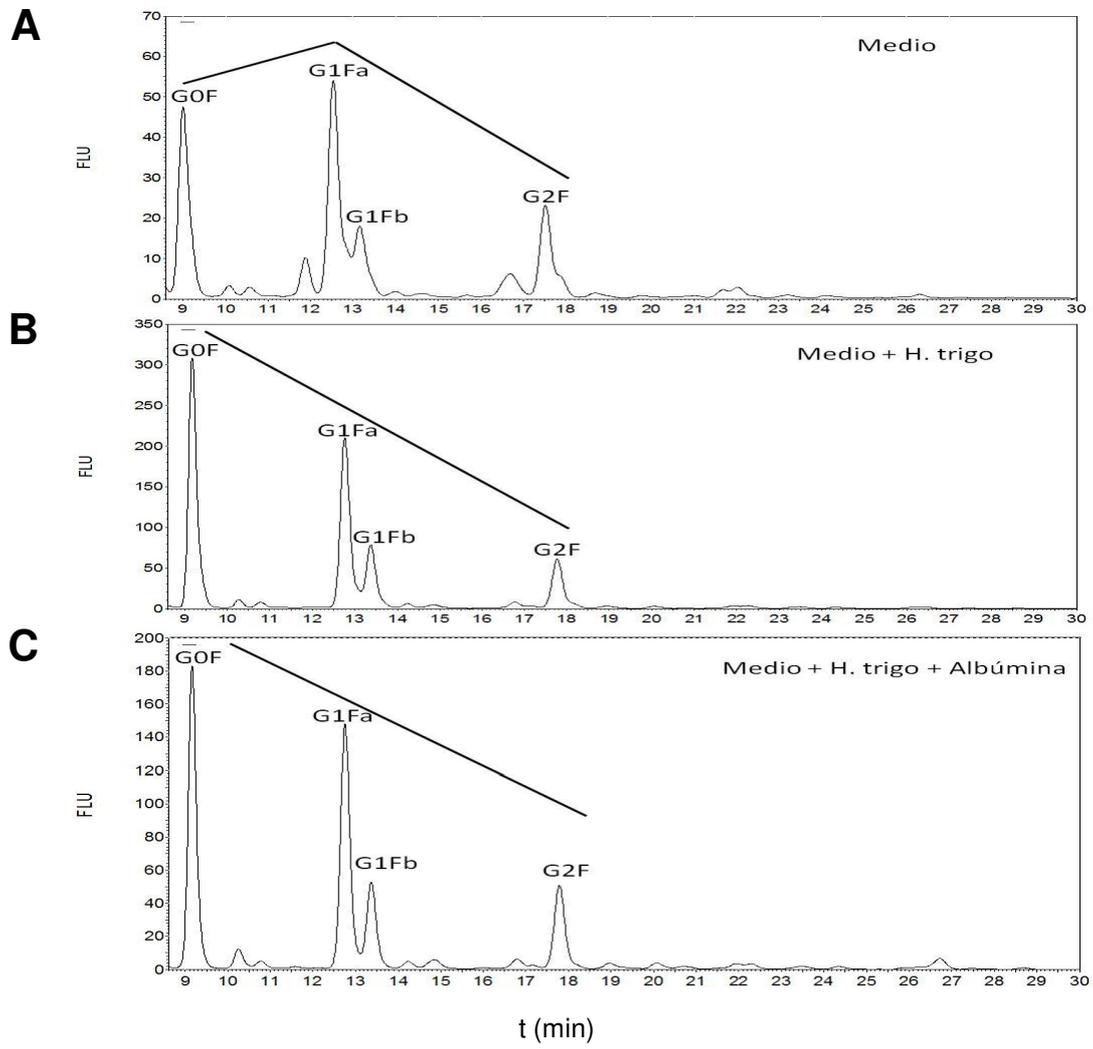


FIG. 1

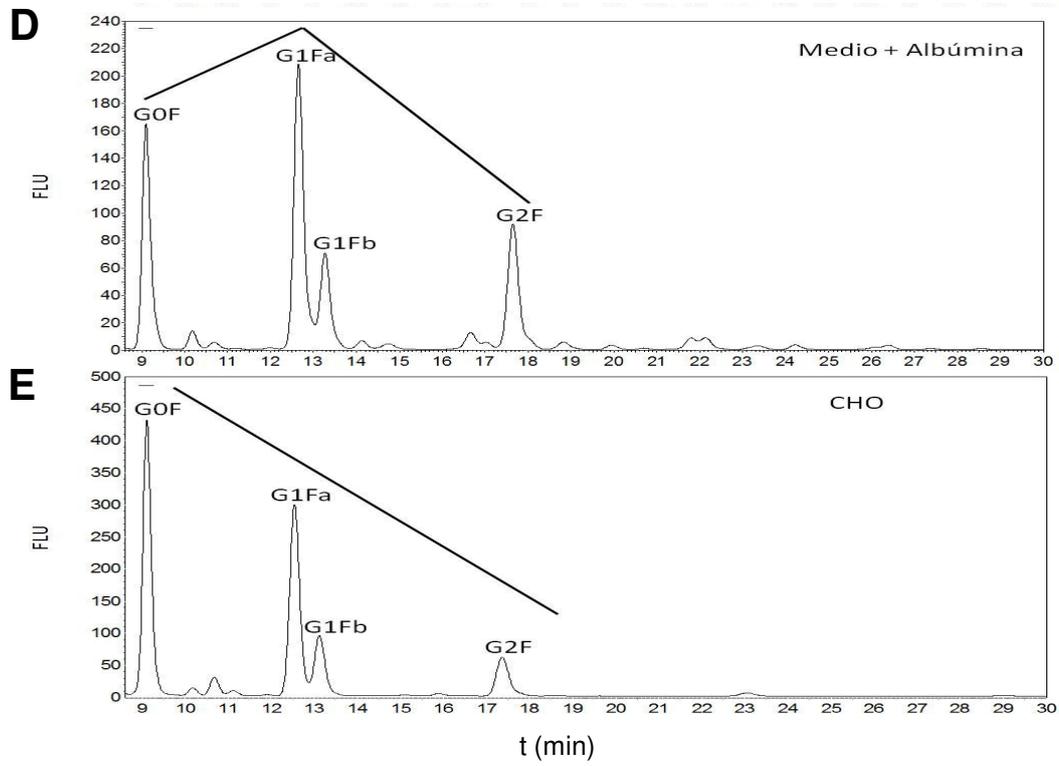
