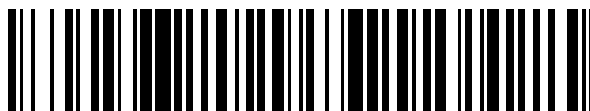


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 366**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2010 PCT/EP2010/066073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010 E 10771093 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2493922**

54 Título: **Procedimiento para la producción de una inmunoglobulina glucosilada**

30 Prioridad:

**26.10.2009 EP 09013455**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH y  
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRANZE, REINHARD;  
HIRASHIMA, CHIKASHI;  
LINK, THOMAS;  
TAKAGI, YOSHINORI;  
TAKUMA, SHINYA y  
TSUDA, YURIKO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 622 366 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 la producción de una inmunoglobulina glucosilada

5 En el presente documento se informa de un procedimiento en el campo de la producción de inmunoglobulinas en células, por el que se puede modificar el patrón de glucosilación de la inmunoglobulina producida basándose en las condiciones de cultivo.

**Antecedentes de la invención**

10 En los últimos años ha aumentado continuamente la producción de inmunoglobulinas y es probable que las inmunoglobulinas lleguen a ser el mayor grupo de tratamientos disponible para el tratamiento de diversas enfermedades en el futuro cercano. El impacto de las inmunoglobulinas surge de su especificidad, que comprende su función de reconocimiento y unión a dianas específicas, además de la activación de efectos específicos simultáneamente con o después de la unión de antígeno/receptor Fc.

15 El reconocimiento y unión a dianas específicas está mediado por la región variable de la inmunoglobulina. Otras partes de la molécula de inmunoglobulina, de las que se originan los efectos, son modificaciones postraduccionales, tales como el patrón de glucosilación. Las modificaciones postraduccionales tienen una influencia sobre la eficacia, estabilidad, potencial inmunogénico, unión, etc., de una inmunoglobulina. A propósito de esto, tienen que tratarse la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la inducción de la apoptosis.

20 Se ha informado que el patrón de glucosilación de inmunoglobulinas, es decir, la composición de sacárido y el número de glucoestructuras unidas, tiene una fuerte influencia sobre las propiedades biológicas (véase, por ejemplo, Jefferis, R., *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 11-16). Las inmunoglobulinas producidas por células de mamífero contienen un 2-3 % en masa de carbohidratos (Taniguchi, T., et al., *Biochem. J.* 24 (1985) 5551-5557). Esto es equivalente, por ejemplo, en una inmunoglobulina de clase G (IgG) a 2,3 restos de oligosacárido en una IgG de origen de ratón (Mizuochi, T., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 257 (1987) 387-394) y a 2,8 restos de oligosacárido en una IgG de origen humano (Parekh, R.B., et al., *Nature* 316 (1985) 452-457), de los que generalmente dos se localizan en la región Fc y los restantes en la región variable (Saba, J.A., et al., *Anal. Biochem.* 305 (2002) 16-31).

25 En la región Fc de una inmunoglobulina de clase G, se pueden introducir restos de oligosacárido a través de N-glucosilación en el resto de aminoácido 297, que es un resto de asparagina (indicado como Asn<sup>297</sup>). Youings et al. han mostrado que existe otro sitio de N-glucosilación en un 15 % a un 20 % de las moléculas de IgG policlonal en la región Fab (Youings, A., et al., *Biochem. J.*, 314 (1996) 621-630; véase también, por ejemplo, Endo, T., et al., *Mol. Immunol.* 32 (1995) 931-940). Debido al procesamiento de oligosacáridos no homogéneos, es decir, asimétricos, existen múltiples isoformas de una inmunoglobulina con diferente patrón de glucosilación (Patel, T.P., et al., *Biochem. J.* 285 (1992) 839-845; Ip, C.C., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1994) 387-399; Lund, J., et al., *Mol. Immunol.* 30 (1993) 741-748). Simultáneamente, la estructura y distribución de los oligosacáridos es tanto altamente reproducible (es decir, no aleatoria) como específica de sitio (Dwek, R.A., et al., *J. Anat.* 187 (1995) 279-292).

30 Algunas características de una inmunoglobulina están directamente asociadas a la glucosilación de la región Fc (véase por ejemplo Dwek, R.A., et al., *J. Anat.* 187 (1995) 279-292; Lund, J., et al., *J. Immunol.* 157 (1996) 4963-4969; Lund, J., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Wright, A. y Morrison, S.L., *J. Immunol.* 160 (1998) 3393-3402), tales como, por ejemplo, estabilidad térmica y solubilidad (West, C.M., *Mol. Cell. Biochem.* 72 (1986) 3-20), antigenicidad (Turco, S.J., *Arch. Biochem. Biophys.* 205 (1980) 330-339), inmunogenicidad (Bradshaw, J.P., et al., *Biochim. Biophys. Acta* 847 (1985) 344-351; Feizi, T. y Childs, R.A., *Biochem. J.* 245 (1987) 1-11; Schauer, R., *Adv. Exp. Med. Biol.* 228 (1988) 47-72), tasa de eliminación/semivida en la circulación (Ashwell, G. y Harford, J., *Ann. Rev. Biochem.* 51 (1982) 531-554; McFarlane, I.G., *Clin. Sci.* 64 (1983) 127-135; Baenziger, J.U., *Am. J. Path.* 121 (1985) 382-391; Chan, V.T. y Wolf, G., *Biochem. J.* 247 (1987) 53-62; Wright, A., et al., *Glycobiology* 10 (2000) 1347-1355; Rifai, A., et al., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 2171-2182; Zukier, L.S., et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 3905-3908) y actividad específica biológica (Jefferis, R. y Lund, J., en *Antibody Engineering*, ed. por Capra, J.D., *Chem. Immunol.* Basel, Karger, 65 (1997) 111-128).

35 Se han investigado los factores que influyen en el patrón de glucosilación, tales como, por ejemplo, la presencia de suero de ternero fetal en el medio de fermentación (Gawlitzeck, M., et al., *J. Biotechnol.* 42(2) (1995) 117-131), condiciones de tamponamiento (Müthing, J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 321-334), concentración de oxígeno disuelto (Saba, J.A., et al., *Anal. Biochem.* 305 (2002) 16-31; Kunkel, J.P., et al., *J. Biotechnol.* 62 (1998) 55-71; Lin, A.A., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 42 (1993) 339-350), posición y conformación del oligosacárido, además del tipo de célula huésped y estado de crecimiento celular (Hahn, T.J. y Goochee, C.F., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23982-23987; Jenkins, N., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 975-981), metabolismo de azúcares de nucleótidos celulares (Hills, A.E., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 239-251), limitaciones de nutrientes (Gawlitzeck, M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 536-544; Hayter, P.M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 327-335), especialmente restricción de glucosa (Tachibana, H., et al., *Cytotechnology* 16 (1994) 151-157) y pH extracelular (Borys, M.C., et al., *Bio/Technology* 11 (1993) 720-724).

Se han observado estructuras de oligomanosa elevadas, además de estructuras de oligosacárido truncadas, por la expresión recombinante de inmunoglobulinas, por ejemplo, en células NS0 de mieloma (Ip, C.C., et al., Arch. Biochem. Biophys. 308 (1994) 387-399; Robinson, D.K., et al., Biotechnol. Bioeng. 44 (1994) 727-735). En condiciones de privación de glucosa, se han observado variaciones en la glucosilación, tales como la unión de oligosacáridos precursores más pequeños o la ausencia completa de restos de oligosacárido, en células CHO, células 3T3 murinas, células de hepatoma de rata, células de riñón de rata y células de mieloma murino (Rearick, J.I., et al., J. Biol. Chem. 256 (1981) 6255-6261; Davidson, S.K. y Hunt, L.A., J. Gen. Virol. 66 (1985) 1457-1468; Gershman, H. y Robbins, P.W., J. Biol. Chem. 256 (1981) 7774-7780; Baumann, H. y Jahreis, G.P., J. Biol. Chem. 258 (1983) 3942-3949; Strube, K.-H., et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 3762-3771; Stark, N.J. y Heath, E.C., Arch. Biochem. Biophys. 192 (1979) 599-609). Se informó de una estrategia basada en bajas concentraciones de glutamina/glucosa por Wong, D.C.F., et al., Biotechnol. Bioeng. 89 (2005) 164-177.

La solicitud de patente japonesa JP 62-258252 informa de un cultivo de células de mamífero por perfusión, mientras que el documento US 5.443.968 informa de un procedimiento de cultivo semicontinuo para células que secretan proteína. En el documento WO 98/41611 se informa de un procedimiento de cultivo de células eficaz para adaptar las células a un estado metabólico caracterizado por baja producción de lactato. Se informa de un procedimiento para cultivar células para producir sustancias en el documento WO 2004/048556. Elbein, A.D., Ann. Rev. Biochem. 56 (1987) 497-534, informa que las células de mamífero, cuando se incuban en ausencia de glucosa, transfieren estructuras que contienen manosa-5 en lugar de estructuras que contienen manosa-9 a proteínas. Se informa de la dependencia de las influencias de pCO<sub>2</sub> durante la limitación de glucosa en el crecimiento, metabolismo y producción de IgG de células CHO por Takuma, S., et al. en Biotechnol. Bioeng. 97 (2007) 1479-1488.

