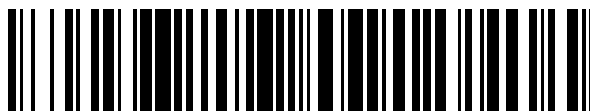


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 801**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/38** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/US2014/022738**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14714521 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2970874**

54 Título: **Métodos para incrementar el contenido de manosa de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361784639 P**

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

**28.11.2018**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)  
One Amgen Center Drive  
Thousand Oaks, CA93120-1789, US**

72 Inventor/es:

**WU, JIAN;  
DAVERN, SEAN;  
PETROVAN, SIMINA, CRINA;  
BRANDENSTEIN, MICHAEL, CHARLES;  
LINDAHL, KATHERINE, ROSE y  
LILLIE, SHAWN, ERIK**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

ES 2 691 801 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

Métodos para incrementar el contenido de manosa de proteínas recombinantes

5 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos IgG producidos en cultivos de célula mamífera pueden contener niveles variados de glucoformas de alta manosa (AM) tales como Manosa5 (Man5), Manosa6 (Man6), Manosa7 (Man7), Manosa8 (Man8) y Manosa9 (Man9). El contenido de glucoforma de alta manosa de proteínas terapéuticas y anticuerpos es un atributo de calidad crítico que se ha encontrado que afecta a las propiedades farmacocinéticas de ciertos anticuerpos terapéuticos (Goetze y col., (2011) *Glycobiology* 21, 949-59; Yu y col. (2012) *MAbs* 4, 475-87).

Las glucoformas de un anticuerpo expresado por célula hospedadora de ovario de hámster chino (CHO) se determinan en gran medida durante la generación de la línea celular y la selección del clon. Sin embargo, el contenido de AM también puede estar afectado por las condiciones del cultivo celular (Pacis, y col., (2011) *Biotechnol Bioeng* 108, 2.348-2.358). Es común en la industria de anticuerpo terapéutico buscar un intervalo deseado de contenido de AM para un producto anticuerpo debido a los cambios del proceso, aumento a escala, mejoramientos o la necesidad de igualarse a atributos de calidad de anticuerpo existente. Hasta ahora, los métodos aplicados para manipular el contenido de AM de un anticuerpo en el cultivo celular incluyen cambios en las composiciones de los medios, osmolaridad, pH, temperatura, etc. (Hills y col. (2001) *Biotechnol Bioeng* 75(2), 239-251; Yu y col., supra, Pacis y col., supra, Chee Fung Wong y col., (2005) *Biotechnol Bioeng* 89, 164-177; Ahn, y col., (2008) *Biotechnol Bioeng* 101, 1.234-44). La eficacia de estos métodos es específica a las líneas celulares, tipos de molécula y entorno de los medios. Además estos métodos tienden a alterar también la productividad del anticuerpo, el comportamiento del cultivo celular y otros atributos de la calidad del anticuerpo. La eficacia de estos métodos se obtiene empíricamente.

Por lo tanto, hay una necesidad de un método para modular el contenido de glucoforma de alta manosa de proteínas terapéuticas y anticuerpos. La invención proporciona un método para incrementar el contenido de glucoforma de alta manosa a través de glucosa limitada en combinación con una fuente de carbono alternativa.

30 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un método para modular una o más especies de glucano de alta manosa en una proteína recombinante durante el cultivo de célula mamífera que comprende; establecer un cultivo de célula mamífera en un biorreactor con un medio de cultivo definido libre de suero que contiene 5 a 8 g/l de glucosa; cultivar las células mamíferas durante una fase de crecimiento y complementar el medio de cultivo con alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero que tiene de 5 a 8 g/l de glucosa; iniciar una fase de producción en el cultivo celular por perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene 5 a 15 g/l de glucosa; en un momento predeterminado durante la fase de producción, bajar la concentración de glucosa a concentraciones limitantes sometiendo a perfusión el cultivo celular con un medio de perfusión de baja glucosa que contiene o complementado con una cantidad disminuida de glucosa, en el que dicho medio de perfusión contiene además o está complementado con galactosa.

En una realización la cantidad disminuida de glucosa es suficiente para dar como resultado una concentración de glucosa en el medio usado de o aproximadamente 0 g/l.

En una realización la concentración de la cantidad disminuida de glucosa en el medio de perfusión de baja glucosa es de 0 a 3 g/l. En realizaciones relacionadas la concentración de la cantidad disminuida de glucosa en el medio de perfusión de baja glucosa es de 2 a 3 g/l; 2,5 g/l o 0 g/l.

En una realización la concentración de galactosa en el medio de perfusión es de 10 a 20 g/l. En realizaciones relacionadas la concentración de galactosa en el medio de perfusión de baja glucosa es de 10 a 15 g/l; 10 a 12 g/l o 11,5 g/l.

En una realización la perfusión comienza en o aproximadamente el día 5 a en o aproximadamente el día 9 del cultivo celular. En una realización relacionada la perfusión comienza en o aproximadamente el día 5 a en o aproximadamente el día 7 del cultivo celular. En otra realización relacionada la perfusión comienza cuando las células han alcanzado una fase de producción.

En otra realización la perfusión comprende perfusión continua. En una realización relacionada el índice de perfusión es constante.

En una realización la perfusión se realiza a un índice de menos de o igual a 1,0 volumen de trabajo por día. En una realización relacionada la perfusión se realiza a un índice que incrementa durante la fase de producción desde 0,25 volumen de trabajo por día a 1,0 volumen de trabajo por día durante el cultivo celular. En otra realización relacionada la perfusión se realiza a un índice que alcanza 1,0 volumen de trabajo por día en el día 9 al día 11 del cultivo celular.

En otra realización relacionada la perfusión se realiza a un índice que alcanza 1,0 volumen de trabajo por día en el día 10 del cultivo celular.

5 En una realización las alimentaciones por bolo del medio de alimentación libre de suero comienzan el día 3 o el día 4 del cultivo celular.

10 En una realización el cultivo de célula mamífera se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,5 \times 10^6$  a  $3,0 \times 10^6$  células/ml en un medio de cultivo libre de suero. En una realización relacionada el cultivo de célula mamífera se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,5 \times 10^6$  a  $1,5 \times 10^6$  células/ml en un medio de cultivo libre de suero.

En una realización la especie de glucano de alta manosa es Manosa 5.

15 En una realización el método anteriormente descrito comprende además cambio de temperatura de  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En una realización el método anteriormente descrito comprende además un cambio de temperatura de  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En una realización relacionada el cambio de temperatura ocurre en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En una realización relacionada el cambio de temperatura ocurre durante la fase de producción.

20 En una realización el método anterior que comprende además inducir la detección del crecimiento celular por privación de L-asparagina seguido de perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos. En una realización relacionada la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es menos de o igual a 5 mM. En una realización relacionada la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es menos de o igual a 4,0 mM. En otra realización  
25 relacionada la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es menos de o igual a 3,0 mM. En otra realización relacionada la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es menos de o igual a 2,0 mM. En otra realización relacionada la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es menos de o igual a 1,0 mM. En otra realización relacionada más la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es 0 mM. En otra realización relacionada más se hace un seguimiento de la  
30 concentración de L-asparagina del medio de cultivo celular antes de y durante la privación de L-asparagina.

35 En una realización el método anterior, comprende además que el volumen celular empaquetado durante una fase de producción es menos de o igual al 35 %. En una realización relacionada el volumen celular empaquetado es menos de o igual al 30 %.

40 En una realización la densidad celular viable del cultivo de célula mamífera en un volumen celular empaquetado menos de o igual al 35 % es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a  $80 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización relacionada la densidad celular viable del cultivo de célula mamífera es de  $20 \times 10^6$  células viables/ml a  $30 \times 10^6$  células viables/ml.

En una realización la perfusión se consigue mediante flujo tangencial alterno. En una realización relacionada la perfusión se consigue mediante flujo tangencial alterno usando un ultrafiltro o un microfiltro.

45 En una realización el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l a 2.000 l. En una realización relacionada el biorreactor tiene una capacidad de al menos 1.000 l a 2.000 l.

En una realización las células mamíferas son células del ovario de hámster chino (CHO).

50 En una realización la proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citoquina.

55 En una realización el método anterior comprende además una etapa de recolección de la proteína recombinante producida por el cultivo celular.

En una realización la proteína recombinante producida por el cultivo celular se purifica y formula en una formulación farmacéuticamente aceptable.

60 En una realización la producción de proteína recombinante en la especie de glucano de alta manosa se incrementa en comparación con un cultivo en el que las células no se someten a glucosa limitada en combinación con galactosa.

### Breve descripción de las figuras

65 Figura 1. Perfiles de cultivo celular y Man5 en un proceso semicontinuo (*fed batch*). (A) Concentración de glucosa g/l en el sobrenadante del cultivo. (B) Concentración de galactosa g/l en el sobrenadante del cultivo. (C)

Densidad celular viable. (D) Viabilidad. (E) Título. (F) Man5. 1 g/l de glucosa, 0 g/l de galactosa (triángulo en blanco). 1 g/l de glucosa, 4 g/l de galactosa (triángulo en negro). 2 g/l de glucosa, 0 g/l de galactosa (círculo en blanco). 2 g/l de glucosa, 4 g/l de galactosa (triángulo en negro). 3 g/l de glucosa, 0 g/l de galactosa (cuadrado en blanco). 3 g/l de glucosa, 4 g/l de galactosa (cuadrado en negro).

5  
 10  
 Figura 2. Perfiles de cultivo celular y aminoácidos en el proceso de perfusión. (A) Densidad celular viable, (B) Viabilidad, (C) concentración de Gln (glutamina) g/l en el análisis de medios usados, (D) Título ajustado de volumen celular empaquetado, (E) concentración de Glc (glucosa) g/l en el análisis de medios usados, (F) concentración de galactosa g/l en el análisis de medios usados. 2 g/l de glucosa, 6 g/l de galactosa y glutamina 10 mM (triángulo en negro). 4 g/l de glucosa, 6 g/l de galactosa y glutamina 10 mM (círculo en negro). 4 g/l de glucosa, 6 g/l de galactosa y glutamina 5 mM (círculo en blanco).

15  
 20  
 Figura 3. Perfiles de cultivo celular en el proceso de perfusión. (A) concentración de glucosa (Glu) g/l en el análisis de medios usados, (B) concentración de Gal (galactosa) g/l en el análisis de medios usados, (C) concentración de lactato, (D) concentración de amoníaco, (E) Densidad celular viable, (F) Viabilidad, (G) Título ajustado de volumen celular empaquetado. 3 g/l de glucosa, 13 g/l de galactosa (cuadro en negro). 0 g/l de glucosa, 10 g/l de galactosa (círculo en blanco). 0 g/l de glucosa, 13 g/l de galactosa (círculo en negro). 1,5 g/l de glucosa, 11,5 g/l de galactosa (estrella). 3 g/l de glucosa, 10 g/l de galactosa, (cuadrado en blanco).

20  
 25  
 Figura 4. Análisis estadístico JMP del proceso de perfusión. (A) Título ajustado del volumen celular empaquetado, (B) Man5.

Figura 5. Datos del curso del tiempo que muestran el incremento en porcentaje de la especie Man5. -0 g/l de glucosa 10 g/l de galactosa; +0 g/l de glucosa 13 g/l de galactosa; +13 g/l de glucosa 10 g/l de galactosa; ++3 g/l de glucosa 13 g/l de galactosa; OO 1,5 g/l de glucosa 11,5 de galactosa.

### Descripción detallada de la invención

30  
 35  
 La producción de perfiles de glucoforma de glucoproteína recombinante coherentes y reproducibles deja un reto considerable a la industria biofarmacéutica. Las variaciones en los procesos del cultivo celular juegan un papel significativo en los perfiles de glucosilación de anticuerpo. La variabilidad potencial en el entorno fisicoquímico del proceso del cultivo celular incluyendo pH, temperatura, composición de los medios de cultivo celular, variación lote a lote de la materia prima, material de filtración del medio, diferencia de escala del biorreactor, estrategia de gasificación (aire, oxígeno, dióxido de carbono) son justo unos pocos ejemplos que pueden alterar potencialmente los perfiles de glucosilación.

40  
 Se observó que bajo condiciones de baja glucosa o limitada, el contenido de la glucoforma de alta manosa de la proteína recombinante incrementaba, sin embargo, los atributos del cultivo celular, tales como la productividad volumétrica, viabilidad celular, y/o densidad, disminuían. Incrementar la concentración de glucosa mejoraba los atributos de cultivo, pero disminuía el contenido de la glucoforma de alta manosa.

45  
 50  
 La invención proporciona un método para incrementar las glucoformas de alta manosa, en particular, Manosa5 (Man5), para conseguir los atributos de calidad de producto deseados mientras que se mantienen los niveles deseables de ciertos parámetros de cultivo celular tales como productividad volumétrica, viabilidad celular, y/o densidad, a través del uso de bajas concentraciones o limitadas de glucosa en combinación con una fuente de carbono alterna, en particular, galactosa. Como se describe en el presente documento, cultivar células en un medio de cultivo celular en el que la glucosa se limita reduciendo la concentración de glucosa en el medio de cultivo celular, en combinación con una fuente de carbono alternativa, dio como resultado una proteína recombinante que tenía una concentración incrementada de glucoformas de alta manosa, mientras que se mantenía el crecimiento celular, la viabilidad y el título a niveles aceptables.

55  
 60  
 Durante la fase de producción de un cultivo celular, parámetros de cultivo deseables, tales como la densidad celular viable, la viabilidad celular, el volumen celular empaquetado en porcentaje, el título y/o título ajustado de volumen celular empaquetado se pueden establecer alimentando el cultivo celular con un medio de cultivo celular que contiene suficiente glucosa (de 5 g/l a 15 g/l o más) para establecer y mantener estos parámetros. En dicho momento durante el desarrollo de la producción del cultivo celular, cuando es deseable incrementar el contenido de glucoforma de alta manosa de la proteína recombinante a producir, entonces el cultivo celular se alimenta con un medio de cultivo celular en el que la concentración de glucosa se reduce de manera que dará como resultado el incremento deseado en el contenido de alta manosa. Tal medio de cultivo celular se caracteriza por una menor concentración de glucosa (0 a 8 g/l) en combinación con una fuente de carbono alternativa, tal como galactosa.