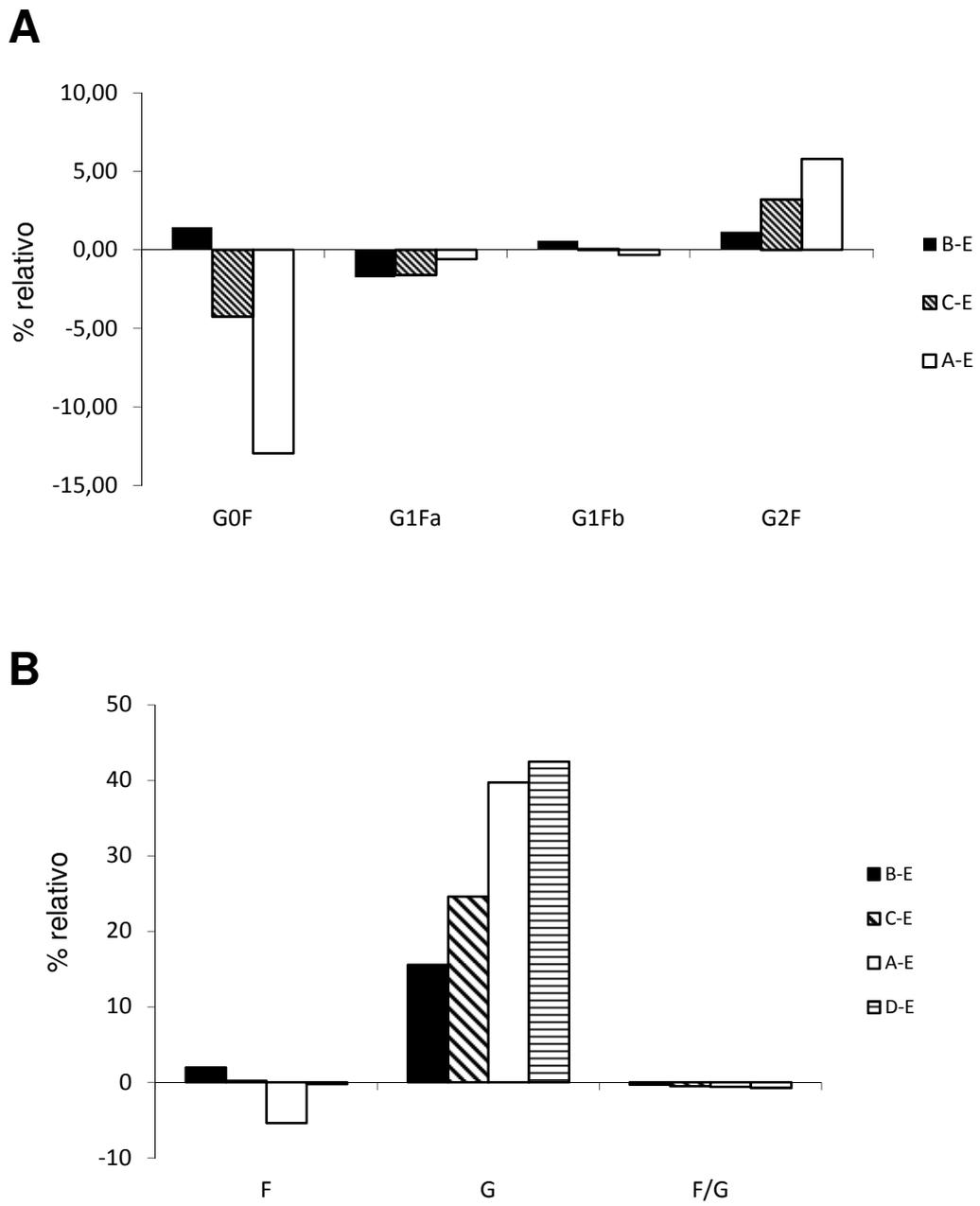
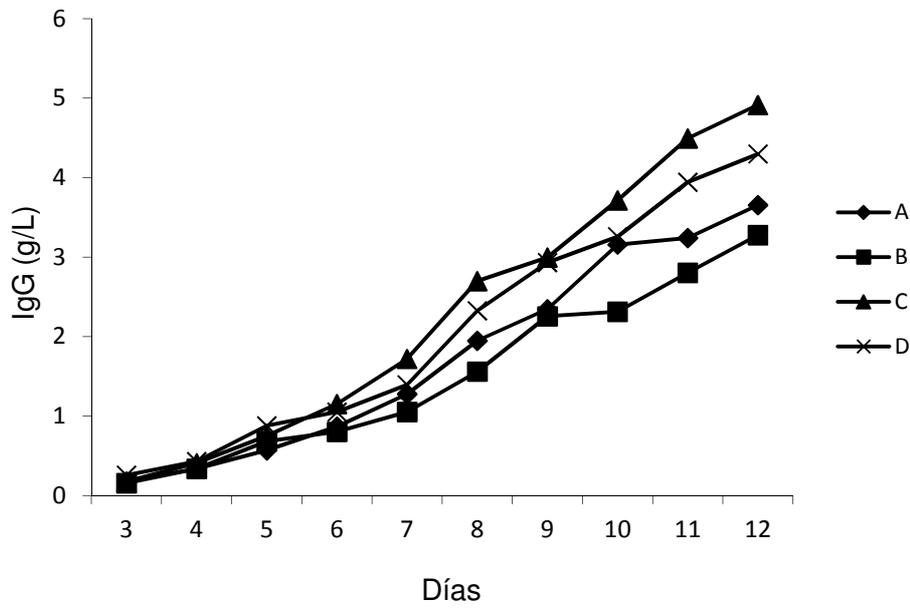