En el documento US 2006/127975 se informa de un procedimiento de cultivo de células para producir sustancias. En el mismo, se cultiva una línea celular que produce sustancias mientras se alimenta un medio nutritivo de tal manera que se produce limitación de glucosa en la solución de cultivo. Se informa de manipulación de la región Fc por Peipp, M., et al., en Handbook of Therapeutic Antibodies (Wiley-VCH, Weinheim, páginas 171-196). Venkiteshwarain, A., informó de Tocilizumab (MABS 1 (2009) 432-438).

### 30 Sumario

Se ha encontrado que la cantidad de la glucoestructura de manosa-5 en el patrón de glucosilación de un polipéptido producido por una célula eucariota se puede modificar basándose en la cantidad de glucosa proporcionada a la célula en el procedimiento de cultivo. Reduciendo la cantidad de glucosa disponible, por ejemplo, cambiando el valor de DGL de 1,0 a valores más pequeños de, por ejemplo, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4 o 0,2, se puede obtener una modificación en la cantidad de glucoestructura de manosa-5 en el patrón de glucosilación. El valor de DGL o, respectivamente, la cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo tiene que mantenerse constante y a un valor reducido definido por unidad de tiempo.

En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de un polipéptido, en un modo de realización de una inmunoglobulina, en una célula eucariota, que comprende las siguientes etapas

- a) proporcionar una célula eucariota que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido,
- b) cultivar la célula en condiciones en las que el grado de limitación de glucosa (DGL) se mantiene constante y en las que el DGL es inferior a 0,8, y
- c) recuperar el polipéptido del cultivo,

en el que la fracción del polipéptido con una glucoestructura de manosa-5 es de un 10 % o menos de la suma que comprende la cantidad del polipéptido con una glucoestructura de manosa-5, la cantidad de la isoforma G(0) del polipéptido, la cantidad de la isoforma G(1) del polipéptido y la cantidad de la isoforma G(2) del polipéptido.

En un modo de realización, el DGL se mantiene constante en el intervalo de 0,8 a 0,2. En otro modo de realización, el DGL se mantiene constante en el intervalo de 0,6 a 0,4. En otro modo de realización, la fracción del polipéptido con una glucoestructura de manosa-5 es de un 8 % o menos de la suma que comprende el polipéptido con una glucoestructura de manosa-5, la isoforma G(0) del polipéptido, la isoforma G(1) del polipéptido y la isoforma G(2) del polipéptido. En otro modo de realización adicional, el polipéptido es una inmunoglobulina, en un modo de realización una inmunoglobulina de clase G o E.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un procedimiento para la producción de una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina,
- b) cultivar la célula en un medio de cultivo en el que la cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo

por unidad de tiempo se mantiene constante y limitada a menos de un 80 % y más de un 20 % de la cantidad que se podría utilizar como máximo por las células en el medio de cultivo por unidad de tiempo, por el que esta cantidad constante está disponible en todas las unidades de tiempo del procedimiento en el que se realiza esta alimentación de glucosa restringida, y

5

- c) recuperar la inmunoglobulina de las células o el medio de cultivo.

10

En un modo de realización, la cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo por unidad de tiempo se mantiene constante y limitada a un valor en el intervalo de un 60 % a un 40 %. En otro modo de realización, las células en el medio de cultivo son las células viables en el medio de cultivo.

15

En un modo de realización de los aspectos, como se informa en el presente documento, la célula eucariota se selecciona de células CHO, células NS0, células HEK, células BHK, células de hibridoma, células PER.C6<sup>®</sup>, células de insecto o células Sp2/0. En un modo de realización, la célula eucariota es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En otro modo de realización de los aspectos, como se informa en el presente documento, el cultivo es a un valor de pH en el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 7,2.

20

En otro modo de realización adicional de los aspectos, como se informa en el presente documento, el cultivo es un cultivo continuo o semicontinuo. Los procedimientos pueden comprender, en otro modo de realización, una etapa final de purificación del polipéptido. En otro modo de realización adicional, la célula se cultiva durante seis a veinte días o durante seis a quince días. En otro modo de realización, la célula se cultiva durante seis a ocho días.

25

En el presente documento se informa de una composición que comprende una inmunoglobulina, en la que la composición se ha preparado con un procedimiento, como se informa en el presente documento.

30

En un modo de realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-IL-6R. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-IL-6R comprende Tocilizumab. En otro modo de realización, la glucoestructura de manosa-5 unida al anticuerpo anti-IL-6R es de un 8 % o menos. En otro modo de realización adicional, la glucoestructura de manosa-5 es de un 6 % o menos. En otro modo de realización, la glucoestructura de manosa-5 es de un 4 % o menos. En otro modo de realización, la glucoestructura G(0) unida al anticuerpo anti-IL-6R está en el intervalo de un 40 % a un 46 % y la glucoestructura G(2) unida al anticuerpo anti-IL-6R está en el intervalo de un 9 % a un 11 %.

### **Descripción detallada**

35

En el presente documento se informa de un procedimiento para la producción de una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

40

- a) cultivar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina en un medio de cultivo a un DGL constante inferior a 0,8 (es decir, la cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo es constante y a un 80 % o menos de la cantidad de glucosa que se puede ser utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo), y

- b) recuperar la inmunoglobulina de las células o el medio de cultivo.

45

Con el procedimiento, como se informa en el presente documento, se puede obtener una inmunoglobulina en el que la cantidad de la inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5 depende del valor de DGL ajustado, y en el que la cantidad es la fracción de la suma de la cantidad de la inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5, y de la isoforma G(0) de la inmunoglobulina, y de la isoforma G(1) de la inmunoglobulina, y de la isoforma G(2) de la inmunoglobulina. En un modo de realización, el DGL es de 0,8 a 0,2. En este modo de realización, la fracción es de un 10 % o menos. En otro modo de realización, el DGL es de 0,6 a 0,4. En este modo de realización, la fracción es de un 6 % o menos. Con el procedimiento, como se informa en el presente documento, se puede obtener una inmunoglobulina en la que la fracción de la inmunoglobulina que tiene una glucoestructura de manosa-5 es de un 10 % o menos de la suma que comprende la cantidad de la inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5, la cantidad de la isoforma G(0) de la inmunoglobulina, la cantidad de la isoforma G(1) de la inmunoglobulina y la cantidad de la isoforma G(2) de la inmunoglobulina. En otro modo de realización, la fracción es la fracción en % de área determinada en un procedimiento de cromatografía de líquidos. En un modo de realización, el DGL se mantiene en el intervalo de 0,8 a 0,2. En otro modo de realización, el DGL se mantiene en el intervalo de 0,6 a 0,2. En otro modo de realización adicional, el DGL se mantiene en el intervalo de 0,6 a 0,4. En un modo de realización, la cantidad de glucosa que se puede ser utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo es la cantidad promedio de glucosa que se utiliza en un cultivo en el que todos los compuestos están disponibles en exceso, es decir, ningún compuesto es limitante del crecimiento de la célula, determinado basándose en al menos cinco cultivos. En un modo de realización, la fracción se determina en el día siete de cultivo.

60

65

Se describen procedimientos y técnicas conocidos para un experto en la técnica, que son útiles para llevar a cabo la presente invención, por ejemplo, en Ausubel, F.M. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I a III (1997), Wiley and Sons; Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Glover, N.D. (ed.), DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (1985); Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture (1986); Miller, J.H. y Calos, M.P. (eds.), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1987); Watson, J.D., et al., Recombinant DNA, Segunda Edición, N.Y., W.H. Freeman and Co (1992); Winnacker, E.L., From Genes to Clones, N.Y., VCH Publishers (1987); Celis, J. (ed.), Cell Biology, Segunda Edición, Academic Press (1998); Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, Segunda Edición, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987).

El uso de tecnología de ADN recombinante permite la producción de numerosos derivados de un polipéptido. Dichos derivados se pueden modificar, por ejemplo, en posiciones de aminoácidos individuales o varias posiciones de aminoácidos por sustitución, alteración o intercambio. La derivatización se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio de mutagénesis dirigida al sitio. Dichas variaciones se pueden llevar a cabo fácilmente por un experto en la técnica (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE. UU. (2001); Hames, B.D. y Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach (1985) IRL Press, Oxford, Inglaterra).

La expresión "ácido nucleico" indica una molécula de ácido nucleico que existe de forma natural o que existe parcial o completamente de forma no natural que codifica un polipéptido. El ácido nucleico puede estar constituido por fragmentos de ADN que se aíslan o sintetizan por medios químicos. El ácido nucleico se puede integrar en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un plásmido de expresión o el genoma/cromosoma de una célula eucariota. El término "plásmido" incluye plásmidos lanzadera y de expresión. Típicamente, el plásmido también comprenderá una unidad de propagación procariota que comprende un origen de replicación (por ejemplo, origen de replicación ColE1) y un marcador de selección (por ejemplo, gen de resistencia a ampicilina o tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, del plásmido en células procariotas. Para un experto en la técnica, son muy conocidos los procedimientos para convertir una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de un polipéptido, en un ácido nucleico correspondiente que codifica la secuencia de aminoácidos respectiva. Por tanto, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales y, asimismo, por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificada por la misma.

La expresión "casete de expresión" indica un ácido nucleico que contiene los elementos necesarios para la expresión y, opcionalmente, para la secreción de al menos el gen estructural contenido en/de una célula, tal como un promotor, sitio de poliadenilación y regiones no traducidas 3' y 5'.