65  
 Los factores que determinan el grado al que la concentración de glucosa necesitará ser reducida incluyen qué fuente de carbono alterna se usa y cuánto se usa; el proceso de producción de cultivo celular; el tipo celular y la masa y el consumo de glucosa. A mayor masa celular en el biorreactor, mayor consumo de glucosa por el cultivo celular y por lo tanto mayor cantidad de glucosa que se puede suministrar mientras aún se mantiene un estado de glucosa limitada que producirá el incremento deseado de la concentración de la glucoforma Man5. La manera en la que la

- glucosa se suministra al cultivo celular también puede influir en la cantidad de glucosa necesaria para mantener un estado de glucosa limitada que producirá el incremento deseado de la concentración de la glucoforma Man5. Por ejemplo, en un cultivo celular semicontinuo, la glucosa puede estar formulada dentro del medio de cultivo celular y complementada por alimentaciones por bolo. En un proceso de cultivo celular por perfusión, la concentración de glucosa dependerá de la tasa de alimentación (g/l/día) del medio de perfusión. En el presente documento se proporcionan ejemplos de ambos. Además, se puede medir la cantidad de glucosa en el medio de cultivo durante la producción, tal como por análisis de medios usados para cultivos de perfusión. Se observó que los niveles de Man5 se incrementaban cuando la cantidad de glucosa en el medio usado era de o casi 0 g/l.
- La producción de glucoforma de alta manosa se incrementó cuando las situaciones en las que las concentraciones de glucosa se disminuyeron. Sin embargo, bajos niveles de glucosa pueden impactar en la producción de proteínas recombinantes en sistemas de cultivo celular. La producción volumétrica, viabilidad celular y la densidad celular viable pueden estar todas negativamente impactadas en situaciones cuando la glucosa está limitada. Se encontró que la adición de una fuente de carbono alterna, tal como galactosa, a cultivo celular durante un periodo de baja glucosa o limitada no era reducida o estabilizó los descensos en la producción volumétrica, viabilidad celular y densidad celular viable, mientras que se conservaba las glucoformas Man5 incrementadas. Tener la capacidad de manipular y mantener el contenido de la glucoforma de alta manosa de una proteína recombinante durante el cultivo celular mientras que se minimiza la pérdida de título de producto y se mantiene la viabilidad celular representa un método valioso y fácilmente implementado para la producción de proteína terapéutica comercial.
- En el presente documento se proporciona un método de cultivo de células mamíferas que es útil para incrementar las glucoformas de alta manosa, en particular, Man5, para conseguir los atributos de calidad de producto deseados mientras que se mantiene el título de producto y la viabilidad celular aceptables mediante el uso de una cantidad limitante de glucosa en combinación con una fuente de carbono alterna, en particular, galactosa. El método proporciona cultivar células mamíferas durante las fases de crecimiento y/o producción en un medio de cultivo celular que tiene una alta concentración de glucosa no limitante, de 5 a 15 g/l de glucosa, o bien compuesto dentro de la formulación del medio, complementado a través de alimentaciones por bolo o continuas o ambas. Cuando la densidad celular viable, viabilidad celular y/o título alcanzan los niveles deseados, la cantidad de glucosa en el medio de cultivo celular se reduce a una cantidad limitante, de manera que en la alimentación de medio de perfusión, por ejemplo, la cantidad de glucosa medida en el medio usado es de o justo por encima de 0 g/l. La tasa de consumo de glucosa se determina mediante la tasa de adición de glucosa y/o la masa del cultivo celular. Se puede suministrar glucosa a hasta 8 g/l. En una realización, se suministra glucosa hasta 6 g/l. En otra realización se suministra glucosa hasta 4 g/l. En otra realización, se suministra glucosa hasta 3 g/l. En otra realización se suministra glucosa hasta 2 a 3 g/l. En otra realización más se suministra glucosa hasta 2,5 g/l. En otra realización, la glucosa es 0 g/l.
- En combinación con la concentración de glucosa reducida, el medio de cultivo celular contiene o se complementa con galactosa, a una concentración de hasta 20 g/l. En una realización la concentración de galactosa es de 10 a 15 g/l. En otra realización la concentración de galactosa es de 11,5 g/l.
- Los restos de carbohidrato se describen en el presente documento en referencia a la nomenclatura normalmente usada para oligosacáridos. Una revisión de la química de carbohidrato que usa esta nomenclatura se puede encontrar, por ejemplo, en Hubbard y Ivatt, *Ann. Rev. Biochem.* 50:555-583 (1981). Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; Gal que representa galactosa; y Glc, que representa glucosa.
- Por "cultivo celular" o "cultivo" se quiere decir el crecimiento y la propagación de células fuera de un organismo multicelular o tejido. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células mamíferas son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, "Animal cell culture: A Practical Approach", D. Rickwood, ed., Oxford University Press, Nueva York (1992). Las células mamíferas se pueden cultivar en suspensión o mientras se unen a un sustrato sólido. Se pueden usar biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, botellas rodillo, matraces de agitación, o biorreactores de tanque agitado, con o sin microvehículos.
- El cultivo de célula mamífera se cultiva en un biorreactor. En una realización se usan biorreactores de 500 l a 20.000 l. En una realización preferida, se usan biorreactores de 1.000 l a 2.000 l.
- El biorreactor se inocula con al menos  $0,5 \times 10^6$  hasta y más allá de  $3,0 \times 10^6$  células viables/ml en un medio de cultivo libre de suero. En una realización preferida la inoculación es de  $1,0 \times 10^6$  células viables/ml.
- Una vez inoculadas dentro del biorreactor de producción las células mamíferas se someten a una fase de crecimiento exponencial. La fase de crecimiento se puede mantener usando un proceso semicontinuo con alimentaciones por bolo de un medio de alimentación libre de suero que tiene de 5 a 8 g/l de glucosa. Estas alimentaciones por bolo complementadas en general comienzan en breve después de que las células se inoculen dentro del biorreactor, en el momento cuando se anticipa o determina que el cultivo celular necesita alimentación. Por ejemplo, las alimentaciones complementarias pueden comenzar en o aproximadamente el día 3 o 4 del cultivo o un día o dos antes o después. El cultivo puede recibir dos, tres, o más alimentaciones por bolo durante la fase de crecimiento. Ni el medio de cultivo celular basal ni el medio de alimentación por bolo contienen galactosa.

5 Cuando las células entran en la fase estacionaria o de producción, o el cultivo celular ha conseguido una densidad celular viable deseada y/o título celular, las alimentaciones por bolo semicontinuas (*fed batch*) son discontinuas y se empieza la perfusión. El cultivo de perfusión es uno en el que el cultivo celular recibe medio de alimentación de perfusión fresco mientras que se separa simultáneamente el medio usado. La perfusión puede ser continua, paso a paso, intermitente, o una combinación de cualquiera o todas de cualquiera de estas. Los índices de perfusión pueden ser menos de un volumen de trabajo a muchos volúmenes de trabajo por día. Preferiblemente las células se retienen en el cultivo y el medio usado que se separa es básicamente libre de células o tiene significativamente menos células que el cultivo. La perfusión se puede conseguir mediante un número de medios incluyendo la centrifugación, sedimentación o filtración. Véase, por ejemplo, Voisard y col., (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. Un método de filtración preferido es filtración de flujo tangencial alterno. El flujo tangencial alterno se mantiene bombeando medio a través de módulos de filtro de fibra hueca. Véase, por ejemplo, la patente americana N.º 6.544.424. Los módulos de fibra hueca pueden ser microfiltros o ultrafiltros.

15 Cuando el cultivo semicontinuo alcanza un punto desencadenante predeterminado, tal como viabilidad celular deseada, densidad celular, volumen celular empaquetado en porcentaje, título, título ajustado de volumen celular empaquetado, edad o similares, puede tener lugar un cambio entre semicontinuo y perfusión. Por ejemplo, este cambio puede tener lugar en o aproximadamente el día 7 del cultivo, pero puede tener lugar un día o dos antes o después. La formulación de alimentación de perfusión contiene glucosa a una concentración de hasta 15 g/l o más, pero no contiene galactosa. En una realización, el medio de perfusión contiene 15 g/l de glucosa.

20 Cuando el cultivo de perfusión alcanza un punto desencadenante predeterminado, tal como viabilidad celular deseada, densidad celular, volumen celular empaquetado en porcentaje, título, título ajustado de volumen celular empaquetado, edad o similares, se reduce la concentración de glucosa en el medio de cultivo celular. Por ejemplo, este cambio se puede iniciar el día 11 del cultivo, pero puede tener lugar un día o dos antes o después. En ese momento el cultivo celular se somete a perfusión con el medio de cultivo celular que contiene una concentración inferior de glucosa. Tal concentración inferior de glucosa dará como resultado una concentración inferior de glucosa medida en los medios usados de o casi 0 g/l. La glucosa se puede suministrar a hasta 8 g/l.

25 En una realización, se suministra glucosa hasta 6 g/l. En otra realización se suministra glucosa hasta 4 g/l. En otra realización, se suministra glucosa hasta 3 g/l. En otra realización la glucosa es 2 a 3 g/l. En otra realización más, la glucosa es 2,5 g/l. En otra realización, la glucosa es 0 g/l.

30 El estado de glucosa limitada en el cultivo celular se mantiene haciendo un seguimiento de la concentración de glucosa en el cultivo celular, tal como midiendo la concentración de glucosa en el medio usado, y ajustando la concentración de glucosa en la formulación del medio de perfusión para mantener un nivel de o casi 0 g/l en el medio usado.

35 El medio de cultivo celular que contiene la concentración inferior de glucosa también se puede complementar con galactosa a una concentración de hasta 20 g/l. En una realización la concentración de galactosa es de 10 a 15 g/l. En otra realización la concentración de galactosa es de 11,5 g/l.

40 El cultivo celular se puede mantener continuamente en un estado de glucosa limitada complementado con galactosa. El cultivo celular se puede mantener en un estado de glucosa limitada complementado con galactosa hasta la recolección. El cultivo celular se puede restaurar a un estado limitado de no glucosa sin complementos de galactosa y el proceso entero comenzado de nuevo.

45 El cultivo celular también se podría mantener en un sistema de cultivo de perfusión para tanto las fases de crecimiento como de producción. Una vez inoculado dentro del biorreactor de producción las células mamíferas se someten a una fase de crecimiento exponencial durante dicho tiempo el cultivo celular se somete a perfusión con medio de cultivo celular libre de suero y/o químicamente definido complementado con 5 a 15 g/l de glucosa. El medio de cultivo celular no contiene galactosa. El cultivo se mantiene hasta que se alcanza un punto desencadenante deseado, por ejemplo, densidad celular viable deseada, viabilidad celular, volumen celular empaquetado en porcentaje, título, título de volumen ajustado celular empaquetado, edad o similares. En ese momento el cultivo celular se somete a perfusión con un medio de cultivo celular que contiene una concentración limitante de glucosa. Tal concentración limitante de glucosa dará como resultado una concentración de glucosa en los medios usados de o casi 0 g/l de glucosa. Se puede suministrar glucosa a hasta 8 g/l. En una realización, se suministra glucosa hasta 6 g/l. En otra realización se suministra glucosa hasta 4 g/l. En otra realización, se suministra glucosa hasta 3 g/l. En otra realización, la glucosa es 2 a 3 g/l. En otra realización más, la glucosa es 2,5 g/l. En otra realización, la glucosa es 0 g/l.

60 El medio de cultivo celular que contiene la cantidad limitante de glucosa también puede contener galactosa a una concentración de hasta 20 g/l. En una realización la concentración de galactosa es de 10 a 15 g/l. En otra realización la concentración de galactosa es de 11,5 g/l.

65 Además, el medio de cultivo celular que contiene la cantidad limitante de glucosa también puede contener glutamina además de galactosa. La glutamina está a una concentración de 1 a 20 mM en combinación con galactosa. En una realización la concentración de glutamina es de 5 a 10 mM.

La densidad celular viable puede ser una señal para la transición a la fase de producción o para reducir la concentración de glucosa en el medio de cultivo celular. También puede ser deseable mantener un cierto intervalo o nivel de densidad celular viable durante la fase de producción. En una realización la densidad celular viable es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a al menos aproximadamente  $60 \times 10^6$  células viables/ml. En otra realización la densidad celular viable es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a  $50 \times 10^6$  células viables/ml. En otra realización la densidad celular viable es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a  $40 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización preferida la densidad celular viable es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a  $30 \times 10^6$  células viables/ml. En otra realización preferida la densidad celular viable es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a  $20 \times 10^6$  células viables/ml. En otra realización preferida la densidad celular viable es de  $20 \times 10^6$  células viables/ml a  $30 \times 10^6$  células viables/ml. En otra realización preferida más la densidad celular viable es de  $20 \times 10^6$  células viables/ml a  $25 \times 10^6$  células viables/ml. En una realización incluso más preferida la densidad celular viable es al menos aproximadamente  $20 \times 10^6$  células viables/ml.

El volumen celular empaquetado en porcentaje (%PCV) también se puede usar como una señal para la transición a la fase de producción o para comenzar la alimentación del cultivo celular con un medio de cultivo celular que contiene una cantidad limitante de glucosa. El cultivo celular también se puede mantener a un volumen celular empaquetado deseado durante la fase de producción. En una realización el volumen celular empaquetado es igual a o menos del 30 %. En una realización preferida el volumen celular empaquetado es al menos aproximadamente 15 a 30 %. En una realización preferida el volumen celular empaquetado es al menos aproximadamente 20 a 25 %. En otra realización preferida el volumen celular empaquetado es igual a o menos del 25 %. En otra realización preferida el volumen celular empaquetado es igual a o menos del 15 %. En otra realización preferida el volumen celular empaquetado es igual a o menos del 20 %. En otra realización preferida más el volumen celular empaquetado es igual a o menos del 15 %.

Un medio de cultivo celular de perfusión que tiene una concentración reducida de asparagina se puede usar para detener el crecimiento celular mientras que se mantiene la productividad y la viabilidad durante la fase de producción. En una realización preferida la concentración de asparagina es al menos aproximadamente 0 mM a al menos aproximadamente 5 mM de asparagina, véase la publicación WIPO N.º WO 2013/006479.

Como se usa en el presente documento, "flujo de perfusión" es la cantidad de medios que se pasa a través (añadidos y eliminados) de un biorreactor, generalmente expresado como alguna parte o múltiplo del volumen de trabajo, en un tiempo dado. "Volumen de trabajo" se refiere a la cantidad de volumen de biorreactor usado para el cultivo celular. En una realización el flujo de perfusión es un volumen de trabajo o menos por día. El medio de alimentación de perfusión se puede formular para maximizar la concentración de nutriente de perfusión para minimizar del índice de perfusión.

Como se usa en el presente documento, "densidad celular" se refiere al número de células en un volumen dado de medio de cultivo. "Densidad celular viable" se refiere al número de células vivas en un volumen dado de medio de cultivo, determinado por ensayos de viabilidad convencionales (tales como método por exclusión de tinte azul de tripán).

Como se usa en el presente documento, "volumen celular empaquetado" (PCV), también referido como "volumen celular empaquetado en porcentaje" (% PCV), es la relación del volumen ocupado por las células, y el volumen total del cultivo celular, expresado como porcentaje (véase Stettler, y col., (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dic 20:95(6):1.228-33). El volumen celular empaquetado es una función de la densidad celular y el diámetro celular; incrementos en el volumen celular empaquetado podrían surgir a partir de incrementos en o bien la densidad celular o el diámetro celular o ambos. El volumen celular empaquetado es una medida del contenido sólido en el cultivo celular. Los sólidos se separan durante la recolección y la purificación posterior. Más sólidos significa más esfuerzo para separar el material sólido del producto deseado durante las etapas de recolección y purificación posterior. También, el producto deseado puede llegar a estar atrapado en los sólidos y perdido durante el proceso de recolección, dando como resultado una disminuida producción de producto. Puesto que las células hospedadoras varían en tamaño y los cultivos celulares también contienen células muertas y que se mueren y otros restos celulares, el volumen celular empaquetado es un modo más preciso de describir el contenido sólido dentro de un cultivo celular que la densidad celular o la densidad celular viable.

Con el fin de esta invención, el medio de cultivo celular es un medio adecuado para el crecimiento de células animales, tales como células mamíferas, en cultivo celular *in vitro*. Las formulaciones de medios de cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Generalmente, los medios de cultivo celular están comprendidos de tampones, sales, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y elementos esenciales traza. "Libre de suero" se aplica a un medio de cultivo celular que no contiene sueros animales, tales como suero fetal bovino. Diversos medios de cultivo de tejido, incluyendo los medios de cultivo definidos, están comercialmente disponibles, por ejemplo, uno cualquiera o una combinación de los siguientes medios de cultivo celular: Medio RPMI-1640, Medio RPMI-1641, Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Medio Eagle esencial mínimo, Medio F-12K, Medio F12 de Ham, Medio de Dulbecco modificado de Iscove, Medio 5A de McCoy, Medio L-15 de Leibovitz, y medios libre de suero tales como EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), entre otros. Versiones libres de suero de tales medios de cultivo están también disponibles. Los medios de cultivo celular se pueden complementar con concentraciones adicionales o incrementadas de componentes tales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas,

factores de crecimiento, tampones, antibióticos, lípidos, elementos traza y similares, dependiendo de los requerimientos de las células a cultivar y/o los parámetros de cultivo celular deseados.