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**

# ES 2 525 768 A1

## SEQUENCE LISTING

<110> CURAXYS S.L.  
 <120> Proteínas recombinantes glicosiladas y método de producción  
 <130> 011/13  
 <160> 1  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 8841  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> vector v074  
 <400> 1  
 tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 60  
 acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 120  
 aagtgccacc tgacgtcgac ggatcgggag atctcccgat cccctatggt gcaactctcag 180  
 tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtatctg ctccctgctt gtgtgttggg 240  
 ggtcgcctgag tagtgcgcgga gcaaaattta agctacaaca aggcaaggct tgaccgacaa 300  
 ttgcatgaag aatctgctta gggttaggcg ttttgcgctg cttcgctagg tggtaaatat 360  
 tggccattag ccatattatt cattggttat atagcataaa tcaatattgg ctattggcca 420  
 ttgcatacgt tgtatccata tcataatatg tacatttata ttggctcatg tccaacatta 480  
 ccgccatggt gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta 540  
 gttcatagcc catatatgga gttccgcggt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc 600  
 tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg 660  
 ccaatagga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg 720  
 gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 780  
 tggccccgct ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac 840  
 atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg 900  
 cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg 960  
 agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc 1020  
 ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta 1080  
 gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgcat ccacgctggt ttgacctca tagaagacac 1140  
 cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cggatgattg gaagcttggg accgagctcg 1200  
 gatccgccac catggagtgg tccggcgtgt tcatgttcct gctgtccgtg accgctggcg 1260  
 tgcaactccga ggtgcagctg gtcgagtctg gcggcggact ggtgcagcct ggcggctccc 1320  
 tgcggctgtc ctgcgccgcc tccggcttca acatcaagga cacctacatc cactgggtgc 1380  
 ggcaggcccc tggcaagggc ctggagtggg tggcccggat ctaccctacc aacggctaca 1440