El término "gen" indica, por ejemplo, un segmento en un cromosoma o en un plásmido, que es necesario para la expresión de un polipéptido. Además de la región codificante, un gen comprende otros elementos funcionales que incluyen un promotor, intrones y uno o más terminadores de la transcripción. Un "gen estructural" indica la región codificante de un gen sin una secuencia señal.

El término "expresión" indica la transcripción y la traducción de un gen estructural dentro de una célula. El nivel de transcripción de un gen estructural en una célula se puede determinar basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de un ácido nucleico seleccionado se puede cuantificar por PCR o por hibridación de Northern (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (anteriormente)). Un polipéptido codificado por un ácido nucleico se puede cuantificar por diversos procedimientos, por ejemplo, por ELISA, determinando la actividad biológica del polipéptido o empleando procedimientos que son independientes de dicha actividad, tal como transferencia de Western o radioinmunoensayo, usando anticuerpos que reconocen y se unen al polipéptido (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (anteriormente)).

El término "célula" indica una célula en la que se ha introducido un ácido nucleico que codifica un polipéptido, en un modo de realización de un polipéptido heterólogo. El término "célula" incluye tanto células procariotas usadas para la propagación de plásmidos/vectores como células eucariotas usadas para la expresión del gen estructural. En un modo de realización, una célula eucariota para la expresión de una inmunoglobulina es una célula de mamífero. En otro modo de realización, la célula de mamífero se selecciona de células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6<sup>®</sup> y células de hibridoma. Una célula eucariota se puede seleccionar además de células de insecto, tales como células de oruga (*Spodoptera frugiperda*, células sf), células de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), células de mosquito (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*) y células de gusano de seda (*Bombyx mori*) y similares.

El término "polipéptido" indica un polímero de restos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos, tanto si se producen de forma natural como sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 restos de aminoácido se pueden denominar "péptidos". Los polipéptidos de más de 100 restos de aminoácido o agregados covalentes y no covalentes que comprenden más de un polipéptido se pueden denominar "proteínas". Los polipéptidos pueden comprender componentes que no son aminoácidos, tales como grupos carbohidrato. Los componentes que no son aminoácidos se pueden añadir al polipéptido por la célula en la que se produce el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su secuencia de aminoácidos en la dirección del extremo N al C. Las adiciones a éstos, tales como los grupos carbohidrato, generalmente no se especifican, pero sin embargo puede estar presentes.

La expresión "ADN heterólogo" o "polipéptido heterólogo" indica una molécula de ADN o un polipéptido, o una población de moléculas de ADN o una población de polipéptidos, que no existen de forma natural dentro de una célula dada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula particular pueden contener ADN derivado de la especie de la célula (es decir, ADN endógeno) siempre que el ADN se combine con el ADN que no es del huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN que no es de la célula, por ejemplo, que codifica un polipéptido, enlazado de forma funcional a un segmento de ADN de la célula, por ejemplo, que comprende un promotor, se considera que es una molécula de ADN heterólogo. Asimismo, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen estructural endógeno enlazado de forma funcional a un promotor exógeno. Un polipéptido codificado por una molécula de ADN heterólogo es un polipéptido "heterólogo".

La expresión "plásmido de expresión" indica un ácido nucleico que comprende al menos un gen estructural que codifica un polipéptido que se va a expresar. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmido procariota, que incluye un origen de replicación y un marcador de selección, por ejemplo, para *E. coli*, un marcador de selección eucariota y uno o más casetes de expresión para la expresión del (de los) gen(es) estructural(es) de interés, que comprende cada uno, a su vez, un promotor, al menos un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se pone normalmente bajo el control de un promotor, y dicho gen estructural debe estar "enlazado de forma funcional a" el promotor. Similarmente, un elemento regulador y un promotor central están enlazados de forma funcional si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

La expresión "polipéptido aislado" indica un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares asociados, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas o no proteínicas, que no están asociadas covalentemente al polipéptido. Típicamente, una preparación de un polipéptido aislado contiene en, ciertos modos de realización, el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente un 80 % pura, al menos aproximadamente un 90 % pura, al menos aproximadamente un 95 % pura, superior a un 95 % pura o superior a un 99 % pura. Una forma de mostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es por la aparición de una única banda después de electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-page) de la preparación y tinción con azul brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, de forma alternativa, formas glucosiladas o derivatizadas.

Las inmunoglobulinas, en general, están asignadas a cinco clases diferentes: IgA (inmunoglobulina de clase A), IgD, IgE, IgG e IgM. Entre estas clases, las inmunoglobulinas se diferencian en su estructura y/o secuencia de aminoácidos global, pero tienen los mismos elementos estructurales. Las inmunoglobulinas completas están constituidas por dos pares de cadenas de polipéptido, que comprende, cada una, una cadena de polipéptido ligera de inmunoglobulina (abreviado: cadena ligera) y una cadena de polipéptido pesada de inmunoglobulina (abreviado: cadena pesada). A su vez, las cadenas comprenden una región variable y una región constante. En una cadena ligera ambas regiones consisten en un dominio, mientras que en una cadena pesada la región variable consiste en un dominio y la región constante comprende hasta cinco dominios (en la dirección del extremo N al C): el dominio C<sub>H1</sub>, opcionalmente el dominio de región bisagra, el dominio C<sub>H2</sub>, el dominio C<sub>H3</sub> y opcionalmente el dominio C<sub>H4</sub>. Una inmunoglobulina se puede diseccionar en una región Fab y una Fc. La cadena ligera entera, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio C<sub>H1</sub> se denominan región Fab (región de unión al antígeno del fragmento). La región Fc comprende el dominio C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y opcionalmente C<sub>H4</sub>.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" indica una proteína que consiste en uno o más polipéptidos. Los genes de inmunoglobulina codificantes incluyen los diferentes genes de la región constante, además de los innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. El término "inmunoglobulina" comprende, en un modo de realización, anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos, tales como una cadena pesada aislada o una región constante de la cadena pesada, además de polipéptidos de fusión que comprenden al menos un dominio C<sub>H2</sub> de la cadena pesada de inmunoglobulina. En un modo de realización del procedimiento, como se informa en el presente documento, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina completa, en otro modo de realización la inmunoglobulina es una región Fc de una inmunoglobulina completa. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.

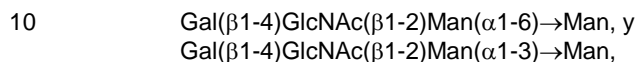
La expresión "fragmento de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos el dominio C<sub>H2</sub> de una cadena pesada delta, épsilon o alfa de inmunoglobulina y/o el dominio C<sub>H3</sub> de una cadena pesada épsilon o delta de inmunoglobulina. También están englobados derivados y variantes de los mismos en los que el motivo de N-glucosilación Asn-Xaa-Ser/Thr en el dominio C<sub>H2</sub> o C<sub>H3</sub> no está cambiado.

La expresión "conjugado de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos el dominio C<sub>H2</sub> de una cadena pesada delta, épsilon o alfa de inmunoglobulina y/o el dominio C<sub>H3</sub> de una cadena pesada épsilon o delta de inmunoglobulina fusionado con un polipéptido que no es de inmunoglobulina. En el mismo, el motivo de N-glucosilación Asn-Xaa-Ser/Thr en el dominio C<sub>H2</sub> o C<sub>H3</sub> no está cambiado.

Los oligosacáridos unidos a Asn<sup>297</sup> (IgG, IgE) o Asn<sup>263</sup> (IgA) de un dominio C<sub>H</sub>2 y/o a Asn<sup>394</sup>, Asn<sup>445</sup> o Asn<sup>496</sup> (IgE, IgD) de un dominio C<sub>H</sub>3 de una cadena pesada de inmunoglobulina tienen una estructura biantenaria (Mizuochi, T., et al., Arch. Biochem. Biophys. 257 (1987) 387-394), es decir, consisten en una estructura central de



con un enlace Fuc(α1-6) opcional en el resto GlcNAc terminal. Dos brazos externos están conectados a la manosa terminal de la estructura central que tiene la fórmula



en la que los restos de galactosa terminales son opcionales (Man = manosa, GlcNAc = N-acetilglucosa, Gal = galactosa; Fuc = fucosa).

15

**Tabla 1:** Sitios de glucosilación de inmunoglobulinas.

clase de inmunoglobulina	resto al que se puede unir una glucoestructura
IgG	Asn 297
IgE	Asn 255, Asn 297, Asn 361, Asn 371, Asn 394
IgA	Asn 263, Asn 459
IgD	Asn 445, Asn 496
IgM	Asn 395

La expresión "la cantidad de la isoforma G(0) de la inmunoglobulina, la cantidad de la isoforma G(1) de la inmunoglobulina y la cantidad de la isoforma G(2) de la inmunoglobulina" indica la suma de las cantidades de los diferentes oligosacáridos biantenarios heterogéneos N-unidos a una asparagina (Asn) de una inmunoglobulina. La isoforma G(2) tiene un resto de galactosa terminal en cada uno de los brazos externos de la estructura de oligosacárido, la isoforma G(1) posee solo un resto de galactosa en cualquiera del brazo externo unido (α1-6) o (α1-3) y la isoforma G(0) no posee resto de galactosa en ninguno de los brazos externos.