5 Los medios de cultivo celular pueden ser libres de suero, libres de proteína y/o libres de peptona. "Libre de suero" se aplica a un medio de cultivo celular que no contiene sueros animales, tales como suero fetal bovino. "Libre de proteína" se aplica a medios de cultivo celular libres de proteína exógenamente añadida, tal como transferrina, factores de crecimiento proteico IGF-1, o insulina. Medios libres de proteína pueden o no pueden contener peptonas. "Libre de peptona" se aplica a los medios de cultivo celular que no contienen hidrosilatos de proteína exógenos tales como hidrolisatos de proteína animal y/o vegetal. El caldo de cultivo celular o terminología similar se refiere a los  
10 medios de cultivo celular que contiene, entre otras cosas, células mamíferas viables y no viables, metabolitos celulares y restos celulares tales como ácidos nucleicos, proteínas y liposomas.

15 Los cultivos celulares también se pueden complementar con medio de alimentación concentrado que contiene componentes, tales como nutrientes y aminoácidos, que se consumen durante el transcurso de la fase de producción del cultivo celular. El medio de alimentación concentrado puede estar basado en justo aproximadamente cualquier formulación de medios de cultivo celular. Tal medio de alimentación concentrado puede contener en cualquier parte de uno o casi todos los componentes del medio de cultivo celular a, por ejemplo, aproximadamente 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X, o incluso aproximadamente 1.000X de su cantidad normal, véase por ejemplo la publicación WIPO N.º WO2012/145682.

20 El método según la presente invención se puede usar para mejorar la producción de proteínas recombinantes en procesos de cultivo de fase múltiple. En un proceso de fase múltiple, las células se cultivan en dos o más fases distintas. Por ejemplo, las células se pueden cultivar primero en una o más fases de crecimiento, bajo condiciones ambientales que maximizan la proliferación celular y la viabilidad, a continuación, se transfieren a una fase de producción, bajo condiciones que maximizan la producción de proteína. En un proceso comercial para la producción de una proteína por células mamíferas, hay fases de crecimiento normalmente múltiples, por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 que ocurren en diferentes recipientes de cultivo que preceden un cultivo de producción final. Las fases de crecimiento y producción pueden ser precedidas por, o separadas por, una o más fases de transición. En procesos de fase múltiple, el método según la presente invención se puede emplear al  
25 menos durante la fase de crecimiento y producción de la fase de producción final de un cultivo celular comercial, aunque también se puede emplear en una fase de crecimiento precedente. Una fase de producción se puede conducir a gran escala. Un proceso a gran escala se puede conducir en un volumen de al menos aproximadamente 100, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000, 7.000, 8.000, 10.000, 15.000, 20.000 litros. En una realización preferida la producción se lleva a cabo en biorreactores de 500 l, 1.000 l y/o 2.000 l. Una fase de crecimiento puede ocurrir a una temperatura mayor que una fase de producción. Por ejemplo, una fase de crecimiento puede ocurrir a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C, y una fase de producción puede ocurrir a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 37 °C, opcionalmente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 36 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 34 °C. Además, los inductores químicos de la producción de proteína, tal como, por ejemplo, cafeína, butirato y hexametileno bisacetamida (HMBA), se puede añadir a la vez que, antes, y/o después de un cambio de temperatura. Si los inductores se añaden después de un cambio de temperatura, se pueden añadir de una hora a cinco días después del cambio de temperatura, opcionalmente de uno a dos días después del cambio de temperatura. Los cultivos celulares se pueden mantener durante días o incluso semanas mientras que las células producen la(s) proteína(s) deseada(s).

30 45 Generalmente los cultivos celulares que preceden el cultivo de producción final (N-x a N-1) se usan para generar las células semilla que se usarán para inocular el biorreactor de producción, el cultivo N-1. La densidad de célula semilla puede tener un impacto positivo sobre el nivel de la proteína recombinante producida. Los niveles de producto tienden a incrementar con el incremento de la densidad de semilla. El mejoramiento en título no solamente está ligado a la mayor densidad de semilla, sino es probable que esté influido por el estado del ciclo celular y metabólico de las células que se colocan en la producción.  
50

Las células semilla se pueden producir por cualquier método de cultivo. Un método preferido es un cultivo de perfusión que usa la filtración de flujo tangencial alterno. Se puede hacer funcionar un biorreactor N-1 usando filtración de flujo tangencial alterno para proporcionar células a alta densidad para inocular un biorreactor de  
55 producción. Se puede usar la fase N-1 para cultivar células a densidades de  $>90 \times 10^6$  células/ml. El biorreactor N-1 se puede usar para generar cultivos semilla por bolo o se pueden usar como un cultivo madre semilla móvil que se podría mantener para sembrar biorreactores de producción múltiple a alta densidad de célula semilla. La duración de la fase de crecimiento de la producción puede oscilar de 7 a 14 días y se puede diseñar para mantener las células en crecimiento exponencial antes de la inoculación del biorreactor de producción. Los índices de perfusión, la formulación del medio y el ritmo se optimizan para cultivar células y distribuir las al biorreactor de producción en un estado que es lo más conductivo para optimizar su producción. Las densidades de célula semilla de  $>15 \times 10^6$  células/ml se pueden conseguir para sembrar los biorreactores de producción.  
60

65 Las líneas celulares (también referidas como "células hospedadoras") usadas en la invención están modificadas por ingeniería genética para expresar un polipéptido de interés comercial o científico. Las líneas celulares generalmente se derivan de un linaje que surge de un cultivo primario que se puede mantener en cultivo durante un tiempo no



limitado. Modificar por ingeniería genética la línea celular implica transfección, transformación o transducción de las células con una molécula de polinucleótido recombinante, y/o si no alteración (por ejemplo, por recombinación homóloga y activación génica o fusión de una célula recombinante con una célula no recombinante) para causar que la célula hospedadora exprese un polipéptido recombinante deseado. Los métodos y vectores para células y/o líneas celulares que están modificadas por ingeniería genética para expresar un polipéptido de interés son bien conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, diversas técnicas se ilustran en "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel y col., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, y actualizaciones trimestrales); Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., "Large Scale Mammalian Cell Culture", 1990, pp. 15-69.

Las líneas celulares animales se derivan de células cuyos progenitores se derivaron de un animal multicelular. Un tipo de línea celular animal es una línea celular mamífera. Una amplia diversidad de líneas celulares mamíferas adecuadas para el crecimiento en el cultivo están disponibles en la "American Type Culture Collection" (Manassas, Va.) y vendedores comerciales. Ejemplos de líneas celulares normalmente usadas en la industria incluyen VERO, BHK, HeLa, CV1 (incluyendo Cos), MDCK, 293, 3T3, líneas celulares de mieloma (por ejemplo, NSO, NS1), células PC12, WI38 y células de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO se usan mucho para la producción de proteínas recombinantes complejas, por ejemplo, citoquinas, factores de coagulación, y anticuerpos (Brasel y col. (1996), *Blood* 88:2.004-2.012; Kaufman y col. (1988), *J. Biol. Chem.* 263:6.352-6.362; McKinnon y col. (1991), *J. Mol. Endocrinol* 6:231-239; Wood y col. (1990), *J. Immunol.* 145:3.011-3.016). Las líneas celulares mutantes deficientes de dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub y col. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4.216-4.220), DXB11 y DG-44, son líneas celulares hospedadoras de CHO deseables debido a que el sistema de expresión génica seleccionable y amplificable de DHFR eficiente permite la expresión de proteína recombinante de alto nivel en estas células (Kaufman R.J. (1990), *Meth. Enzymol.* 185:537-566). Además, estas células son fáciles de manipular como cultivos adherentes o de suspensión y presentan estabilidad genética relativamente buena. Las células CHO y las proteínas expresadas recombinantemente en ellas han sido caracterizadas ampliamente y han sido aprobadas para su uso en la producción comercial clínica por agencias reguladoras.

Los métodos de la invención se pueden usar para cultivar células que expresan proteínas recombinantes de interés. Las proteínas recombinantes expresadas se pueden secretar dentro del medio de cultivo del cual se pueden recuperar y/o recoger. Además, las proteínas se pueden purificar, o parcialmente purificar, de tal cultivo o componente (por ejemplo, de medio de cultivo) usando procesos y productos conocidos disponibles de los vendedores comerciales. A continuación, las proteínas purificadas se pueden "formular", significando intercambiar de tampón, esterilizar, empaquetar a granel, y/o empaquetar para un usuario final. Las formulaciones adecuadas para las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas descritas en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18<sup>o</sup> ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Como se usa en el presente documento "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable por todo el documento y se refiere a una molécula que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos unos a otros por enlaces peptídicos. Los péptidos, polipéptidos y proteínas también incluyen modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, unión lipídica, sulfatación, gama carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. "Glucoproteína" se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, que tienen al menos una cadena lateral de oligosacárido que incluye restos de manosa. Las glucoproteínas pueden ser homólogas a la célula hospedadora, o pueden ser heterólogas, es decir, extrañas, a la célula hospedadora a utilizar, tal como, por ejemplo, una glucoproteína humana producida por una célula hospedadora de ovario de hámster chino (CHO). Los polipéptidos pueden ser de interés científico o comercial, incluyendo fármacos basados en proteína. Polipéptidos incluyen, entre otras cosas, anticuerpos, proteínas de fusión, y citoquinas. Péptidos, polipéptidos y proteínas se producen por líneas celulares animales recombinantes usando métodos de cultivo celular y se pueden referir como "péptido recombinante", "polipéptido recombinante" y "proteína recombinante". La(s) proteína(s) expresada(s) se pueden producir intracelularmente o secretar dentro del medio de cultivo a partir del cual se pueden recuperar y/o recoger.

Ejemplos de polipéptidos que se pueden producir con los métodos de la invención incluyen proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas a o básicamente similares a toda o parte de una de las siguientes proteínas: factor de necrosis tumoral (TNF), ligando de flt3 (documento WO 94/28391), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, IL-2, angiopoyetina-2 (Maisonpierre y col. (1997), *Science* 277(5322): 55-60), ligando para el activador de receptor de NF-kappa B (RANKL, documento WO 01/36637), ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL, documento WO 97/01633), linfopoyetina derivada de estroma tímico, factor estimulante de colonia de granulocito, factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF, patente australiana N.º 588819), factor de crecimiento de mastocito, factor de crecimiento de célula madre (patente americana N.º 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocito, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocito, RANTES, hormona de crecimiento de proteína 2 similar a fibrinógeno humano (FGL2; n.º de acceso de NCBI. NM\_00682; Rüegg y Pytela (1995), *Gene* 160:257-62), insulina, insulintropina, factores de crecimiento similares a insulina, hormona paratiroidea, interferones que incluyen  $\alpha$ -interferones,  $\gamma$ -interferón e interferones consensos (patente americana N.º 4.695.623 y 4.897471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado de cerebro, proteínas similares a sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleuquinas, factores estimulantes de colonia, linfotóxina- $\beta$ , factor inhibidor de leucemia,

y oncostatina-M. Las descripciones de otras glucoproteínas se pueden encontrar en, por ejemplo, "Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research", todos los volúmenes (Aggarwal y Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); "Growth Factors: A Practical Approach" (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993); y "The Cytokine Handbook", Vols. 1 y 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Además los métodos de la invención serían útiles para producir proteínas que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas, un antagonista a tal receptor o cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas, y/o proteínas básicamente similares a tales receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR, referidas como p55 y p75, patente americana N.º 5.395.760 y patente americana N.º 5.610.279), receptores de Interleuquina-1 (IL-1) (tipos I y II; patente europea N.º. 0460846, patente americana N.º 4.968.607, y patente americana N.º 5.767.064), antagonistas del receptor de IL-1 (patente americana N.º 6.337.072), antagonistas o inhibidores de IL-1 (patente americana N.º 5.981.713, 6.096.728, y 5.075.222) receptores de IL-2, receptores de IL-4 (patente europea N.º. 0 367 566 y patente americana N.º 5.856.296), receptores de IL-15, receptores de IL-17, receptores de IL-18, receptores de Fc, receptor del factor estimulante de colonia de granulocito-macrófago, receptor del factor estimulante de colonia de granulocito, receptores para el factor inhibidor de oncostatina-M y leucemia, activador de receptor de NF-Kappa B (RANK, documento WO 01/36637 y patente americana N.º 6.271.349), osteoprotegerina (patente americana N.º 6.015.938), receptores para TRAIL (incluyendo receptores de TRAIL 1, 2, 3 y 4) y receptores que comprenden dominios de muerte, tales como Fas o receptor inductor de apoptosis (AIR).

Otras proteínas que se pueden producir usando la invención incluyen proteínas que comprenden toda o parte de las secuencias de aminoácidos de antígenos de diferenciación (referidos como proteínas CD) o sus ligandos o proteínas básicamente similares a cualquiera de estos. Tales antígenos se describen en "Leukocyte Typing VI" ("Proceedings of the VIth International Workshop and Conference", Kishimoto, Kikutani y col., eds., Kobe, Japón, 1996). Proteínas CD similares se describen en posteriores talleres. Ejemplos de tales antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos a los mismos (ligando de CD27, ligando de CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia del receptor de TNF, que también incluye 41BB y OX40. Los ligandos con frecuencia son miembros de la familia TNF, ya que son ligando de 41BB y ligando de OX40.

Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden producir mediante la invención. Ejemplos incluyen proteínas que comprenden toda o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína básicamente similar a una de estas: una desintegrina y miembros de la familia de dominio de metaloproteinasas incluyendo la enzima de conversión de TNF-alfa, diversas quinasas, glucocerebrosidasas, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno de tejido, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, antitripsina alfa-1, ligandos para cualquiera de las enzimas anteriormente mencionadas, y numerosas otras enzimas y sus ligandos.

El término "anticuerpo" incluye la referencia a inmunoglobulinas de cualquier isotipo o subclase o a una región de unión a antígeno del mismo que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica, a menos que se especifique lo contrario, incluyendo humano, humanizado, quimérico, multiespecífico, monoclonal, policlonal y oligómeros o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. También se incluyen proteínas que tienen un fragmento de unión a antígeno o región tal como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, diacuerpos, Fd, dAc, maxicuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, fragmentos de la región determinante complementaria (CDR), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión de antígeno específica a un polipéptido diana. El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, los que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula hospedadora sometida a transfección para expresar el anticuerpo.

Ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que reconocen una cualquiera o una combinación de proteínas que incluyen, pero no se limitan a, las proteínas anteriormente mencionadas y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, subunidades del receptor de IL-18, FGL2, PDGF- $\beta$  y sus análogos (véase las patentes americanas N.º 5.272.064 y 5.149.792), receptor de VEGF, TGF, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 1, EGF (véase la patente americana N.º 6.235.883) receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocito, ligando de osteoprotegerina, interferón gama, estimulador del linfocito B (BlyS, también conocido como BAFF, THANK, TALL-1, y zTNF4; véase Do y Chen-Kiang (2002), *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(1):19-25), complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con el cáncer de pulmón), HER-2, HER-3, una glucoproteína asociada a tumor TAG-72, el antígeno SK-1, epítopos asociados a tumor que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítopos o proteínas asociados a cáncer expresados en células cancerosas de pecho, colon, célula escamosa, próstata, pancreático, de pulmón y/o riñón y/o en células de melanoma, glioma, o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores TRAIL 1, 2, 3 y 4, RANK, ligando de RANK, TNF- $\alpha$ , la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM),

molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), leucointegrina adhesina, la glucoproteína de plaqueta gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardiaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor VIIa-factor de tejido), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), fetoproteína alfa (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocito T citotóxico), receptor de Fc-γ-1, HLA-DR 10 beta, antígeno de HLA-DR, esclerostina, L-selectina, Virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans*, y *Staphylococcus aureus*. Ejemplos específicos de anticuerpos conocidos que se pueden producir usando los métodos de la invención incluyen pero no se limitan a adalimumab, bevacizumab, infliximab, abciximab, alemtuzumab, bapineuzumab, basiliximab, belimumab, briakinumab, canakinumab, certolizumab pegol, cetuximab, conatumumab, denosumab, eculizumab, gemtuzumab ozogamicina, golimumab, ibritumomab tiuxetan, labetuzumab, mapatumumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, muromonab-CD3, natalizumab, nimotuzumab, ofatumumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pemtumomab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, rovelizumab, tocilizumab, tositumomab, trastuzumab, ustekinumab, vedolizomab, zalutumumab y zanolimumab.

La invención se puede usar para producir proteínas de fusión recombinantes que comprenden, por ejemplo, cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas. Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas anteriormente mencionadas más un dominio de multimerización, tal como cremallera de leucina, una super hélice, una parte Fc de una inmunoglobulina, o una proteína básicamente similar, se pueden producir usando los métodos de la invención. Véase, por ejemplo, el documento WO94/10308; Lovejoy y col. (1993), *Science* 259:1.288-1.293; Harbury y col. (1993), *Science* 262:1.401-05; Harbury y col. (1994), *Nature* 371:80-83; Håkansson y col.(1999), *Structure* 7:255-64. Específicamente incluido entre tales proteínas de fusión recombinantes están las proteínas en las que una parte de un receptor se fusiona a una parte Fc de un anticuerpo tal como etanercept (un p75 TNFR:Fc), y betalcept (CTLA4:Fc). En otra realización son conjugados anticuerpo-fármaco.

Aunque la terminología usada en esta solicitud es estándar dentro de la técnica, las definiciones de ciertos términos se proporcionan en el presente documento para asegurar la claridad y precisión al significado de las reivindicaciones. Unidades, prefijos, y símbolos se pueden indicar en su forma aceptada por SI. Los intervalos numéricos indicados en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo e incluyen y son de apoyo de cada número entero dentro del intervalo definido. A menos que se indique lo contrario, los términos "un" o "una" se interpretan que significan "al menos uno de". Los títulos de sección usados en el presente documento son con fines organizativos solamente y no se interpretan como limitantes al asunto descrito. Los métodos y técnicas descritos en el presente documento generalmente se realizan según los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a través de la presente memoria a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3<sup>o</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane "Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press", Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

La presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento que se consideran como ilustraciones sencillas de aspectos individuales de la invención.

Los siguientes ejemplos demuestran realizaciones y aspectos de los métodos descritos y no se pretende que sean limitantes.

#### 45 Ejemplos

Se aborda la sustitución de especies de carbohidrato alternativas para glucosa dentro de un sistema biorreactor con el fin de manipular el contenido de la glucoforma de alta manosa y la calidad de proteína total.

#### 50 Ejemplo 1

Cultivo semicontinuo con alimentación de glucosa continua y alimentación de galactosa por bolo

Los efectos de la glucosa reducida y una fuente de carbono alternativa sobre el crecimiento de cultivo celular, título y calidad de producto, particularmente los niveles de Man5, se evaluaron ensayando diferentes concentraciones de glucosa y galactosa usando un proceso semicontinuo. El objetivo del experimento era reducir la cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo celular, mientras que se proporcionaba una fuente de carbono diferente a través de una alimentación de galactosa.

Se inocularon doce biorreactores Applikon de 2 l con células CHO que expresaban un anticuerpo IgG2 recombinante a 20x10<sup>5</sup> células viables/ml en un volumen de trabajo de 1 l de un medio de cultivo celular libre de suero. Los cultivos se mantuvieron a 36 °C, oxígeno disuelto (OD) al 30 %, 290 rpm de agitación, y pH de 6,95. Se suministró un suplemento de tirosina-cistina los días 2 y 5, volumétricamente al 0,36 % basado en el volumen inicial. Se añadieron CO<sub>2</sub> y carbonato de sodio 1 M según era necesario para el control de pH.

65

La alimentación por bolo de los medios de cultivo era los días 2, 5 y 9, volumétricamente basados en el 9 % del volumen inicial.

5 Se eligió un diseño de experimento de dos factores para evaluar la realización de cultivo celular y los atributos de calidad de producto con cantidades variantes de glucosa y galactosa en el medio de cultivo celular. El diseño del experimento consistió en 6 tratamientos, biorreactores duplicados para cada tratamiento como se muestra en la Tabla 1. El primer factor era alimentación de glucosa continua (glucosa continua) para administrar 3, 2 o 1 g/día de glucosa comenzando a partir del día 2. Los tratamientos con 3 g/día de glucosa también recibieron alimentaciones de glucosa por bolo adicionales para mantener la concentración de glucosa a 3 g/l. El fin era asegurar que los 10 tratamientos de 3 g/día se mantuvieran como controles positivos, teniendo nunca una limitación de glucosa.

El segundo factor era alimentaciones por bolo con (1+, 2+, 3+) y sin (1-, 2-, 3-) galactosa (bolo de galactosa). El objetivo era mantener la concentración de galactosa en los medios de cultivo celular por encima de 4 g/l comenzando el día 2.

15

Tabla 1. Diseño experimental de 2 factores para el experimento semicontinuo

Proceso	Glucosa continua, g/día	Bolo de Galactosa, g/l
719	2	0
720	3+bolo glu	0
721	3+bolo glu	4
722	1	0
723	1	4
724	2	0
725	2	4
726	3+bolo glu	0
727	2	4
728	1	0
729	3+bolo glu	4
730	1	4

20 Durante el desarrollo del cultivo, se tomaron muestras diarias para valorar el cultivo. Se determinaron la densidad celular viable (VCD) y la viabilidad a escala de mesa de trabajo usando Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Se determinó el volumen celular empaquetado usando VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Alemania). Se determinaron el pH, dióxido de carbono disuelto (pCO<sub>2</sub>), y oxígeno disuelto (pO<sub>2</sub>) usando un analizador de gas en sangre (BGA) Siemens 248 (Chiron Diagnostics, CA). Se obtuvo la concentración de galactosa usando un analizador de bioquímica selecto YSI Modelo 2700 (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH). Los datos de metabolito (glucosa, lactato y amoníaco) se obtuvieron usando Analizador Polymedco Polychem (Polymedco Inc., Cortland Manor, NY). 25 Se determinó la osmolaridad usando un micro osmómetro modelo 2020 de Advanced Instruments (Advanced Instruments, Norwood, MA). Se almacenaron muestras de sobrenadante a -80 °C. Al final de los experimentos, se descongelaron las muestras de sobrenadante libre de célula congeladas y se sometieron colectivamente a análisis de título y glucano.

30 El título se determinó usando análisis por HPLC. Las muestras de sobrenadante de cultivo celular de diferentes momentos se descongelaron y filtraron de nuevo en una placa de 96 pocillos con membrana de 0,2 µm. Las muestras se inyectaron a un sistema de HPLC (Hewlett Packard 1100) equipado con detección de UV a 280 nm usando columna Poros® A/20 de 2,1 mm Dx30 mm L (Applied Biosystems, Foster City, CA) a un flujo de 2 ml/min. El método en gradiente que usa fase móvil fosfato de sodio 100 mM/clorito de sodio 250 mM y ácido acético al 2 35 %/glicina 100 mM se usó para eluir cada muestra de proteína durante cada 5 min.

Para el análisis de glucano, las muestras de sobrenadante de cultivo celular se recogieron y purificaron por Proteína A. Las muestras purificadas se trataron con PNGasa-F y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para liberar los glucanos N-ligados. Los glucanos enzimáticamente liberados se marcaron con ácido 2-aminobenzóico (2-AA) a 80 40 °C durante 75 minutos. A continuación se separó el exceso del marcador 2-AA con un cartucho Glycoclean S. Las muestras se evaporaron durante la noche y el sedimento seco resultante se reconstituyó con agua para posterior análisis por HILIC (cromatografía líquida de interacción hidrófila). Los glucanos se inyectaron y unieron a la columna en altas condiciones orgánicas y se eluyeron con un gradiente creciente de un tampón de formato de amonio acuoso. Se usó la detección de fluorescencia para hacer un seguimiento de la elución de glucano y se calculó el 45 porcentaje relativo de las especies de glucano principales y menores.

Resultados del proceso semicontinuo con alimentación de glucosa continua y alimentación de galactosa por bolo

50 Los tratamientos de cultivo celular que recibieron 3 g/día de alimentación de glucosa continua (Procesos 720, 721, 726, y 729), también recibieron alimentación de glucosa por bolo para conservar su nivel por encima de 3 g/l. Procesos 720 y 726, que no recibieron alimentación de galactosa por bolo, requirieron de forma rutinaria alimentaciones por bolo de glucosa, mientras que los procesos que recibieron galactosa (procesos 721 y 729) no

requirieron alimentaciones de glucosa por bolo con frecuencia. Los cultivos celulares que recibieron 1 o 2 g/día de alimentación de glucosa continua, no recibieron ninguna alimentación de glucosa por bolo adicional. El análisis de medios usados de estos cultivos mostró que la concentración de glucosa era de 0 g/l el día 4 sin reparar en si el cultivo recibía o no las alimentaciones de galactosa por bolo (Figura 1A).

5 Los cultivos celulares que recibieron alimentaciones de galactosa por bolo (Procesos 721, 723, 725, 727, 729 y 730), mantuvieron los niveles de galactosa por encima de 2,5 g/l aunque el objetivo original era por encima de 4 g/l. (Figura 1B) Cuando se analizaron los números de consumo de galactosa, se encontró que había una diferencia estadísticamente significativa en cuánta galactosa consumían los cultivos para los cultivos con glucosa limitada (Procesos que recibieron 2 g/día o 1 g/día de alimentación de glucosa continua) o sin glucosa limitada (Procesos que recibieron 3 g/día de alimentación de glucosa continua más alimentación de glucosa por bolo). Los cultivos con glucosa limitada consumieron un promedio de 4,60 gramos de galactosa total, mientras que aquellos sin una limitación sobre la glucosa consumieron un promedio de 3,81 gramos.

15 Las alimentaciones de glucosa continuas y las alimentaciones de galactosa por bolo tenían impacto significativo sobre la densidad celular viable y la viabilidad. Los cultivos con glucosa limitada (Procesos que recibieron 2 g/día o 1 g/día de alimentación de glucosa continua), junto con una alimentación de galactosa por bolo, mantuvieron buena densidad celular viable y viabilidad. Sin embargo, los cultivos con glucosa limitada (Procesos que recibieron 2 g/día o 1 g/día de alimentación de glucosa continua) que no recibieron alimentaciones de galactosa por bolo no pudieron mantener la densidad celular viable y la viabilidad una vez que la glucosa alcanzó una limitación el día 4 (Figuras 1C y 1D).

25 Los datos anteriores indicaron que la galactosa se podía usar como fuente de carbono alternativo cuando la glucosa estaba limitada en el medio de cultivo celular. Aunque los cultivos con glucosa limitada (Procesos que recibieron 2 g/día o 1 g/día de alimentación de glucosa continua), junto con alimentación de galactosa por bolo, mantuvieron buena densidad celular viable y viabilidad, el título se redujo significativamente en comparación con aquellos cultivos sin limitación de glucosa (Procesos que recibieron 3 g/día de alimentación de glucosa continua), véase la Figura 1E. El análisis estadístico mostró que el nivel de alimentación de glucosa continua tenía el mayor efecto sobre el título; la alimentación de galactosa por bolo era también significativa, pero a un menor grado.

30 Los niveles de Man5 en las muestras del día 7 se redujeron en proporción al incremento de la alimentación de glucosa desde 1 g/día a 3 g/día sin reparar en si había o no una alimentación de galactosa. La glucosa limitada era el único factor estadísticamente significativo que dio como resultado incremento de Man5 en cultivo. (Figura 1F).

### 35 Ejemplo 2

Proceso de perfusión con glucosa limitada, galactosa como fuente de carbono alternativa y la adición de glutamina

40 El estudio semicontinuo anterior mostró que la glucosa limitante era el único factor que daba como resultado incremento de Man5; sin embargo los cultivos con glucosa limitada no pudieron mantener la densidad celular viable o viabilidad celular. La fuente de carbono alternativa, galactosa, no dio como resultado incremento de Man5, pero era catabolizada por las células CHO y mantuvo buena densidad celular viable y viabilidad celular en aquellos cultivos en los que se añadió. Sin embargo, el título se redujo significativamente con niveles de glucosa limitados incluso con la fuente de carbono alternativa presente. Conseguir la calidad de producto deseable sin mejoramiento significativo en el título no es comercialmente viable, lo cual es el mismo caso que conseguir mejoramiento significativo en el título sin calidad de producto comparable.

50 Para conseguir los objetivos de mantener o mejorar el título y conseguir la calidad de producto deseable, los efectos de la glucosa baja y una fuente de carbono alternativa sobre la realización del cultivo celular y los niveles de Man5 se ensayaron en un cultivo celular de perfusión. El diseño del experimento consistió en 3 tratamientos, biorreactores duplicados para cada tratamiento.

55 En el día 0, las células CHO que expresaban un anticuerpo IgG2 recombinante se inocularon en biorreactores de producción de 3 l a  $1 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen de trabajo de 1.300 ml de un medio de cultivo celular definido libre de suero que contenía 5 a 8 g/l de glucosa. Los cultivos se mantuvieron a 36 °C, oxígeno disuelto al 30 %, agitación a 400 RPM. El cultivo se cultivó en modo discontinuo durante tres días. La concentración de glucosa en el análisis de medio usado osciló de 1 a 8 g/l.

60 En los días 3 y 6 el cultivo recibió alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero concentrado, volumen de trabajo inicial al 8 % el día 3 y volumen de trabajo inicial al 8 % el día 6. Las alimentaciones de glucosa por bolo se hicieron los días 3, 4, 5, 6, 7 para mantener una concentración objetivo de 8 g/l de glucosa en cultivo. La glucosa en el análisis de medio usado osciló de 1 a 8 g/l.

65 La perfusión se comenzó el día 7 a un índice de perfusión de 0,48 vol/día. La perfusión se consiguió usando un sistema de perfusión y filtración de flujo tangencial alterno (Refine Technologies, Hanover, NJ) con un filtro de fibra hueca de 30 kDa (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). El medio de perfusión definido libre de suero, pH 7,0, contenía

15 g/l de glucosa. La glucosa en el análisis de medio usado osciló de 3 a 8 g/l.

En el día 11 se hizo el cambio a un medio de perfusión definido libre de suero que contenía ya galactosa y que tenía una cantidad reducida de glucosa, véase Tabla 2a. La concentración de glucosa en el medio de perfusión se disminuyó a 2 g/l o 4 g/l. La galactosa estaba compuesta en el medio a 6 g/l. Se usaron alimentaciones por bolo de una solución madre de galactosa al 30 % según era necesario para mantener la galactosa a una concentración de 4 g/l o más en el cultivo celular.