ES 2 525 768 A1

ccagatacgc cgactccgtg aagggccggt tcaccatctc cgccgacacc tccaagaaca 1500  
 ccgcctacct gcagatgaac tccctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tactgtctca 1560  
 gatggggcgg agatggcttc tacgccatgg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg 1620  
 tgcctccgc tagcaccaag ggcccttccg tgttcctct ggcccttcc tccaagtcca 1680  
 cctccggcgg caccgccgt ctgggctgcc tgggtaagga ctacttcct gagcctgtga 1740  
 ccgtgagctg gaactctggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcct gccgtgctgc 1800  
 agtctccgg cctgtactcc ctgtcctccg tggtgacagt gccttcctcc tccctgggca 1860  
 cccagaccta catctgaac gtgaaccaca agccttcaa caccaagggtg gacaagaagg 1920  
 tggagcctaa gtctgagc aagaccaca cctgccctcc ctgccctgcc cctgagctgc 1980  
 tgggcggacc ctccgtgttc ctgttcctc ctaagcctaa ggacaccctg atgatctccc 2040  
 ggaccctga ggtgacctgc gtggtggtgg acgtgtcca cgaggacca gaggtgaagt 2100  
 tcaattgta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagcct cgggaggaac 2160  
 agtacaactc cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga 2220  
 acggcaagga atacaagtgc aagggtcca acaaggcct gcctgcccc atcgaaaaga 2280  
 ccatctcaa ggccaagggc cagcctcgc agcctcaggt gtacaccctg cctccctccc 2340  
 gggacgagct gaccaagaac caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccctt 2400  
 ccgatatcgc cgtggagtgg gagtccaacg gccagcctga gaacaactac aagaccacc 2460  
 ctctgtgct ggactccgac ggctccttct tcctgtact caagctgacc gtggacaagt 2520  
 cccggtggca gcagggcaac gtgttctcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc 2580  
 actacacca gaagtcctg tccctgagcc ctggcaagtg ataacttagc gaattcaccg 2640  
 gtaccaagct taagttaaa ccgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca 2700  
 tctgttgtt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtccac tcccactgtc 2760  
 ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg 2820  
 gggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct 2880  
 ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcgaaagaa ccagctgggg ctctaggggg 2940  
 tatccccacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc 3000  
 gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcgc ccgctcctt cgcttcttc ccttccttc 3060  
 tcgccacgtt cgccggctt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctcct ttagggttcc 3120  
 gatttagtgc ttacggcac ctcgaccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta 3180  
 gtgggcatc gccctgatag acggttttc gcccttgac gttggagtcc acgttcttta 3240  
 atagtggact ctgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg 3300  
 atttataagg gatttgccg atttcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa 3360  
 aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa agtcccagc 3420  
 ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccaggtgtgg 3480

ES 2 525 768 A1

aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc 3540  
aaccatagtc ccgcccctaa ctccgccccat cccgccccta actccgcccc gttccgcccc 3600  
ttctccgccc catggctgac taatTTTTTT tatttatgca gaggccgagg ccgcctctgc 3660  
ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cTTTTTTGga ggcctaggct tttgcaaaaa 3720  
gctccccgga gcttgatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat gaggatcggt 3780  
tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 3840  
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct 3900  
gtcagcgagc gggcgccccg ttctTTTTgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga 3960  
actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgvcgagc 4020  
tgtgctcgac gttgtactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 4080  
gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 4140  
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcccc ttcgaccacc aagcgaaaaca 4200  
tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga 4260  
cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc 4320  
cgacggcgag gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga 4380  
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca 4440  
ggacatagcg ttggctacc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg 4500  
cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatgcct tctatgcct 4560  
tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgggtg ctacgagatt tcgattccac 4620  
cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgTTTT cgggacgccg gctggatgat 4680  
cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcggccac cccaacttgt ttattgcagc 4740  
ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag cTTTTTTTTc 4800  
actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc 4860  
gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggatcatag ctgtttcctg tgtgaaattg 4920  
ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg 4980  
tgcctaata gtagtaaac tcacattaat tgcggtgcgc tactgcccg ctttccagtc 5040  
gggaaacctg tcgtgccaga attgcatgaa gaatctgctt agggttaggc gttttgcgct 5100  
gcttcgctag gtggtcaata ttggcatta gccatattat tcattggtta tatagcataa 5160  
atcaatattg gctattggcc attgcatacg ttgtatccat atcataatat gtacatttat 5220  
attggctcat gtccaacatt accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag 5280  
taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccataatagg agttccgcgt tacataactt 5340  
acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgcc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg 5400  
acgtatgtt ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat 5460  
ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct 5520