La expresión "glucoestructura de manosa-5" indica una estructura de oligomanosa unida a un resto de Asn de un polipéptido que comprende o que consiste en cinco restos de manosa y dos restos centrales de N-acetilglucosa, que forman una estructura triantenaria.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un procedimiento para la producción de una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

a) cultivar una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican la inmunoglobulina en un medio de cultivo en el que la cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo por unidad de tiempo se mantiene constante y limitada a un valor inferior a un 80 % y superior a un 20 % de la cantidad que se podría ser utilizar como máximo por las células eucariotas en el cultivo por unidad de tiempo, por el que esta cantidad constante está disponible en todas las unidades de tiempo del procedimiento en el que se realiza esta alimentación de glucosa limitada, y

b) recuperar la inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo y producir de ese modo una inmunoglobulina.

Con este procedimiento se obtiene una inmunoglobulina que comprende como máximo un 10 % de una inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5. El 10 % se calcula basándose en la suma de la cantidad de la inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5, la cantidad de la isoforma G(0) de la inmunoglobulina, la cantidad de la isoforma G(1) de la inmunoglobulina y la cantidad de la isoforma G(2) de la inmunoglobulina.

Las expresiones "grado de limitación de glucosa" y su abreviatura "DGL", que se pueden usar indistintamente en el presente documento, indican la proporción de la tasa de consumo de glucosa específica existente de una célula individual en un cultivo con respecto a la tasa máxima de consumo de glucosa específica conocida de la célula individual o una célula individual del mismo tipo. El grado de limitación de glucosa se define como

$$DGL = \frac{qGlc}{qGlc_{\text{máx}}}$$

con    qGlc = tasa de consumo de glucosa específica existente de una célula individual;

$qGlc_{m\acute{a}x}$  = tasa máxima de consumo de glucosa específica conocida para esta célula individual o una célula individual del mismo tipo.

5 El DGL puede variar entre  $DGL_{mantenimiento}$  y 1 por lo que  $DGL_{mantenimiento}$  ( $< 1$  y  $> 0$ ) indica limitación del crecimiento completa y 1 indica ausencia de limitación o exceso de glucosa completo.

10 La introducción de glucoestructuras en polipéptidos, por ejemplo, inmunoglobulinas, es una modificación postraduccional. Debido a la incompletitud del procedimiento de glucosilación de la célula respectiva, cada polipéptido expresado se obtiene con un patrón de glucosilación que comprende diferentes glucoestructuras. Por tanto, un polipéptido se obtiene de una célula que lo expresa en forma de una composición que comprende formas glucosiladas de forma diferente del polipéptido, es decir, con la misma secuencia de aminoácidos. La suma de las glucoestructuras individuales se indica como el patrón de glucosilación que comprende, por ejemplo, polipéptidos con glucoestructuras completamente ausentes, glucoestructuras procesadas de forma diferente y/o glucoestructuras compuestas de forma diferente.

15 Una glucoestructura es la glucoestructura de manosa-5 (también indicada como de alta manosa, Man5, M5 u oligo-manosa). Se ha informado que la fracción de polipéptidos producidos de forma recombinante con la glucoestructura de manosa-5 aumenta con tiempo de cultivo prolongado o en condiciones de privación de glucosa (Robinson, D.K., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 727-735; Elbein, A.D., *Ann. Rev. Biochem.* 56 (1987) 497-534).

20 Se ha encontrado que la cantidad de la glucoestructura de manosa-5 en el patrón de glucosilación de un polipéptido producido por una célula eucariota se puede modificar basándose en la cantidad de glucosa proporcionada a la célula en el procedimiento de cultivo. Se ha encontrado que reduciendo la cantidad de glucosa, es decir, cambiando el valor de DGL de 1,0 a valores más pequenos de, por ejemplo, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4 o 0,2, se puede lograr una modificación en la cantidad de glucoestructura de manosa-5 en el patrón de glucosilación. En un modo de realización, el valor de DGL se mantiene constante a un valor dentro de un intervalo, tal como de 0,8 a 0,2, o de 0,6 a 0,4. Es decir, la producción de un polipéptido, en un modo de realización de una inmunoglobulina, se puede realizar en condiciones en las que est disponible una cantidad de glucosa limitada para la célula cultivada para obtener el polipéptido con una cantidad definida de la glucoestructura de manosa-5 en el patrón de glucosilación. Se ha encontrado que un cultivo con una cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo de un 80 % o menos de la cantidad de glucosa que se puede ser utiliza como máximo por las células por unidad de tiempo, en un modo de realización cultivando exponencialmente las células, es decir, con un DGL de 0,8 o menos, proporciona un polipéptido con un patrón de glucosilación en el que la cantidad de la glucoestructura de manosa-5 está cambiada en comparación con un cultivo con un DGL de 1,0. En un modo de realización, la densidad celular es la densidad de células viables. Adicionalmente, se aumenta el rendimiento de polipéptido obtenido.

35 La expresión "la cantidad de glucosa que se puede ser utiliza como máximo por la célula por unidad de tiempo" indica la cantidad de glucosa que se consume o utiliza o metaboliza como máximo por unidad de tiempo por una célula individual en condiciones de crecimiento óptimas en la fase de crecimiento exponencial en un cultivo sin ninguna limitación de nutrientes. Por tanto, la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo se puede determinar determinando la cantidad de glucosa que se metaboliza por unidad de tiempo por una célula en condiciones de crecimiento óptimas en la fase de crecimiento exponencial en un cultivo sin ninguna limitación de nutrientes. Un aumento adicional de la cantidad disponible de glucosa no aumentará adicionalmente, es decir, cambiar, la cantidad de glucosa que se puede ser utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo. Esta cantidad define el nivel máximo de consumo de glucosa de una célula individual. Esto no indica que una versión modificada genéticamente de la célula no pueda tener un nivel máximo, incluso más alto, de consumo de glucosa. De forma alternativa, la cantidad de glucosa que se puede ser utiliza como máximo por la célula por unidad de tiempo se puede determinar basándose en los cultivos previos y los datos sometidos a control.

50 El procedimiento, como se informa en el presente documento, es particularmente simple de llevar a cabo, asociado a un esfuerzo mínimo de medición y control, y particularmente económico.

55 Sin restricciones, por ejemplo, suministro de nutrientes insuficiente, las células cultivadas crecen y consumen nutrientes a tasas máximas de una manera poco rentable. Uno de los nutrientes de medio de cultivo consumido es la glucosa, que se metaboliza por las células cultivadas para producir energía y elementos estructurales para el metabolismo de las células. En presencia de un exceso de glucosa, el metabolismo de la célula está funcionando a la máxima tasa de recambio para la glucosa. La cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo se puede determinar, por ejemplo, a partir del consumo de glucosa de células en crecimiento exponencial en presencia de un exceso de glucosa cultivadas con o en las mismas condiciones de cultivo que también se usarán en el cultivo con glucosa limitada, es decir, con una cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo que es más pequena que la que se puede utilizar por la célula. Esta cantidad máxima se puede calcular fácilmente determinando la densidad celular y la concentración de glucosa al principio y al final de un intervalo de tiempo fijo. El valor normalmente está en un intervalo de 0,006 a 190 mmol/hora/10<sup>9</sup> células (Baker, K.N., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2001) 188-202; documento WO 98/41611; Mthing, J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 321-334; documento WO 2004/048556). En un modo de realización, la  $qGlc_{m\acute{a}x}$  es aproximadamente 0,142 mmol/hora/10<sup>9</sup> células en condiciones de procedimiento estándar a pH 7,0.



El procedimiento, como se informa en el presente documento, se realiza en condiciones en las que la cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo se mantiene constante y a un 80 % o menos de la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo ( $0,8 \geq \text{DGL} > 0$ ), en un modo de realización, la cantidad de glucosa disponible se mantiene constante y a un 60 % o menos ( $0,6 \geq \text{DGL} > 0$ ), en otro modo de realización a un 50 % o menos ( $0,5 \geq \text{DGL} > 0$ ) y en otro modo de realización adicional a aproximadamente un 40 %. El término "aproximadamente", como se usa dentro de la presente solicitud, indica que el valor no es un valor exacto, es simplemente el punto central de un intervalo en el que el valor puede variar hasta un 10 %, es decir, la expresión "aproximadamente un 40 %" indica un intervalo de un 44 % a un 36 % ( $\text{DGL} = 0,44 - 0,36$ ).

En un modo de realización, el cultivo es con una cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo que se mantiene constante en un intervalo entre un 80 % y un 10 % de la cantidad de glucosa que se puede ser utilizar como máximo por la célula por unidad de tiempo ( $0,8 \geq \text{DGL} \geq 0,1$ ). En otro modo de realización, la cantidad de glucosa disponible se mantiene constante en un intervalo entre un 60 % y un 10 % ( $0,6 \geq \text{DGL} \geq 0,1$ ). En otro modo de realización, la cantidad de glucosa disponible se mantiene constante en un intervalo entre un 50 % y un 10 % ( $0,5 \geq \text{DGL} \geq 0,1$ ). En otro modo de realización, la cantidad de glucosa disponible se mantiene constante en un intervalo entre un 45 % y un 20 % ( $0,45 \geq \text{DGL} \geq 0,2$ ). En también un modo de realización, la cantidad de glucosa disponible se mantiene entre un 80 % y un 60 % ( $0,8 \geq \text{DGL} \geq 0,6$ ).