Para este experimento, el medio de cultivo de perfusión también incluyó glutamina a 5 o 10 mM para determinar si la glutamina, como la glucosa, tenía algún efecto sobre la densidad celular viable, viabilidad celular, título y/o niveles de Man5 en una situación de limitación de glutamina. La bibliografía sugería que bajas concentraciones de glutamina podrían tener un impacto negativo sobre el cultivo celular. Los cultivos se sometieron a perfusión con este medio de cultivo celular hasta la recolección el día 17.

Tabla 2a. Concentración de glucosa, galactosa y glutamina en el medio de cultivo de perfusión definida libre de suero el día 11 (pH 7,0)

Proceso	Glucosa g/l	Galactosa g/l	Glutamina mM
79	2	6	10
81	2	6	10
82	4	6	10
83	4	6	10
88	4	6	5
89	4	6	5

Los perfiles del cultivo celular se muestran en la Figura 2. Los perfiles de la densidad celular viable y viabilidad muestran tendencias comparables (Figuras 2A y 2B). La viabilidad de las condiciones de baja glucosa (2 g/l) y baja glutamina (5 mM) mostraron una tendencia descendente entre el día 15 y 17. Sin embargo, la concentración de glutamina en el análisis de medios usados indicó que la glutamina no estaba limitada bajo ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 2C).

El descubrimiento sorprendente era que el título ajustado de volumen celular empaquetado (título de PCV) mostrado en la Figura 2D estaba cerca de los valores vistos para un proceso de perfusión que no estaba limitado por glucosa. El título de los experimentos de perfusión en este ejemplo era mucho mayor que el visto en el proceso semicontinuo del Ejemplo 1 que solamente produjo un título del 50 %. Estos datos indican que las células presentan un estado fisiológico diferente cuando se limita la glucosa en un proceso de perfusión que el que muestran en un proceso semicontinuo.

El análisis de los medios usados muestra que la concentración de glucosa en los sobrenadantes de cultivo tratados con 2 g/l de glucosa en el medio de perfusión alcanzó cero el día 12 y la concentración de glucosa en los sobrenadantes de cultivo tratados con 4 g/l de glucosa alcanzó cero el día 13, excepto para el Proceso 83 (Figura 2E). El análisis de medios usados confirmó que los cultivos estaban en un estado de glucosa limitada.

En general, la concentración de galactosa en el cultivo determinado por análisis de medios usados permaneció por encima de 4 g/l (Figura 2F).

La Tabla 2b muestra que la especie Man5 se incrementaba cuando la concentración de glucosa en el medio de perfusión se reducía a 2 g/l. Los datos del curso de tiempo muestran que la especie Man5 se incrementaba con un incremento en la duración del cultivo (Día 15 a Día 17). En igualdad de condiciones, cuando la concentración de glucosa en el medio de perfusión se incrementaba a 4 g/l, la especie Man5 disminuía en consecuencia. Estos resultados indican que la glucosa limitante daba como resultado un incremento en los niveles de Man5 y que el estado limitado se podía iniciar reduciendo la concentración de glucosa en el medio de cultivo celular de perfusión a 2 g/l o inferior y confirmando con análisis de medios usados. Sin embargo, la variación del proceso y la masa celular pueden impactar en la limitación de glucosa y la modificación en la especie Man5. El Proceso 83, mostró un valor de Man5 mayor que cualquier otro proceso que recibió glucosa a 4 g/l. En este caso el Proceso 83 tenía una densidad celular viable y título ajustado de volumen celular empaquetado mayores (Figuras 2A y 2D) que cualquiera de los cultivos que recibieron 2 g/l de glucosa (Procesos 79 y 81) pero similares a los Procesos 79 y 81, alcanzó una concentración de glucosa inferior que la medida por el análisis de medio gastado el día 12. Esto era antes que cualquier cultivo que recibía glucosa a 4 g/l (Figura 2E). Por lo tanto, factores tales como la masa celular y/o la variación del proceso pueden impactar en la concentración de alimentación de glucosa dando como resultado una situación de glucosa limitada. En este caso en el que la densidad celular era mayor el día 12 (Figura 2A) conduciendo a una concentración cerca de 0 g/l de glucosa en el medio usado, un estado de glucosa limitado se inició incluso aunque el cultivo celular era alimentado con un medio de alimentación de perfusión de alta glucosa (4 g/l). Una vez que la glucosa estaba limitada, se incrementaron los niveles de Man5.

## ES 2 691 801 T3

Tabla 2b. % de Man5 el día 15 y 17 después del cambio en la formulación del medio de perfusión el día 11.

Proceso	Glucosa g/l	Galactosa g/l	Glutamina mM	% Man5 día 15	% Man5 día 17
79	2	6	10	9,29	9,84
81	2	6	10	9,28	9,49
82	4	6	10	4,64	5,62
83	4	6	10	7,56	8,91
88	4	6	5	5,19	5,65
89	4	6	5	5,09	5,63

### Ejemplo 3

#### 5 Proceso de perfusión con una combinación de glucosa reducida y alta galactosa

Se realizó un experimento con un medio de perfusión definido libre de suero (pH 7,0) formulado con glucosa a concentraciones de 1,5 o 3 g/l. La galactosa se añadió a 10, 11,5 o 13 g/l, basado en la tasa de consumo total del experimento anteriormente descrito. Tanto la glucosa como la galactosa estaban compuestas en los medios de perfusión así el cultivo se podía mantener sin alimentaciones por bolo de o bien glucosa o galactosa. La composición redujo la complejidad del proceso y mejoró la uniformidad. El experimento se realizó como se describió anteriormente; usando las mismas estrategias de alimentación los días 0 a 10. La Tabla 3 proporciona las combinaciones de formulaciones de medio de perfusión los días 11 a 17.

15 Tabla 3. Diseño de experimento de glucosa y galactosa en medios de perfusión.

Proceso	Glucosa g/l	Galactosa g/l
103	3	13
104	0	10
105	0	13
106	0	10
107	1,5	11,5
108	0	13
109*	3	10
111	3	13
112	3	10
113	1,5	11,5

\*El proceso 109 se excluyó de las figuras debido al fallo operacional del biorreactor

Los perfiles de cultivo celular en la Figura 3 muestran que todas las condiciones de cultivo celular ensayadas estaban limitadas por glucosa después del cambio del día 11 (Figura 3A) y las concentraciones de galactosa medidas en el ensayo de medio usado se mantuvieron entre 4 a 8 g/l (Figura 3B) que era proporcional a las concentraciones de galactosa compuestas en el medio de perfusión. El nivel de lactato bajó en pendiente a cero una vez que la glucosa alcanzó una limitación el día 12 (Figura 3C). El nivel de amoníaco se incrementó comenzando el día 10, antes de que la glucosa alcanzara una limitación (Figura 3D). Era muy interesante ver que al reducir la concentración de glucosa comenzando el día 11 se daba como resultado crecimiento, viabilidad y título inferiores (Figuras 3E-3G). Estos resultados indican que la glucosa limitada, no limitación de glutamina, causa reducción de título en un proceso de perfusión así como el proceso semicontinuo en el Ejemplo 1. También, puesto que los niveles de glucosa de 2 a 3 g/l, e incluso hasta 4 g/l, dieron como resultado el incremento en los niveles de Man5, los niveles de glucosa también proporcionaron alguna ayuda en el mantenimiento de los niveles de título superior.

El análisis estadístico que usó el programa informático JMP (JMP Inc. Cary, NC) reveló que la concentración de glucosa era el único factor estadísticamente significativo (valor  $p=0,032$ ) que el título impactado. La galactosa no era un factor estadísticamente significativo para el título (Figura 4A). Por otro lado, tanto la glucosa como la galactosa no eran factores estadísticamente significativos que impactaban en la especie Man5, pero la interacción entre glucosa y galactosa era estadísticamente significativa (valor  $p=0,0613$ ). (Figura 4B). A mayor concentración de galactosa mayor el efecto de la glucosa limitada en la especie Man5.

En general los niveles de Man5 se incrementaron y estabilizaron cuando la glucosa osciló de 0 a 3 g/l y disminuyeron cuando los niveles de glucosa eran de 4 g/l o mayor. La Figura 5 muestra el incremento en porcentaje de la especie Man5 el día 11, 13, 15 y 17. Para todas las condiciones de cultivo, el porcentaje de especie Man5 comenzó a aproximadamente el 2 % el día 11 y a continuación se incrementó gradualmente a por el encima del 10 % el día 17. El incremento más significativo en porcentaje de la especie Man5 era los días 11 a 13 cuando la glucosa llegó a estar limitada.

Puesto que la glucosa impacta en el título, la glucosa debería ser suministrada a la mayor concentración que aún soportaría un incremento en Man5 mientras que se mantiene la viabilidad celular, densidad y título a un nivel aceptable, basado en las condiciones del cultivo celular, tales como masa celular, el proceso de cultivo celular y la fuente de carbón alterno usada. Por ejemplo, para un cultivo celular de perfusión que tenía de 15 a  $25 \times 10^6$

## ES 2 691 801 T3

células/ml, concentraciones de glucosa de 0 a 4 g/l en combinación con galactosa a 10 a 13 g/l, dieron como resultado un incremento de Man5.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la modulación de una o más especies de glucano de alta manosa sobre una proteína recombinante durante el cultivo de célula mamífera que comprende:
- 5 establecer un cultivo de célula mamífera en un biorreactor con un medio de cultivo definido libre de suero que contiene 5 a 8 g/l de glucosa;  
 cultivar las células mamíferas durante una fase de crecimiento y complementar el medio de cultivo con alimentaciones por bolo de un medio de alimentación definido libre de suero de 5 a 8 g/l de glucosa;
- 10 iniciar una fase de producción en el cultivo celular mediante perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene 5 a 15 g/l de glucosa; y  
 en un momento predeterminado durante la fase de producción, reducir la concentración de glucosa a concentraciones limitantes mediante perfusión del cultivo celular con un medio de perfusión de baja glucosa que contiene o está complementado con una cantidad disminuida de glucosa, en la que dicho medio de perfusión
- 15 contiene además o está complementado con galactosa.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la cantidad disminuida de glucosa es suficiente para dar como resultado una concentración de glucosa en el medio usado de o aproximadamente 0 g/l.
- 20 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración de la cantidad disminuida de glucosa en el medio de perfusión de baja glucosa es de 0 a 3 g/l, de 2 a 3 g/l, es 2,5 g/l o es 0 g/l.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de galactosa en el medio de perfusión es de 10 a 20 g/l, de 10 a 15 g/l, de 10 a 12 g/l, o es 11,5 g/l.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la perfusión comienza (a) en o aproximadamente el día 5 a en o aproximadamente el día 9 del cultivo celular, o (b) en o aproximadamente el día 5 a en o aproximadamente el día 7 del cultivo celular.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:
- (a) la perfusión comienza cuando las células han alcanzado una fase de producción;
- (b) la perfusión comprende perfusión continua;
- (c) el índice de perfusión es constante;
- 35 (d) la perfusión se realiza a un índice de menos de o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por día;
- (e) la perfusión se realiza a un índice que incrementa durante la fase de producción de 0,25 volumen de trabajo por día a 1,0 volumen de trabajo por día durante el cultivo celular;
- (f) la perfusión se realiza a un índice que alcanza 1,0 volumen de trabajo por día en el día 9 al día 11 del cultivo celular; o
- 40 (g) la perfusión se realiza a un índice que alcanza 1,0 volumen de trabajo por día en el día 10 del cultivo celular.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que
- (a) las alimentaciones por bolo de medio de alimentación libre de suero comienzan el día 3 o el día 4 del cultivo celular; y/o
- 45 (b) el cultivo de célula mamífera se establece inoculando el biorreactor con al menos  $0,5 \times 10^6$  a  $3,0 \times 10^6$  células/ml o con al menos  $0,5 \times 10^6$  a  $1,5 \times 10^6$  células/ml en un medio de cultivo libre de suero.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo además un cambio de temperatura de  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$  o de  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 50 9. El método según la reivindicación 8, en el que el cambio de temperatura ocurre (a) en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción, o (b) durante la fase de producción.
- 55 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo además la inducción de la detección del crecimiento celular por:
- (a) privación de L-asparagina seguido de perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos, o
- 60 (b) perfusión con un medio de perfusión libre de suero que tiene una concentración de L-asparagina de 5 mM o menos.
11. El método según la reivindicación 10, en el que la concentración de L-asparagina en el medio de perfusión libre de suero es menos de o igual a 5 mM, menos de o igual a 4,0 mM, menos de o igual a 3,0 mM, menos de o igual a 2,0 mM, menos de o igual a 1,0 mM, o es 0 mM.
- 65

12. El método según la reivindicación 10 u 11, en el que se hace un seguimiento de la concentración de L-asparagina del medio de cultivo celular antes de y durante la privación de L-asparagina.
- 5 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo además que el volumen celular empaquetado durante una fase de producción es menos de o igual al 35 %, o menos de o igual al 30 %, opcionalmente en el que la densidad celular viable del cultivo de célula mamífera es de  $10 \times 10^6$  células viables/ml a  $80 \times 10^6$  células viables/ml o  $20 \times 10^6$  células viables/ml a  $30 \times 10^6$  células viables/ml
- 10 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la perfusión se consigue por flujo tangencial alterno, opcionalmente usando un ultrafiltro o un microfiltro.
- 15 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l, al menos 500 l a 2.000 l, o al menos 1.000 l a 2.000 l.
- 15 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la especie de glucano de alta manosa es Manosa 5.
- 20 17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células mamíferas son células de ovario de hámster chino (CHO).
- 25 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína recombinante es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, una proteína de fusión recombinante o una citoquina.
- 25 19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además una etapa de recolección de la proteína recombinante producida por el cultivo celular.
- 30 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína recombinante producida por el cultivo celular se purifica y formula en una formulación farmacéuticamente aceptable.
- 35 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la producción de proteína recombinante de la especie de glucano de alta manosa se incrementa en comparación con un cultivo en el que las células no se someten a glucosa limitada en combinación con galactosa.
- 40 22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y 19 a 20, en el que la proteína recombinante es un anticuerpo, las células mamíferas son células CHO, la especie de glucano de alta manosa es Manosa 5, y en el que la producción de anticuerpo de la especie Manosa 5 se incrementa en comparación con un cultivo en el que las células CHO no se someten a glucosa limitada en combinación con galactosa.