ES 2 525 768 A1

attgacgtca atgacggtaa atggcccc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg 5580  
 gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg 5640  
 ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc 5700  
 caccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttcaaaa 5760  
 tgtcgtaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggtta ggcgtgtacg gtgggaggtc 5820  
 tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt 5880  
 tttgacctc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt 5940  
 ggaagcttg taccggtgaa ttcggcgcgc caccatggag tgggccggcg tgttcatggt 6000  
 cctgctgtcc gtgaccgctg gcgtgcactc cgacatccag atgaccagt cccctcctc 6060  
 cctgtccgc tccgtggcg accgggtgac catcacctgc cgggcctccc aggacgtgaa 6120  
 caccgccgtg gcctggtatc agcagaagcc tggcaaggcc cctaagctgc tgatctactc 6180  
 cgctccttc ctgtactccg gcgtgccttc ccggttctcc ggctcccggg ccggcaccga 6240  
 cttcacctg accatctct ccctgcagcc tgaggacttc gccacctact actgccagca 6300  
 gcactacacc acccctccta ccttcggcca gggaccaag gtggagatca agcggaccgt 6360  
 ggccgctcct tccgtgttca tcttccctcc ctccgacgag cagctgaaga gcggcaccgc 6420  
 cagcgtggtg tgctgtga acaacttcta ccctcgggag gccaaggtgc agtgaaggt 6480  
 ggacaacgcc ctgcagtcg gcaactcca ggaaagcgtc accgagcagg actccaagga 6540  
 cagcacctac tccctgtcct ccaccctgac cctgtccaag gccgactacg agaagcaca 6600  
 ggtgtacgcc tgcgaggtga cccaccaggg cctgtccagc cctgtgacca agtccttcaa 6660  
 ccggggcgag tgctgatgag ttaacggatc gatccgagct cggtagcaag cttaagttta 6720  
 aaccgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc 6780  
 cccgtgcctt ccttgacctt ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag 6840  
 gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag 6900  
 gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct 6960  
 atggcttctg aggcggaaag aaccagctgc attaataaat cggccaacgc gcggggagag 7020  
 gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 7080  
 ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat 7140  
 caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 7200  
 aaaaggccgc gttgctggcg tttttcata ggctccgccc ccctgacgag catcacaana 7260  
 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 7320  
 cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt 7380  
 ccgctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacagctgt aggtatctca 7440  
 gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 7500  
 accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtgaga cagcacttat 7560

ES 2 525 768 A1

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta	7620
cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct	7680
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac	7740
aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa	7800
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa	7860
actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt	7920
taaattaaat atgaagtttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca	7980
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca	8040
tagttgcctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc	8100
ccagtgtctg aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa	8160
accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc	8220
agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca	8280
acgttgttgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat	8340
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag	8400
cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac	8460
tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt	8520
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcatt tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt	8580
gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc	8640
tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat	8700
ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca	8760
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga	8820
cacggaaatg ttgaatactc a	8841



- ②① N.º solicitud: 201330946  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.06.2013  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P21/08** (2006.01)  
**C07K16/32** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HEIDEMANN, R. et al. "The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells". Febrero 200. Vol. 32, Nº 2, páginas 157-167, página 158, columna 1; materiales y métodos.	1-3, 6, 8, 12
Y		1-8
Y	ZHU, J. et al. "Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production". BIOTECHNOLOGY ADVANCES. Septiembre-Octubre 2012. Vol. 30. Nº 5, páginas 1158-1170, todo el documento, en particular apartado 2.1.	1-8
Y	WO 9700326 A1 (INTROGENE B.V. & RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN) 03.01.1997, página 11, líneas 3-14.	1-8
A	MICHIELS, J.-F., et al. "Characterization of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation". PROCESS BIOCHEMISTRY. 2011. Vol. 46, páginas 671-681, todo el documento.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
12.11.2014