En un modo de realización, el procedimiento comprende la etapa de cultivar la célula en condiciones en las que el DGL se mantiene constante y a un valor de aproximadamente 0,4, por lo que el cultivo comprende empezar con un DGL entre 1,0 y 0,5, reducir el DGL a un valor de aproximadamente 0,4, y mantener el DGL constante después de esto. En un modo de realización, reducir el DGL está dentro de un periodo de tiempo de 100 horas. La expresión "mantener el DGL constante" y equivalentes gramaticales de la misma indican que el valor de DGL se mantiene durante un periodo de tiempo, es decir, la variación del valor de DGL está dentro de un 10 % del valor (véase, por ejemplo, la figura 2).

La inmunoglobulina se recupera después de la producción, directamente o después de la disgregación de la célula. La inmunoglobulina recuperada se purifica, en un modo de realización, con un procedimiento conocido para un experto en la técnica. Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan de forma generalizada para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o de adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenófilas, o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

Por ejemplo, un procedimiento de purificación para las inmunoglobulinas, en general, comprende una parte cromatográfica de múltiples etapas. En la primera etapa, los polipéptidos que no son inmunoglobulina se separan de la fracción de inmunoglobulina por una cromatografía de afinidad, por ejemplo, con proteína A o G. Después de esto, por ejemplo, se puede realizar cromatografía de intercambio iónico para separar las clases de inmunoglobulina individuales y para eliminar las trazas de proteína A, que ha coeluido de la primera columna. Finalmente, se emplea una etapa cromatográfica para separar monómeros de inmunoglobulina de multímeros y fragmentos de la misma clase.

Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos para un experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, Heftmann, E. (ed.), Chromatography, 5.<sup>a</sup> edición, Parte A: Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, Nueva York, (1992); Deyl, Z. (ed.), Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Elsevier Science BV, Amsterdam, Países Bajos, (1998); Poole, C. F. y Poole, S. K., Chromatography Today, Elsevier Science Publishing Company, Nueva York (1991); Scopes, R.K., Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); o Ausubel, F. M., et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1990).

En un modo de realización, la inmunoglobulina recuperada se caracteriza por la cantidad de la inmunoglobulina que tiene una glucoestructura de manosa-5 con respecto a la cantidad de una población, que es la suma de la cantidad de la inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5, la isoforma G(0) de la inmunoglobulina, la isoforma G(1) de la inmunoglobulina y la isoforma G(2) de la inmunoglobulina. Con el procedimiento, como se informa en el presente documento, la cantidad de la inmunoglobulina con una glucoestructura de manosa-5 es, en un modo de realización, un 10 % o menos de la población, en otro modo de realización, un 8 % o menos de la población, y en otro modo de realización, un 6 % o menos de la población.

El procedimiento, como se informa en el presente documento, se puede realizar, en ciertos modos de realización, como cultivo continuo, como cultivo semicontinuo o como combinación de los mismos, por ejemplo, empezando

como cultivo semicontinuo con paso posterior a un cultivo continuo. Adicionalmente, el procedimiento, como se informa en el presente documento, se puede realizar de diferentes formas. Por ejemplo, en un modo de realización, antes del cultivo en condiciones con un valor de DGL inferior a 1,0, es decir, por ejemplo, en condiciones en las que la cantidad disponible de glucosa es de un 80 % o menos de la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por la célula en el cultivo por unidad de tiempo, el cultivo es con un exceso de glucosa, es decir, un valor de DGL de 1,0. En otro modo de realización, el cultivo se inicia con una cantidad de glucosa igual a la contenida en medios de cultivo estándar, por ejemplo, entre 1 y 10 g/l de medio de cultivo, por ejemplo, para obtener una densidad celular predeterminada, por ejemplo, en un modo de realización, de  $10^5$  células/ml. En otro modo de realización, el inicio del cultivo es en presencia de una cantidad en exceso de glucosa, es decir, un DGL de 1,0, y se añade una cantidad de glucosa por unidad de tiempo, que es de un 80 % o menos de la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por unidad de tiempo por las células en el cultivo. En otro modo de realización, la alimentación empieza una vez la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo ha disminuido a o por debajo de un valor prefijado en el cultivo. En los dos últimos casos, la cantidad de glucosa disponible en el cultivo se reduce por el metabolismo de las células en el cultivo.

En un modo de realización, la cantidad de glucosa que está disponible o se añade por unidad de tiempo y que es inferior a la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo, se mantiene al mismo valor, es decir, constante, en el procedimiento, como se informa en el presente documento. Por ejemplo, si está disponible una cantidad de un 50 % de la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por unidad de tiempo, esta cantidad está disponible en todas las unidades de tiempo del procedimiento en el que se realiza una alimentación de glucosa limitada. Tiene que señalarse que este valor es un valor relativo. Sin embargo, según cambia la densidad de células viables durante el cultivo (es decir, aumenta al principio, alcanza un máximo y disminuye después de esto otra vez), cambia en consecuencia la cantidad absoluta de glucosa disponible, ya que es un valor relativo que depende de la densidad de células viables absoluta. Como el valor relativo se mantiene constante (es decir, por ejemplo, a un 80 %), pero cambia el valor de referencia absoluto (es decir, por ejemplo, aumentando la densidad de células viables), también cambia el valor absoluto relativo (es decir, también está aumentando el 80 % de un valor creciente).

La expresión "por unidad de tiempo" indica un intervalo fijo de tiempo, tal como 1 minuto, 1 hora, 6 horas, 12 horas o 24 horas. En un modo de realización, la unidad de tiempo es 12 horas o 24 horas. La expresión "cantidad de glucosa disponible por unidad de tiempo", como se usa dentro de la presente solicitud, indica la suma de 1) la cantidad de glucosa contenida en el medio de cultivo de un cultivo al principio de un intervalo de tiempo fijo y 2) la cantidad de glucosa añadida, es decir, alimentada, durante la unidad de tiempo. Por tanto, se añade una cantidad de glucosa al medio de cultivo celular, por ejemplo, al recipiente de cultivo, lo que aumenta la cantidad de glucosa en el medio de cultivo al principio del intervalo de tiempo fijo a la cantidad predeterminada. Esta cantidad de glucosa se puede añadir, por ejemplo, como un sólido, disuelta en agua, disuelta en un tampón o disuelta en un medio nutritivo, por lo que el agua y el tampón no deben contener glucosa. La cantidad de glucosa que va a añadirse se corresponde con la cantidad de glucosa que va a estar disponible reducida por la cantidad de glucosa presente en el medio en el recipiente de cultivo. El procedimiento de añadir la cantidad de glucosa se puede realizar como una única adición y también como una adición múltiple de pequeñas fracciones iguales, o como una adición continua durante una unidad de tiempo como se describe anteriormente.

El procedimiento, como se informa en el presente documento, es adecuado para cualquier tipo de cultivo y cualquier escala de cultivo. Por ejemplo, en un modo de realización, el procedimiento se usa para procedimientos continuos o semicontinuos; en otro modo de realización, el volumen de cultivo es de 100 ml a 50.000 l, en otro modo de realización de 100 l a 10.000 l. El procedimiento, como se informa en el presente documento, es útil para la producción de inmunoglobulinas con un 10 % o menos, o un 8 % o menos, o un 6 % o menos de la inmunoglobulina que tiene una glucoestructura de manosa-5. En un modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina G o E. El procedimiento, como se informa en el presente documento, comprende una célula eucariota, en la que la célula comprende, a su vez, un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma y un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma. La célula eucariota se selecciona, en un modo de realización, de células CHO, células NS0, células BHK, células de hibridoma, células PER.C6<sup>®</sup>, células Sp2/0, células HEK y células de insecto.

Un experto en la técnica está familiarizado con composiciones y componentes de medios, además de con concentraciones de nutrientes requeridas por diferentes células para el crecimiento óptimo, además de la cantidad de glucosa, y elegirá un medio apropiado para el cultivo de la célula (véase, por ejemplo, Mather, J.P., et al., en Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2 (1999) 777-785).

En un modo de realización, la cantidad de glucosa que tiene que estar disponible para las células en un cultivo de acuerdo con el procedimiento, como se informa en el presente documento, se calcula multiplicando la densidad de células viables, que se puede lograr normalmente en el recipiente de cultivo en un cierto momento temporal del cultivo, con el volumen del recipiente de cultivo y la cantidad de glucosa que se puede utilizar como máximo por las células en crecimiento exponencial por unidad de tiempo y por el DGL previsto. En más detalle, del transcurso de la concentración de glucosa en el cultivo y el transcurso de la densidad celular en el cultivo antes del momento temporal exacto se predice el transcurso futuro de la concentración de glucosa y la densidad celular. Con esta

predicción se calcula la cantidad de glucosa que tiene que añadirse al cultivo para lograr el DGL previsto, con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & (\text{glucosa que se va a añadir [pg de glucosa/ml/h]} = \\ & (\text{densidad celular existente [células/ml]} \times \\ & (\text{tasa máxima de consumo de glucosa de la célula [pg de glucosa/célula/h]} \times \\ & (\text{valor de DGL}) - \\ & \text{cantidad de glucosa presente en el medio en el recipiente de cultivo.} \end{aligned}$$

En un modo de realización, el valor de pH del cultivo está entre pH 6,5 y pH 7,8. En otro modo de realización, el valor de pH está entre pH 6,9 y pH 7,3. En otro modo de realización, el valor de pH está entre pH 7,0 y 7,2. Se ha encontrado, como se expone brevemente en el ejemplo 1 que, en combinación con una alimentación de glucosa limitada con un valor de pH de 7,0 en el procedimiento de alimentación constante, el contenido de M5 se puede regular de manera eficaz a valores definidos, es decir, inferiores a un 8 %, en comparación con un valor de pH de 7,2. En los cultivos en el procedimiento semicontinuo a valores de pH de 7,0 o 7,2, respectivamente, se encontró que con el procedimiento de control de DGL el contenido de M5 podría regularse para ser inferior a un 5,5 %. Se ha encontrado que con una reducción del valor de pH del cultivo se puede recorrer un aumento de la cantidad de M5 debido a la reducción del valor de DGL.