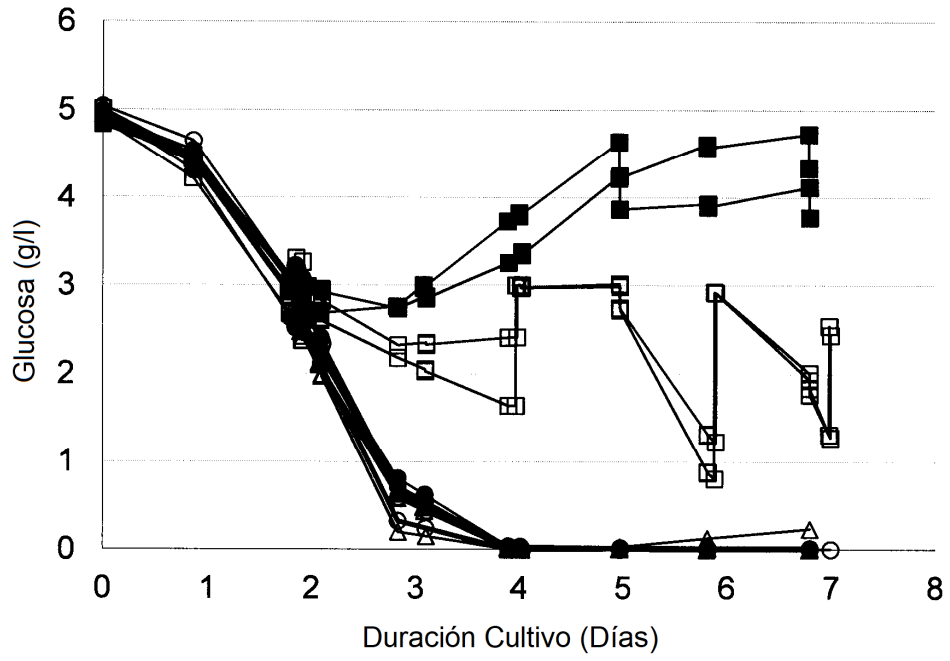


Figura 1A

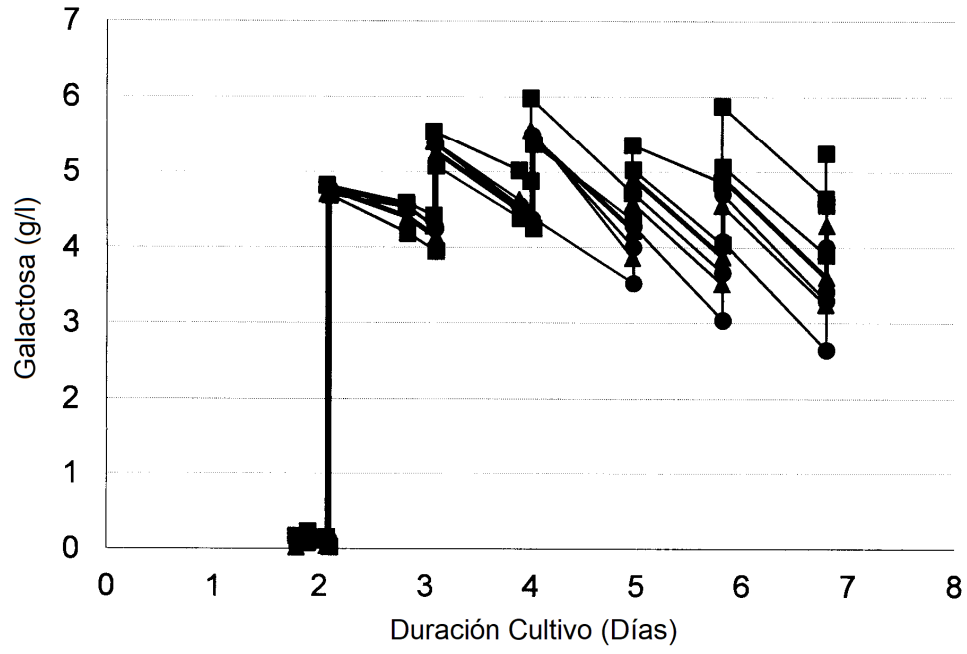


Figura 1B

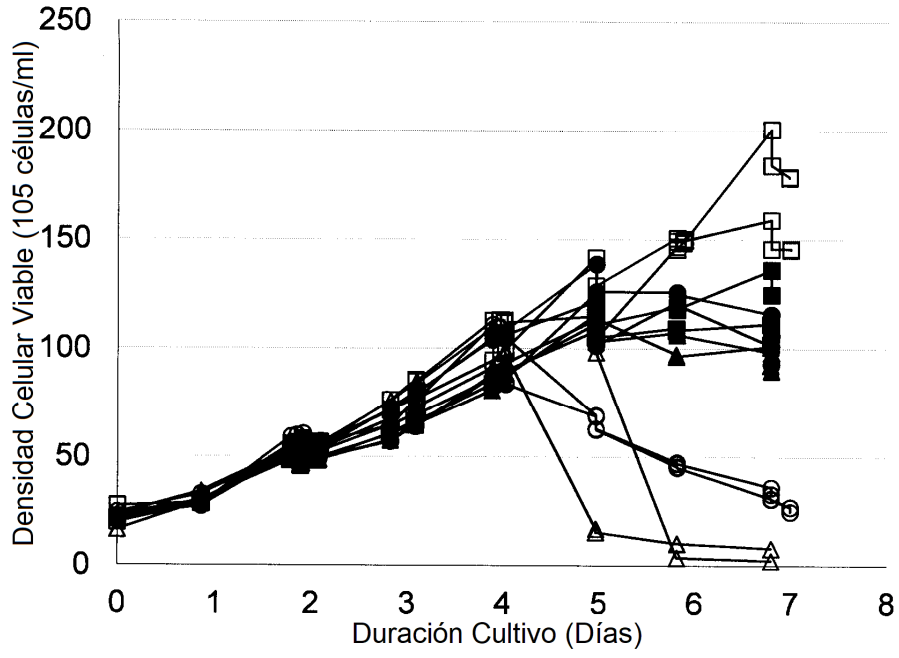


Figura 1C

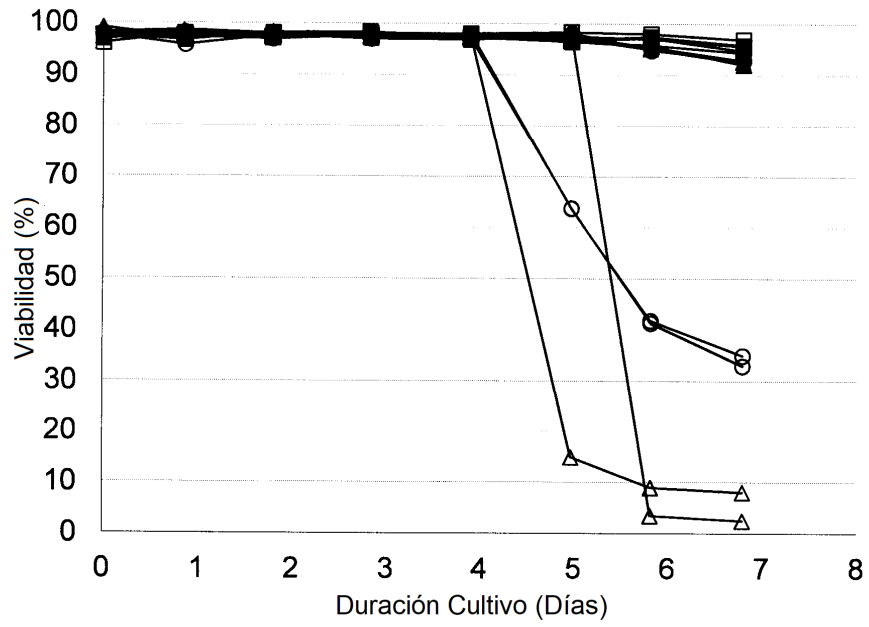


Figura 1D

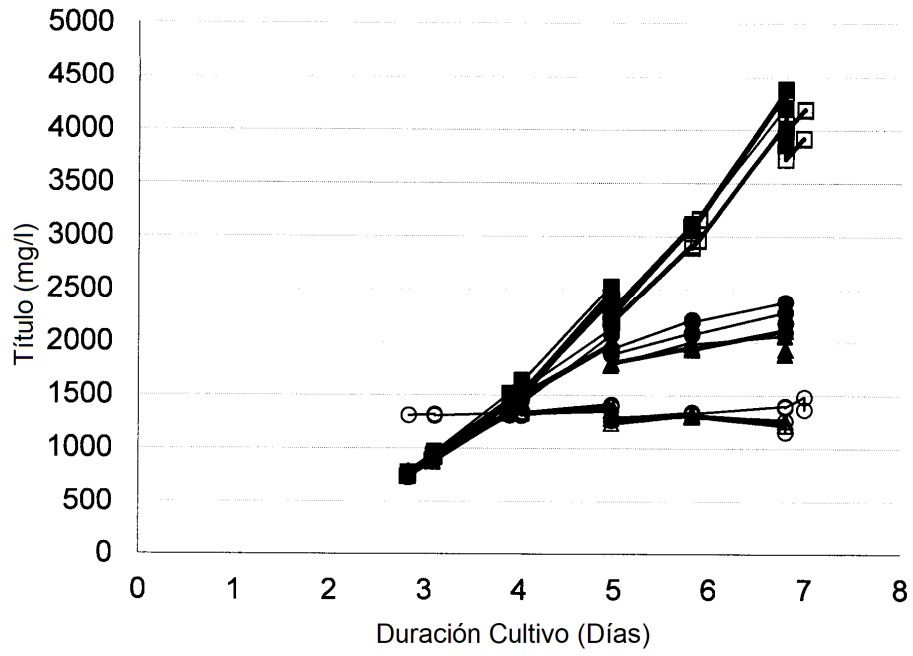
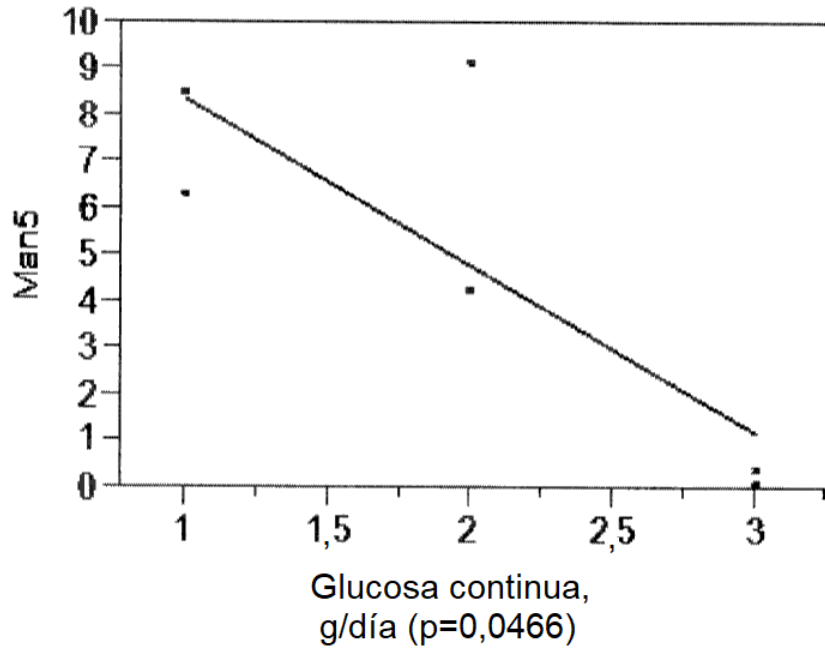