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.11.2014

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 4, 5, 7, 9-11, 13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-3, 6, 8, 12	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 9-11, 13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8, 12	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

#### Consideraciones:

La invención consiste en un procedimiento para obtener en la línea celular PER.C6, un anticuerpo monoclonal con un perfil de glicosilación similar al que se obtendría en células CHO. Las células PER.C6 transfectadas con un vector que codifica el anticuerpo, se cultivan en un medio al que se adiciona un hidrolizado de proteínas de trigo y albúmina humana recombinante.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HEIDEMANN, R. et al. "The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells". Febrero 200. Vol. 32, Nº 2, páginas 157-167.	
D02	ZHU, J. et al. "Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production". BIOTECHNOLOGY ADVANCES. Septiembre-Octubre 2012. Vol. 30. Nº 5, páginas 1158-1170.	
D03	WO 9700326 A1 (INTROGENE B.V. & RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN)	03.01.1997
D04	MICHIELS, J.-F., et al. "Characterization of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation". PROCESS BIOCHEMISTRY. 2011. Vol. 46, páginas 671-68.	

El documento D01, describe el uso de peptonas, entre las que se encuentra un hidrolizado de gluten de trigo, como aditivos en los medios de cultivo de células de mamífero que se utilizan en la obtención de proteínas recombinantes. Se utiliza una línea celular BHK-21 y se comprueba que las peptonas, incluida la derivada de gluten de trigo, mejoran la producción celular y no afectan el perfil de glicosilación.

El documento D02, describe el uso de la línea celular PER.C6, en la industria farmacéutica para obtener proteínas y anticuerpos monoclonales (apartado 2.1).

El documento D03 describe la obtención de la línea celular PER.C6.

El documento D04, describe el uso de peptona de soja como aditivo en un medio de cultivo de células CHO. Las peptonas, son hidrolizados de proteínas de diversos orígenes que pueden mejorar el crecimiento celular y la producción de IFN- $\gamma$  (p. 673) aunque en este caso, no se ve afectado el perfil de glicosilación del producto obtenido (ver apartado 3.7. La peptona utilizada tiene una presencia de carbohidratos del 20% (ver apartado 3.3).

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

**NOVEDAD**

Reivindicaciones 1-3, 6, 8, 12

Las reivindicaciones, están redactadas de una forma general. Se refieren a un procedimiento para obtener una proteína recombinante glicosilada en el que se añade al medio de cultivo un hidrolizado de proteínas de cereal y en el que el perfil de glicosilación del producto obtenido puede variar dentro de unos márgenes muy amplios.

El documento D01, describe la adición de un hidrolizado de trigo a un medio de cultivo de células BHK-21 en las que se obtiene una proteína terapéutica glicosilada. De acuerdo a este documento, las reivindicaciones 1-3, 6, 8, 12, no cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

Reivindicaciones 4, 5, 7, 9-11, 13

Las reivindicaciones 4, 5, 7, 9-11 y, 13, cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

#### ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-8, 12

La obtención de la línea celular PER.C6 se describe en el documento D03. En el documento D02, se menciona su utilización en procesos de obtención de proteínas y anticuerpos monoclonales de interés en la industria farmacéutica. Las células PER.C6 tienen capacidad para producir modificaciones post-translacionales en los productos, similares a los correspondientes productos humanos.

Se considera que un experto en la materia podría poner en marcha un procedimiento para obtener un anticuerpo monoclonal, cultivando la línea celular PER.C6 transfectada con un vector que contiene el ADN que codifica dicho anticuerpo, en un medio de cultivo que ha sido suplementado con un hidrolizado de trigo. Los documentos D01 y D04, mencionan la utilización de hidrolizados de un cereal (trigo) y una leguminosa (soja) como aditivos en medios de cultivo de células BHK y CHO respectivamente. En ambos casos, se comprobó que la presencia de dichos hidrolizados en los medios de cultivo, no afectó al perfil de glicosilación del producto final. En la presente solicitud, no se menciona si el perfil de glicosilación obtenido en el producto final, está relacionado con las características de la línea celular, las del producto final, los aditivos o la combinación de todos ellos. Las reivindicaciones 1-8 y 12, tal como están redactadas, carecen de actividad inventiva y no cumplen los requisitos del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.

Reivindicaciones 9-11, 13

Las reivindicaciones 9-11, 13, cumplen el requisito de actividad inventiva del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.