El cultivo se realiza, en un modo de realización, a una temperatura entre 27 °C y 39 °C, en otro modo de realización, entre 35 °C y 37,5 °C.

Con el procedimiento, como se informa en el presente documento, se puede producir cualquier polipéptido que contiene una glucoestructura, tal como inmunoglobulinas, interferones, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, activador de plasminógeno, eritropoyetina y similares.

El cultivo en el procedimiento, como se informa en el presente documento, se puede realizar usando cualquier dispositivo de cultivo agitado o removido para el cultivo de células de mamífero, por ejemplo, un dispositivo de cultivo en tanque de tipo fermentador, un dispositivo de cultivo de tipo columna de aire, un dispositivo de cultivo de tipo matraz de cultivo, un dispositivo de cultivo de tipo matraz de agitación, un dispositivo de cultivo de tipo microportador, un dispositivo de cultivo de tipo lecho fluidizado, un dispositivo de cultivo de tipo fibra hueca, un dispositivo de cultivo de tipo botella rotatoria o un dispositivo de cultivo de tipo lecho compacto.

El procedimiento, como se informa en el presente documento, se realiza, en un modo de realización, durante hasta 15 días. En otro modo de realización, el cultivo es durante 6 a 15 días. En un modo de realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-IL-6R.

El procedimiento, como se informa en el presente documento, se ejemplifica con un anticuerpo contra el receptor de interleucina-6 humana como se informa, por ejemplo, en los documentos EP 0 409 607, EP 0 628 639, US 5.670.373 o US 5.795.965 (incorporados por la presente por referencia en su totalidad) ya que este anticuerpo y la línea celular que lo expresa estaban disponibles en una cantidad suficiente en el laboratorio de los presentes inventores en el momento de la invención. Esto no pretende limitar el alcance de la invención.

Los siguientes ejemplos y figuras están disponibles para ayudar en el entendimiento de la presente invención, cuyo alcance verdadero se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### **Descripción de las figuras**

**Figura 1** Densidad de células viables (a) y perfiles de viabilidad celular (b) en el modo semicontinuo usando el control de DGL; círculo blanco: densidad celular inicial de  $8 \times 10^5$  células/ml; triángulo relleno: densidad celular inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml; cuadrado blanco: densidad celular inicial de  $12 \times 10^5$  células/ml.

**Figura 2** Transcursos de tiempo de DGL en el modo semicontinuo en la producción de inmunoglobulina; círculo: densidad celular inicial de  $8 \times 10^5$  células/ml; triángulo: densidad celular inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml; cuadrado: densidad celular inicial de  $12 \times 10^5$  células/ml.

**Figura 3** Perfiles de alimentación basados en DGL por el modo semicontinuo en la producción de inmunoglobulina; círculos: densidad celular inicial de  $8 \times 10^5$  células/ml; triángulo: densidad celular inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml; cuadrado: densidad celular inicial de  $12 \times 10^5$  células/ml.

**Figura 4** Perfiles de producción de inmunoglobulina por el modo semicontinuo en el control de DGL; círculos blancos: densidad celular inicial de  $8 \times 10^5$  células/ml; triángulo relleno: densidad celular inicial de  $10 \times 10^5$  células/ml; cuadrado blanco: densidad celular inicial de  $12 \times 10^5$  células/ml; círculo pequeño relleno: procedimiento de alimentación constante: FR = 0,02 g de glucosa/h (control)

**Figura 5** Transcurso de tiempo de DGL durante un cultivo semicontinuo de una célula: rombo: alimentación diaria de

alimentación única, cuadrado: alimentación diaria de alimentación doble; triángulo: alimentación de perfil de alimentación única; X: alimentación de perfil de alimentación doble.

## **Ejemplos**

5

### **Materiales y procedimientos**

#### Línea celular:

10 Una línea celular CHO a modo de ejemplo en la que la cantidad de la glucoestructura de manosa-5 de una inmunoglobulina producida de forma recombinante se puede modificar es una línea celular CHO que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de acuerdo con los documentos EP 0 409 607 y US 5.795.965. Para el cultivo de la célula CHO recombinante se puede usar cualquier medio de cultivo, siempre que se pueda realizar la suplementación de glucosa de acuerdo con el procedimiento de la invención. Los medios de cultivo a modo de ejemplo son IMDM, DMEM o medio F12 de Ham o combinaciones de los mismos, que se han adaptado al procedimiento, como se informa en el presente documento, en la medida en que se adopten las proporciones de masa de los componentes del medio de cultivo con respecto a la glucosa. Asimismo, es posible excluir la glucosa del medio de cultivo y añadirla al cultivo por separado.

#### Cultivo:

20 Se cultivaron células CHO que expresan un anticuerpo anti-IL-6R en un recipiente de fermentación de 1 l o 2 l. El medio de alimentación contenía de 15 a 40 g/l de glucosa. La glucosa se podría alimentar con una solución concentrada separada que contiene, por ejemplo, 400 g/l de glucosa. El cultivo se realizó a un valor de pH en el intervalo de pH 7,0 a pH 7,2.

#### Determinación de la glucoestructura:

30 Para el análisis del patrón de glucosilación de IgG se usó un procedimiento de acuerdo con Kondo et al. (Kondo, A., et al., Agric. Biol. Chem. 54 (1990) 2169-2170). La IgG se purificó del sobrenadante centrifugado del medio de cultivo usando una columna de proteína A a pequeña escala. El oligosacárido de la IgG purificada se liberó usando N-glucosidasa F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se marcó con 2-aminopiridina en el extremo reductor. El oligosacárido marcado se analizó por cromatografía de fase inversa (HPLC). Cada pico se asignó tanto por espectrometría de masas como por estándares para los oligosacáridos.

#### Determinación de glucosa:

40 La concentración de glucosa se determinó usando un analizador YSI 2700 SELECT™ (YSI, Yellow Springs, OH, EE. UU.) con un procedimiento de acuerdo con el manual del fabricante.

#### Determinación de la densidad de células viables:

45 Se determinó la densidad de células viables usando un sistema automático de procesamiento y análisis de imágenes (CEDEX®; Innovatis, Alemania) y el procedimiento de exclusión con colorante azul de tripano.

### **Ejemplo 1**

#### **Efectos del control de DGL y el pH sobre la producción de anticuerpos y el contenido de glucoestructura de manosa-5 (M5)**

50

Se realizó una prueba usando una cepa de células CHO que produce anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 humana (Tocilizumab, RoACTEMRA®), que se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 2 de referencia de la publicación de patente sin examinar japonesa n.º 99902/1996 usando el promotor del factor de elongación humano I $\alpha$ , como se informa en el ejemplo 10 de la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 92/19759 (correspondiente a los documentos US 5.795.965, US 5.817.790 y US 7.479.543).

55

En el procedimiento de alimentación de cantidad absoluta constante, se observaron los efectos de control del pH sobre la producción de inmunoglobulina. La tabla 2 muestra los efectos de control del pH sobre la producción de oligosacáridos de anticuerpo y el contenido de M5 en el modo de alimentación constante.

60

**Tabla 2:** Efectos de control del pH en el modo de alimentación de cantidad absoluta constante.

N.º	Muestra en [el día]	Punto establecido de pH	DGL	Concentración relativa de anticuerpo [%]	Contenido de M5 [%]
1	7	7,0	0,80-0,45	90,1	3,6
2	7	7,0	0,49-0,21	100	5,4

N.º	Muestra en [el día]	Punto establecido de pH	DGL	Concentración relativa de anticuerpo [%]	Contenido de M5 [%]
3	7	7,2	0,73-0,35	135,1	11,7
4	7	7,2	0,69-0,30	120	10,8
5	7	7,2	0,35-0,29	127	25,2
6	7	7,2	0,64-0,25	122,5	8,7

A pH 7,0, la cantidad de la glucoestructura de manosa-5 (M5) se reguló a menos de un 5,5 %. El valor de DGL disminuyó de 0,80 a 0,21 debido al cambio de densidad celular. Por otra parte, a pH 7,2, la cantidad de M5 fluctuó entre un 8,7 % y un 25,2 % y fue superior que a pH 7,0. El valor de DGL a pH 7,2 varió de 0,73 a 0,25. Además, en este caso, la producción de inmunoglobulina a pH 7,2 fue superior a un 120 % (valor relativo en comparación con pH 7,0). Una producción más alta de inmunoglobulina en el procedimiento de alimentación de cantidad absoluta constante induce un contenido de M5 más alto de más de un 8 %. Por tanto, con un control de pH 7,0 en el procedimiento de alimentación de cantidad absoluta constante, el contenido de M5 se podría regular de forma eficaz a valores más bajos, es decir, inferiores a un 8 %, en comparación con el procedimiento de control a pH 7,2.