Figura 1E



**Figura 1F**



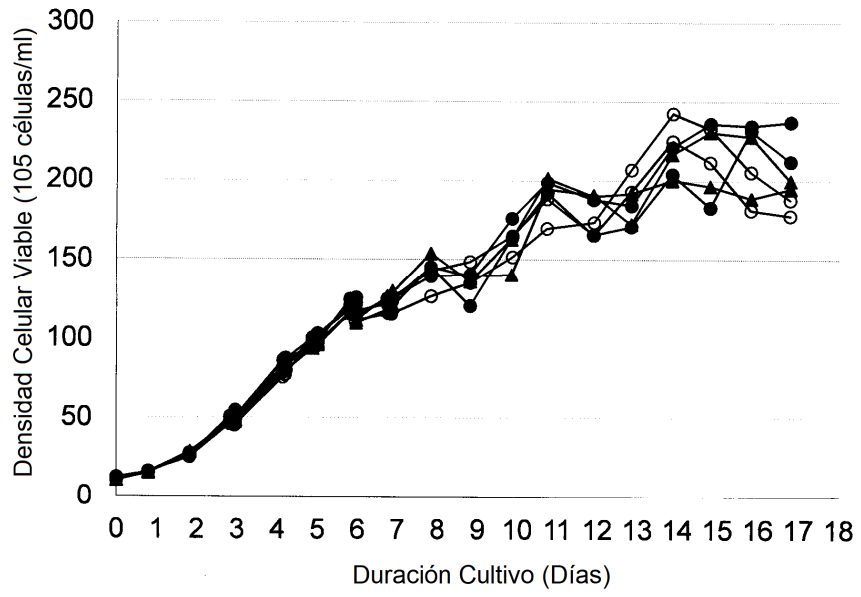


Figura 2A

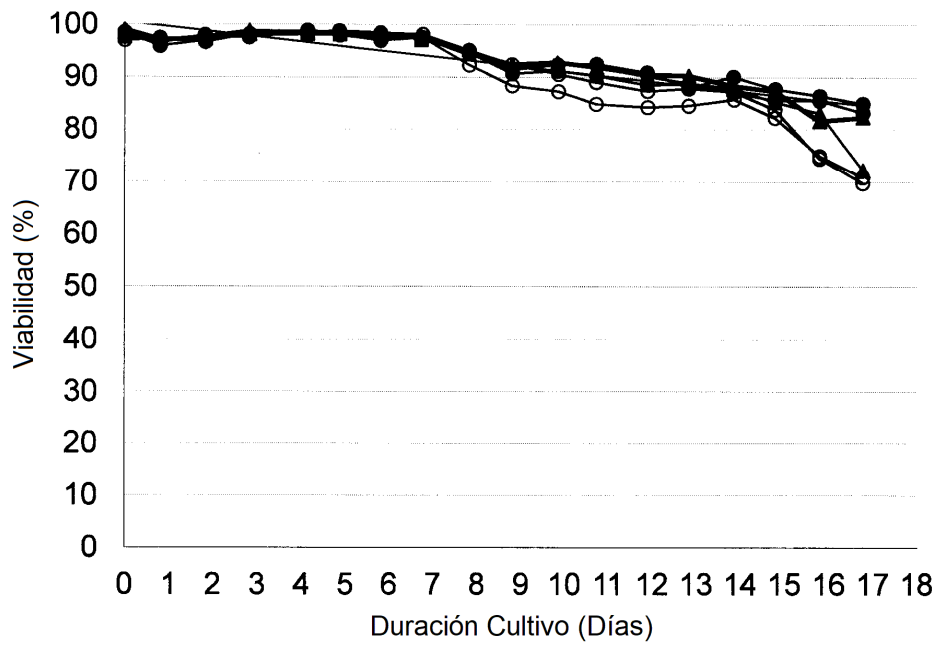


Figura 2B

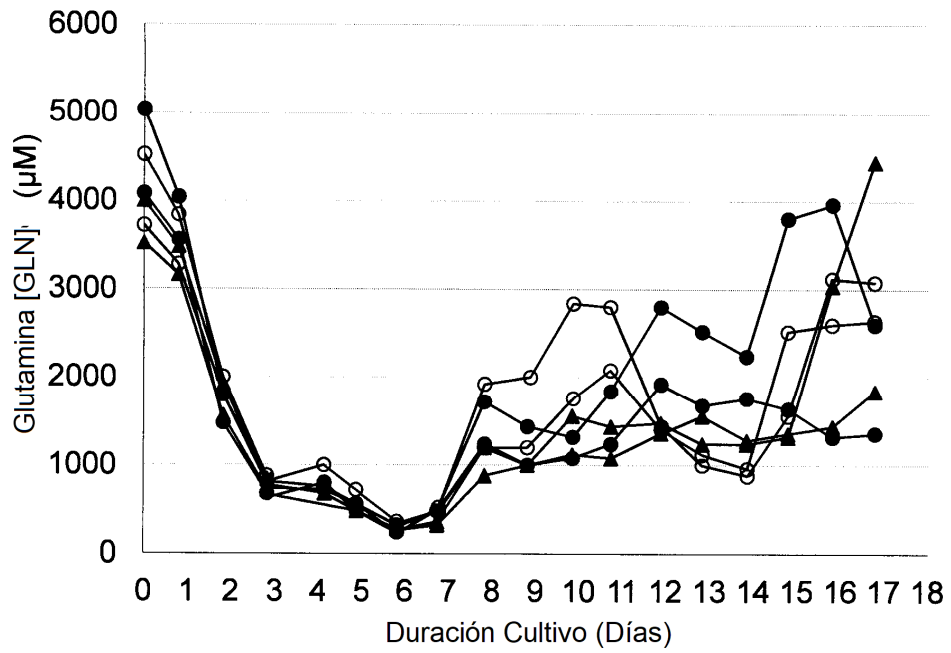


Figura 2C

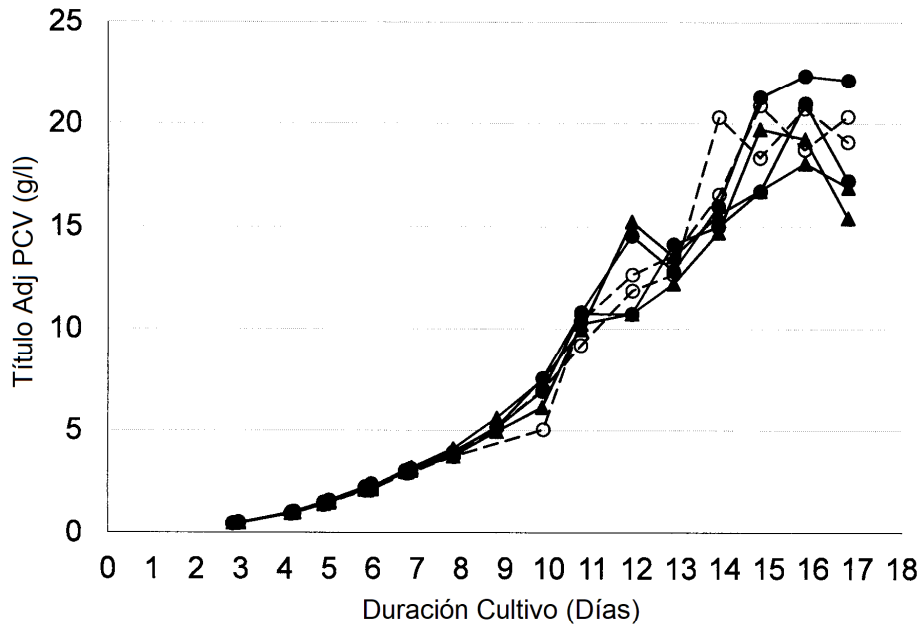


Figura 2D

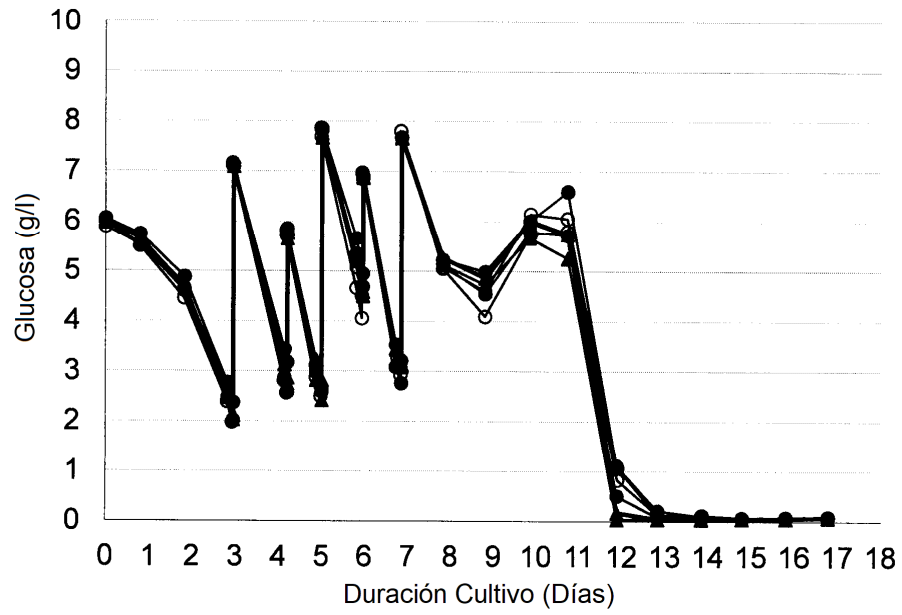


Figura 2E

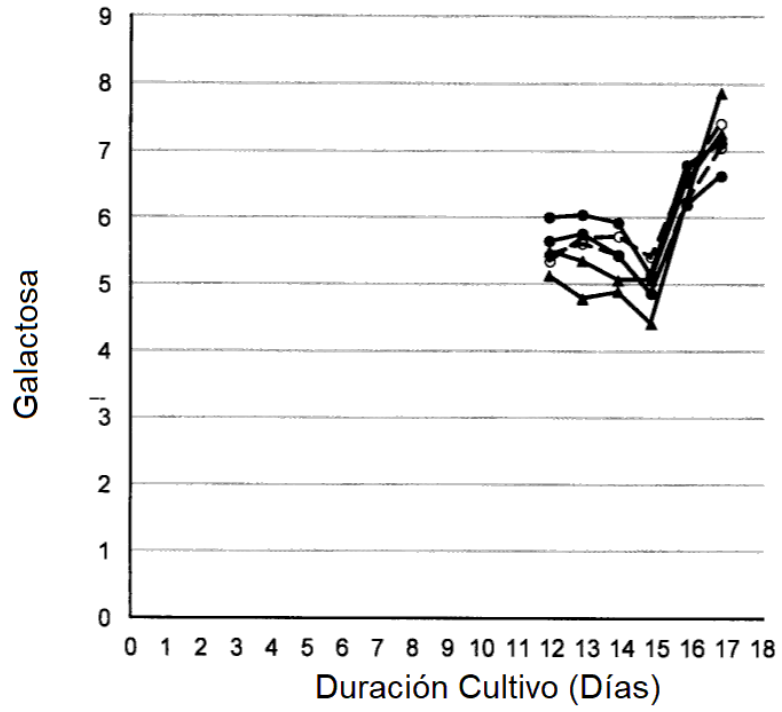


Figura 2F

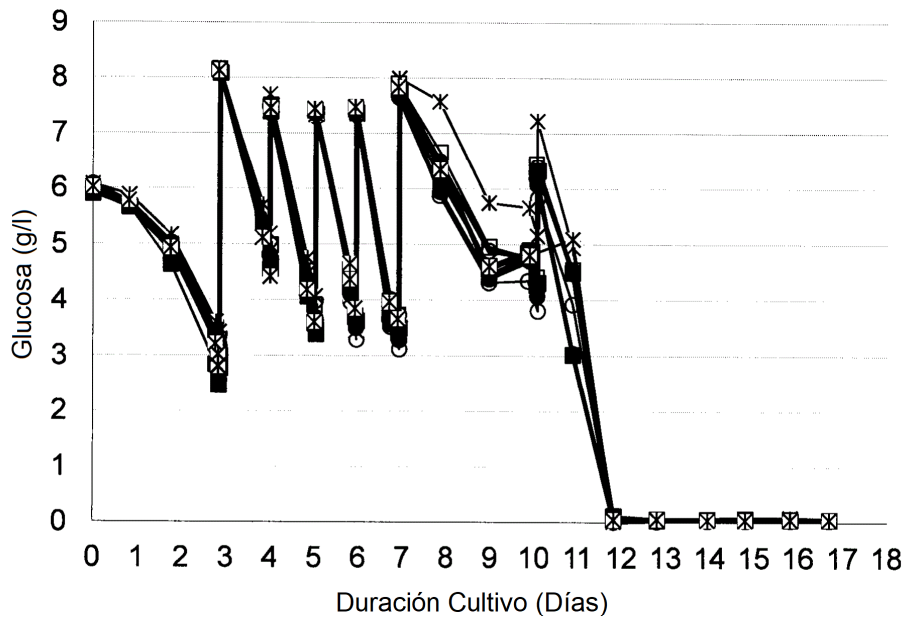
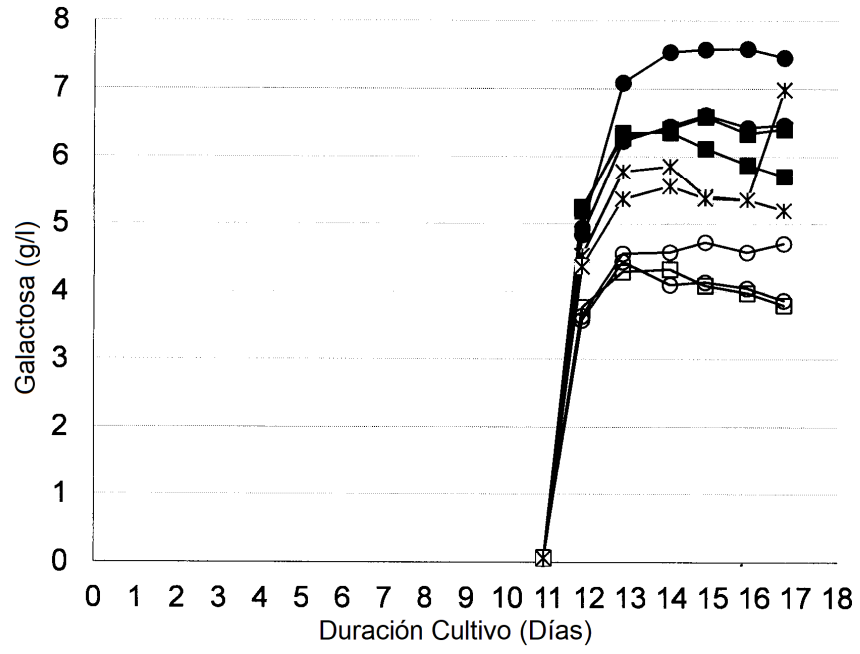