El procedimiento de control de DGL (= procedimiento de alimentación de cantidad relativa constante) también se usó para la producción de inmunoglobulina por modo semicontinuo a diversos valores de pH, y se analizó el contenido de M5. La tabla 3 muestra los efectos del control de DGL después del inicio de la alimentación en el día 2-3 y del pH sobre la producción de inmunoglobulina y el contenido de M5.

**Tabla 3:** Efectos del control de DGL y del pH en el modo semicontinuo.

N.º	Muestra en [el día]	Punto establecido de pH	DGL	Concentración relativa de anticuerpo [%]	Contenido de M5 [%]
1	7	7,0	0,8	102,7	2,9
2	7	7,0	0,6	96,2	2,7
3	7	7,0	0,4	100,0	3,3
4	7	7,0	0,3	91,1	3,9
5	7	7,0	0,2	83,0	4,0
6	7	7,2	0,6	100,9	4,4
7	7	7,2	0,4	90,1	5,3

A pH 7,0, se aplicó el procedimiento de control de DGL en el intervalo de un DGL de 0,2 a 0,8. Como resultado, el contenido de M5 se reguló para ser igual o inferior a un 4,0 %. Por otra parte, a pH 7,2, el valor de DGL funcionó en el intervalo de 0,4 a 0,6. En esta ocasión, el contenido de M5 se podría controlar para ser inferior a un 5,5 %.

### Ejemplo 2

#### **Cultivo con diferentes valores de DGL**

Se realizó el cultivo de una célula CHO que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6R con diferentes valores de DGL. Los resultados se resumen en la siguiente tabla 4.

**Tabla 4:** Efectos del valor de control DGL sobre la producción de inmunoglobulina y el contenido de M5.

N.º	Muestra en [el día]	DGL	Concentración relativa de anticuerpo [%]	Contenido de M5 [%]	Contenido de G(0) [%]	Contenido de G(1) [%]	Contenido de G(2) [%]
1	7	0,6-0,5	107,3	3,5	38,4	46,7	11,4
2	7	0,4	111,0	3,5	38,8	46,9	10,8
3	7	0,2	111,5	4,5	40,1	45,2	10,1
4	8	alimentación constante	100,0	5,9	43,8	42,0	8,3

En comparación con una alimentación constante, la estrategia de DGL controlado con un valor de DGL de 0,4 a 0,6 muestra un contenido de manosa-5 reducido.

### Ejemplo 3

#### **Cultivo con diferentes estrategias de alimentación**

El cultivo de una célula CHO que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6R se realizó con

un valor de DGL, pero con diferentes estrategias de alimentación. Los resultados se resumen en la siguiente tabla 5.

**Tabla 5:** Efectos de la estrategia de alimentación sobre la viabilidad y densidad de células viables.

N.º	Muestra después de [h]	DGL	Alimentación	Ajuste	Viabilidad [%]	Densidad de células viables [ $\times 10^6$ células/ml]
1	112	0,4	única	diario	71	5,1
2	115	0,4	doble	diario	75	5,8
3	115	0,4	única	perfil	73	4,9
4	115	0,4	doble	perfil	70	5,1

- 5 En los experimentos de alimentación única se usó una única alimentación que contenía todos los nutrientes y glucosa. En los experimentos de alimentación doble se usaron dos alimentaciones: la primera alimentación contiene todos los nutrientes y glucosa a una baja concentración de 15 g/l y la segunda alimentación contiene una alta concentración de glucosa. Estos experimentos de alimentación diferentes se realizaron en un conjunto con un ajuste diario de la tasa de alimentación y en otro conjunto siguiendo un perfil predeterminado basado en el registro del desarrollo de densidad de células viables en cultivos anteriores. Como se puede apreciar de la tabla 5, la viabilidad y la densidad de células viables son comparables independientemente de la estrategia de alimentación empleada.

#### **Ejemplo 4**

##### **Control del grado de limitación de glucosa (DGL) para la producción de inmunoglobulina por el modo semicontinuo**

Se inocularon células CHO ( $8,0 - 12 \times 10^5$  células/ml) en medio de cultivo libre de suero como se describe anteriormente. Las células se cultivaron a 37 °C, 98 % de humedad relativa y 10 % de atmósfera de CO<sub>2</sub>. En el cultivo semicontinuo, el medio de alimentación que contenía glucosa se empezó a alimentar al fermentador principal en el 2.º y 3.º día desde el inicio del cultivo. La estrategia de alimentación siguió el procedimiento para controlar el grado de limitación de glucosa (DGL) de acuerdo con la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2006/0127975 A1. El DGL se puede definir como la proporción de la tasa de consumo de glucosa específica observada con respecto a la tasa máxima de consumo de glucosa específica conocida cuando la glucosa está disponible libremente para estas células ( $DGL = Q(glc)/Q(glc)_{m\acute{a}x}$ , en el que  $Q(glc)$  = tasa de consumo de glucosa específica existente observada;  $Q(glc)_{m\acute{a}x}$  = tasa máxima de consumo de glucosa específica conocida para estas células).

La figura 1 muestra la densidad de células viables y los perfiles de viabilidad celular del cultivo. El DGL se controló para estar a un valor de 0,4 - 0,5 en diversas densidades celulares como se muestra en la figura 2. Las tasas de alimentación se cambiaron una vez o dos veces al día dependiendo de la densidad celular en ese momento. La figura 3 muestra los perfiles de alimentación basados en el DGL por el modo semicontinuo. La tasa de alimentación se cambió entre 0,8 y 1,6 ml/h dependiendo de la densidad celular. Con esta estrategia de alimentación aplicada, se obtuvo un perfil de producción de inmunoglobulinas como se muestra en la figura 4. Usando el tamaño de inoculación de  $10 \times 10^5$  células/ml y  $12 \times 10^5$  células/ml, la producción de inmunoglobulina fue casi la misma y superior a un 120 % de la producción de inmunoglobulina en el procedimiento de alimentación constante en el día siete como se muestra en la tabla 6 (tasa de alimentación de 0,02 g de glucosa/h). A pesar de la diferencia de un 20 % en las densidades celulares iniciales, con el procedimiento de control de DGL fue posible obtener un título de inmunoglobulina aproximadamente equivalente. Además, cuando el tamaño de inoculación se fijó a  $8,0 \times 10^5$  células/ml, a pesar del retardo de 20 horas desde el momento del inicio de la alimentación, la inmunoglobulina obtenida fue superior a un 110 % (valor relativo) en el día siete. En estos resultados, el procedimiento de control de DGL podría alcanzar una producción de inmunoglobulina estable a diversos tamaños de inoculación.

#### **Ejemplo 5**

##### **Los efectos del control de DGL sobre la glucoestructura de manosa-5 y la galactosilación de oligosacáridos**

De la inmunoglobulina producida por cultivo semicontinuo usando el control de DGL, se analizó el patrón de glucosilación. La tabla 6 muestra el resultado del análisis de oligosacáridos para la inmunoglobulina obtenida del cultivo semicontinuo controlado por DGL en comparación con el procedimiento de alimentación constante (tasa de alimentación: 0,02 g de glucosa/h). Al tamaño de inoculación de  $8,0 \times 10^5$  células/ml, el contenido de glucoestructura de manosa-5 (M5) fue de un 2,8 %. Al tamaño de inoculación de  $10 \times 10^5$  células/ml y  $12 \times 10^5$  células/ml, el contenido de M5 fue de un 4,1 % y 3,8 %, respectivamente. A todas las condiciones de cultivo, el procedimiento de control de DGL fue capaz de regular el contenido de M5 a menos de un 5,0 %.

Mientras tanto, en cada condición, la isoforma G(0) de la inmunoglobulina y la isoforma G(2) de la inmunoglobulina se controlaron al intervalo de un 40 % a un 46 % y de un 9,0 % a un 11 %, respectivamente.

**Tabla 6:** Efectos del valor de control de DGL sobre la producción de inmunoglobulina y el patrón de glucosilación.

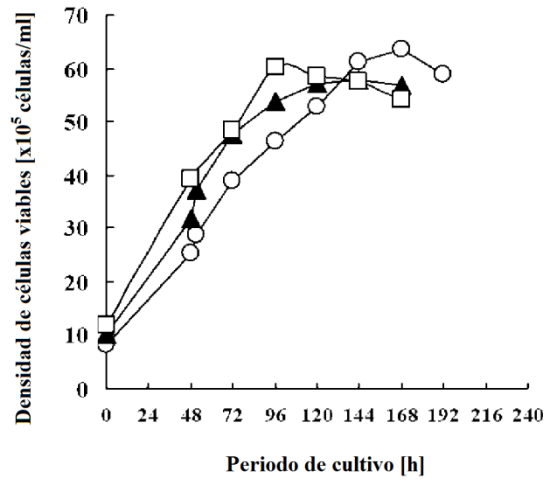
<b>N.º</b>	<b>Muestra en [el día]</b>	<b>DGL</b>	<b>Densidad celular de inoculación [x 10<sup>5</sup> células/ml]</b>	<b>Concentración relativa de anticuerpo [%]</b>	<b>Contenido de M5 [%]</b>	<b>Contenido de G(0) [%]</b>	<b>Contenido de G(1) [%]</b>	<b>Contenido de G(2) [%]</b>
1	7	alimentación constante	10	100,0	3,5	45,7	41,5	9,2
2	7	0,4	8	112,5	2,8	41,7	44,7	10,8
3	7	0,4	10	122,6	4,1	42,9	43,1	9,8
4	7	0,4	12	127,1	3,8	45,5	41,5	9,1

**REIVINDICACIONES**

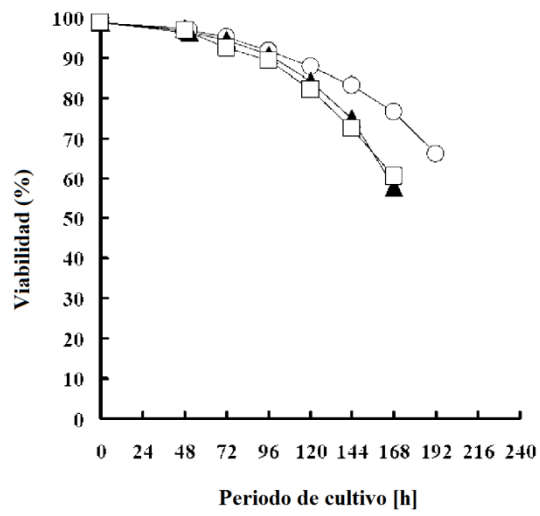
1. Procedimiento para la producción de una inmunoglobulina, que comprende
  - 5 a) cultivar una célula eucariota que comprende un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina en un medio de cultivo en el que la cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo por unidad de tiempo se mantiene constante y limitada a un valor constante inferior a un 80 % y superior a un 20 % de la cantidad que se podría utilizar como máximo por las células en el medio de cultivo por unidad de tiempo, por el que esta cantidad constante está disponible en todas las unidades de tiempo del procedimiento en el que se realiza esta alimentación de glucosa limitada, y
  - 10 b) recuperar la inmunoglobulina del cultivo.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el cultivo es un cultivo semicontinuo.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que el cultivo es un cultivo semicontinuo en el que la alimentación empieza en el día 2 o día 3 del cultivo.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el cultivo es a un valor de pH de pH 6,5 a 7,5.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que el cultivo es a un valor de pH de pH 6,9 a 7,3.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el cultivo es a un valor de pH de pH 6,95 a pH 7,05 o a un valor de pH de pH 7,15 a pH 7,25.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase G o clase E.
- 30 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la célula huésped eucariota se selecciona del grupo que comprende células CHO, células NS0, células HEK, células BHK, células de hibridoma, células PER.C6<sup>®</sup>, células de insecto y células Sp2/0.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la célula eucariota es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 35 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el cultivo de la célula huésped se realiza durante seis a veinte días.
- 40 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la inmunoglobulina es un anticuerpo anti-IL-6R.



Fig. 1



(a)



(b)

Fig. 2

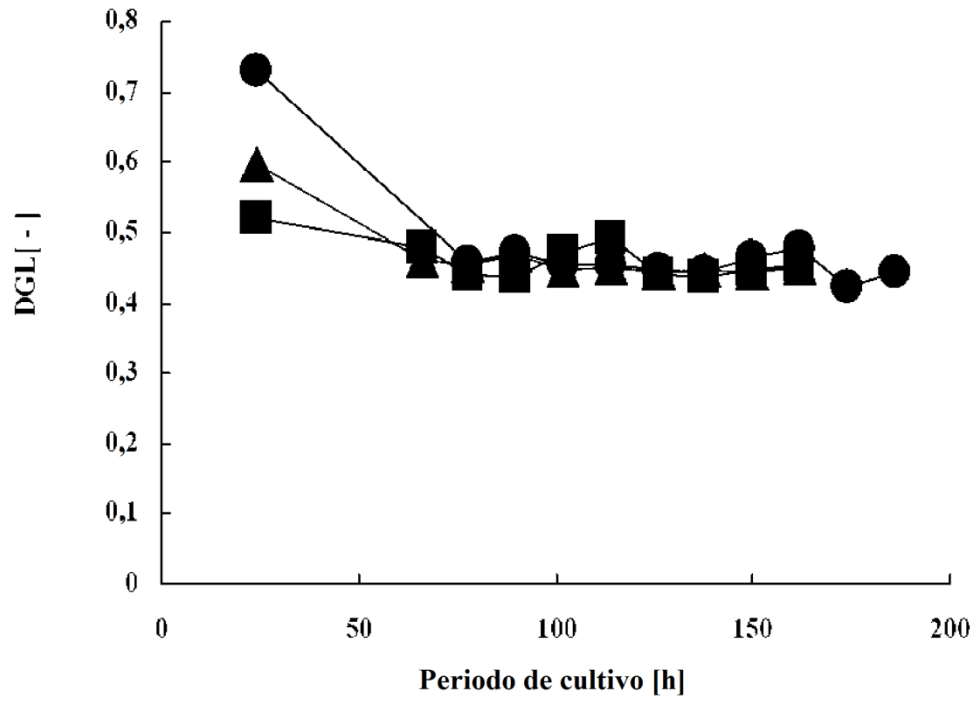


Fig. 3

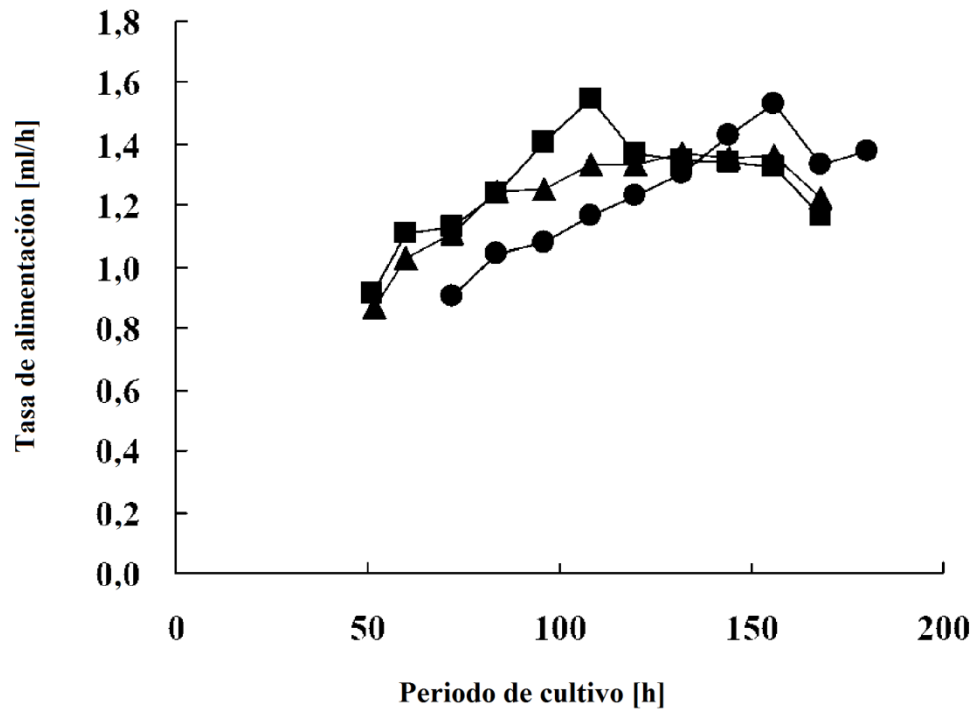


Fig. 4

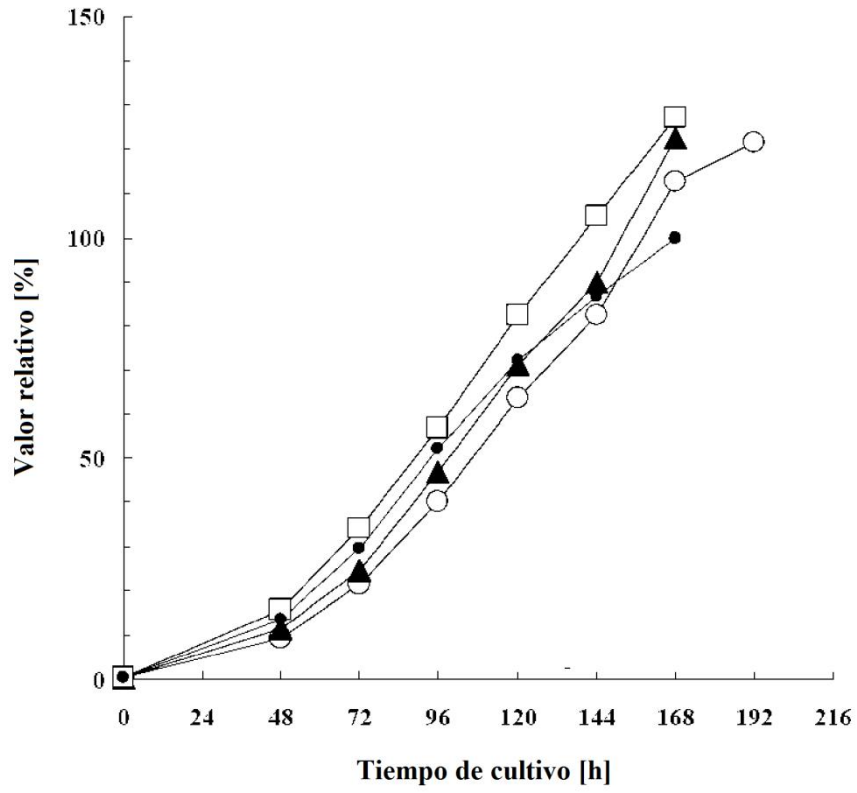


Fig. 5