Figura 3A



**Figura 3B**



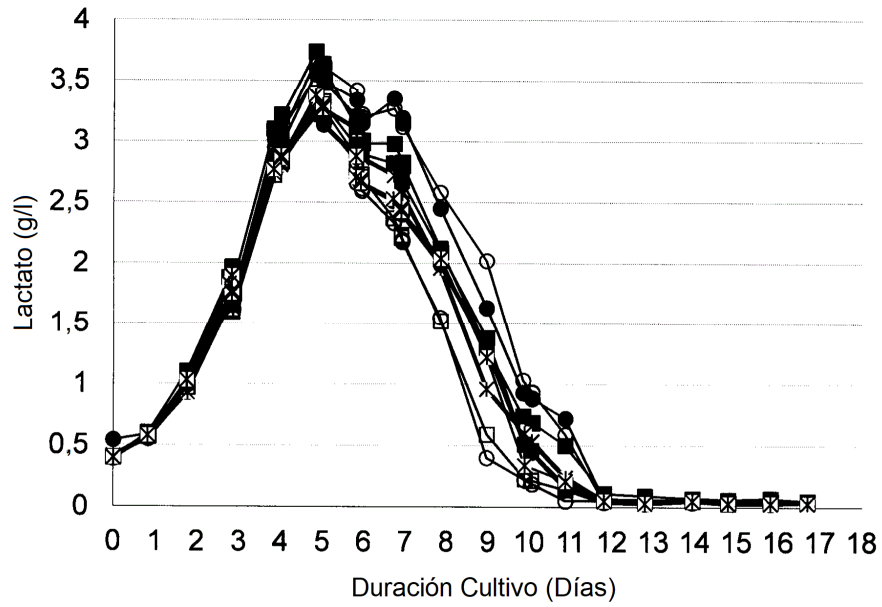


Figura 3C

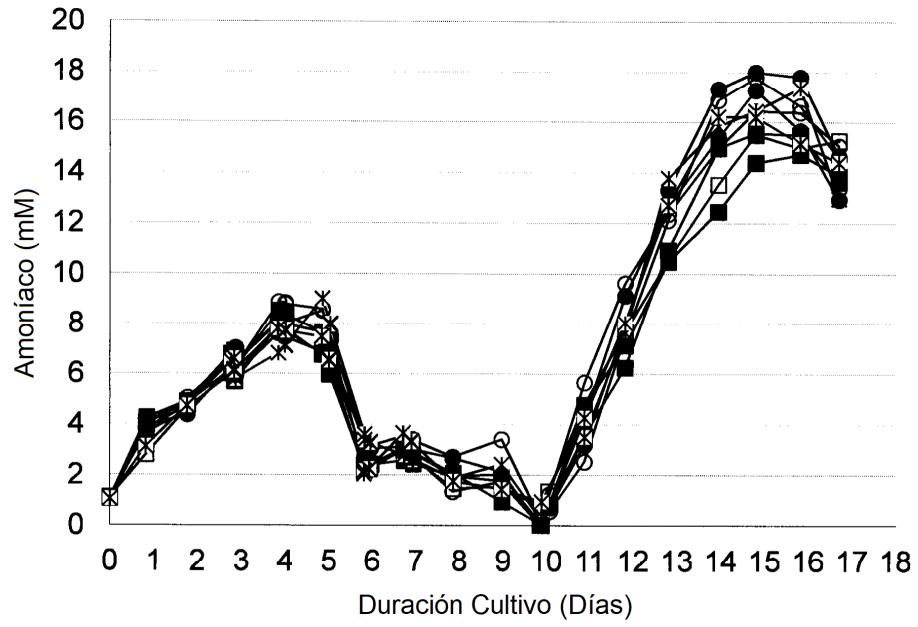


Figura 3D

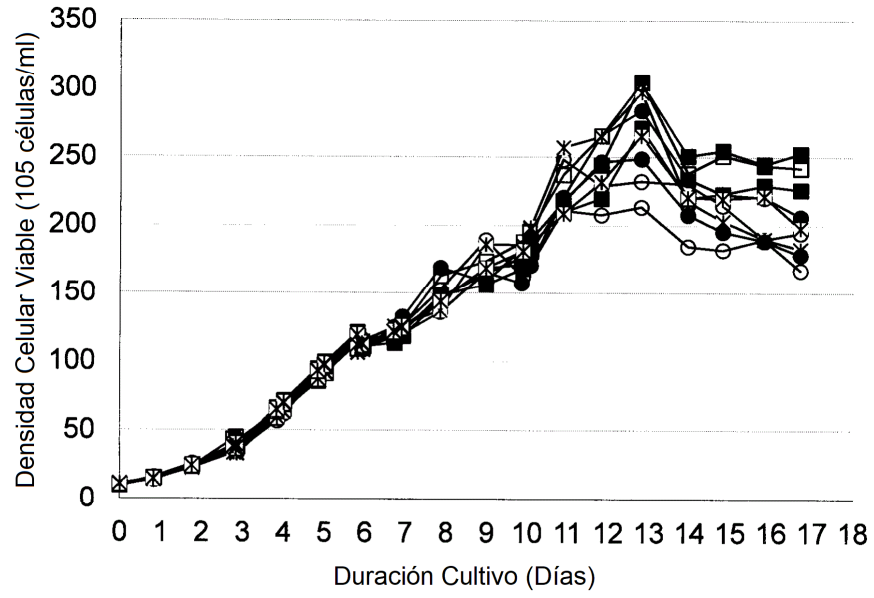


Figura 3E

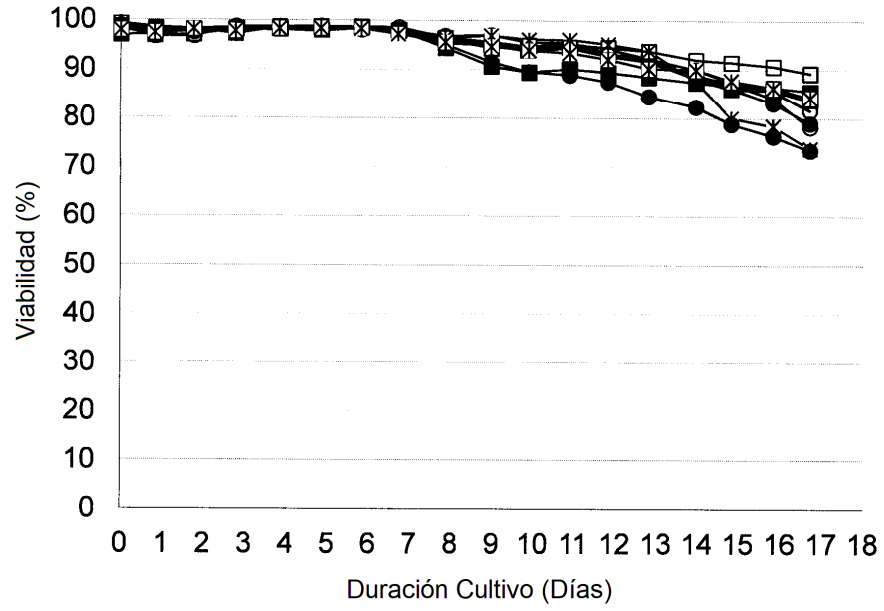


Figura 3F

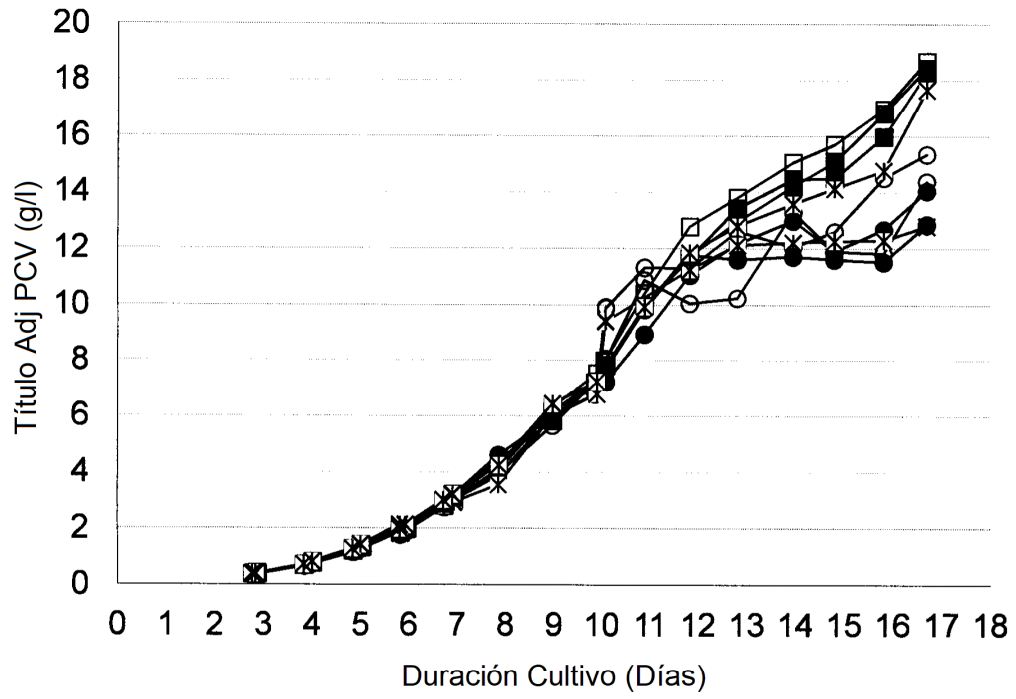


Figura 3G

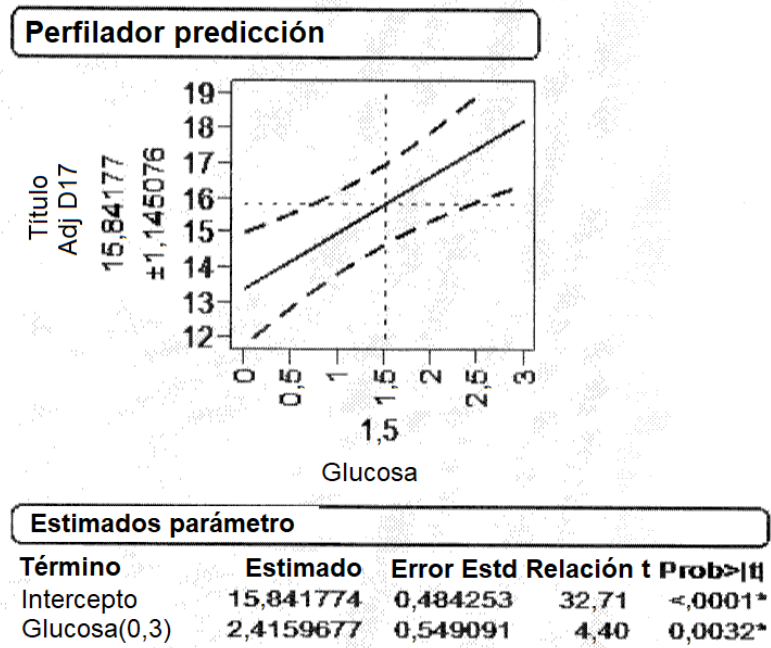


Figura 4A

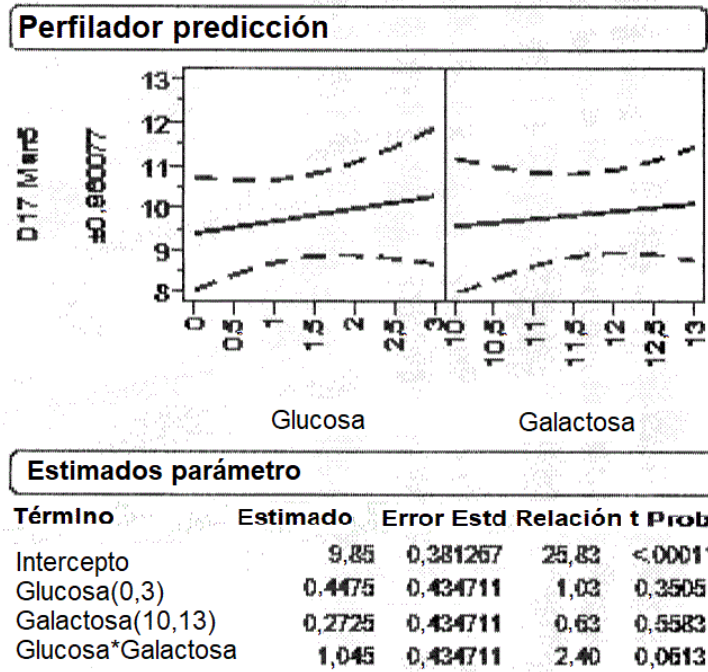
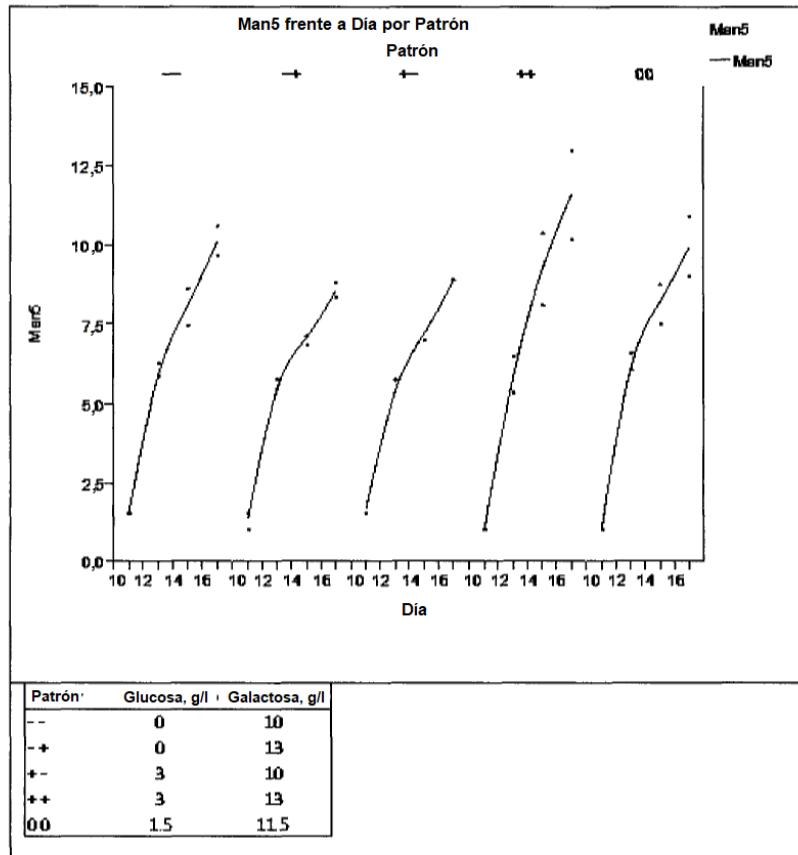


Figura 4B



**Figura 5**



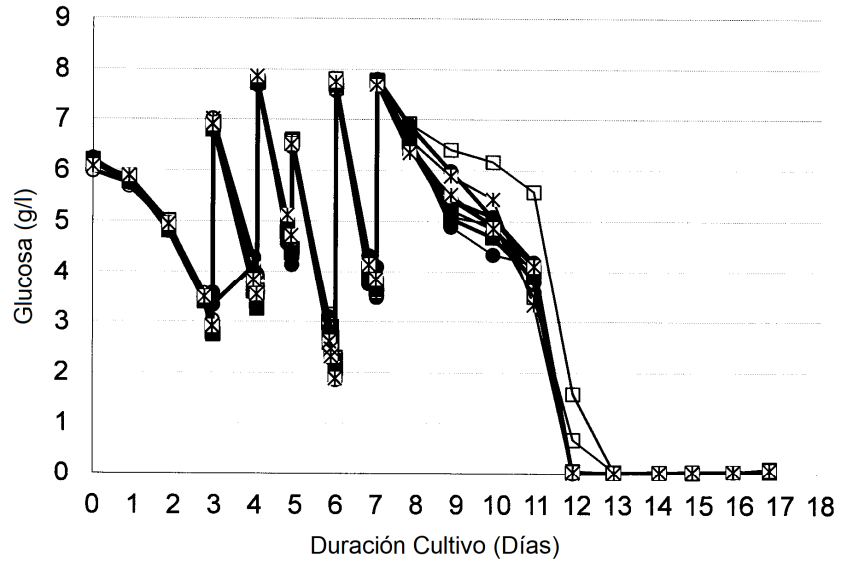


Figura 6A

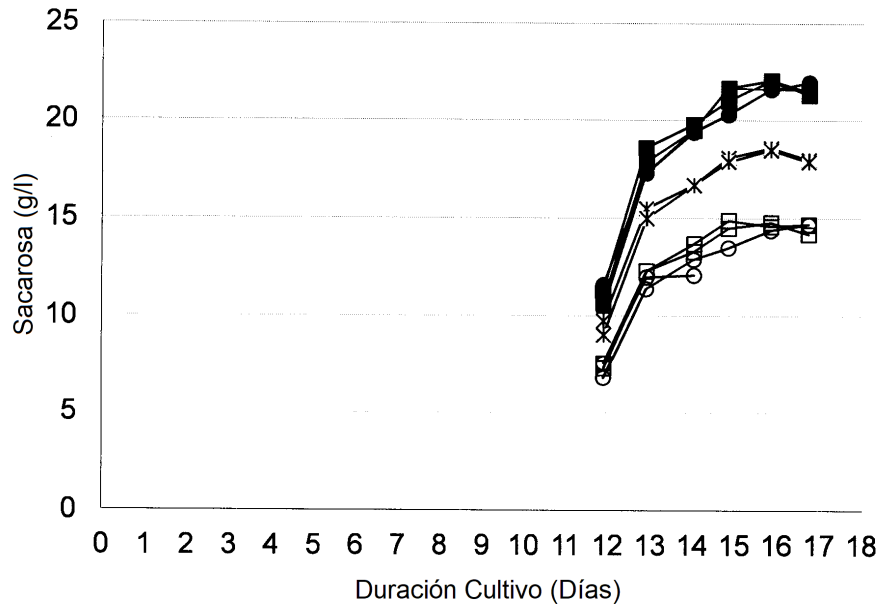


Figura 6B

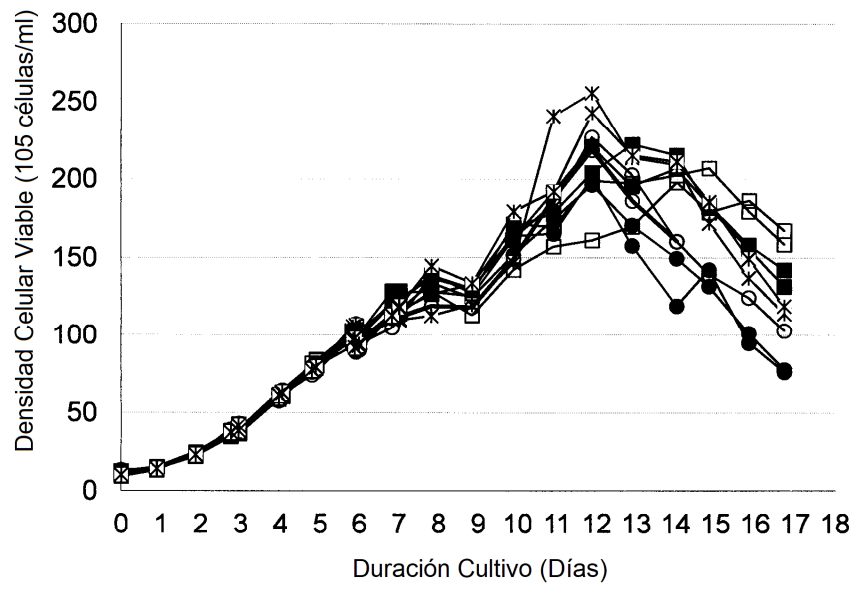


Figura 6C

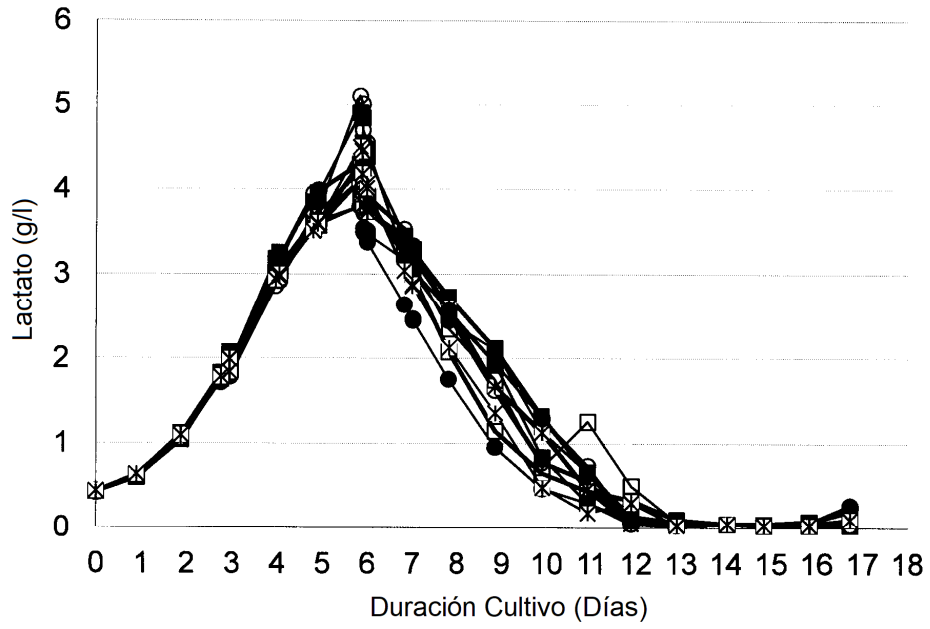


Figura 6D

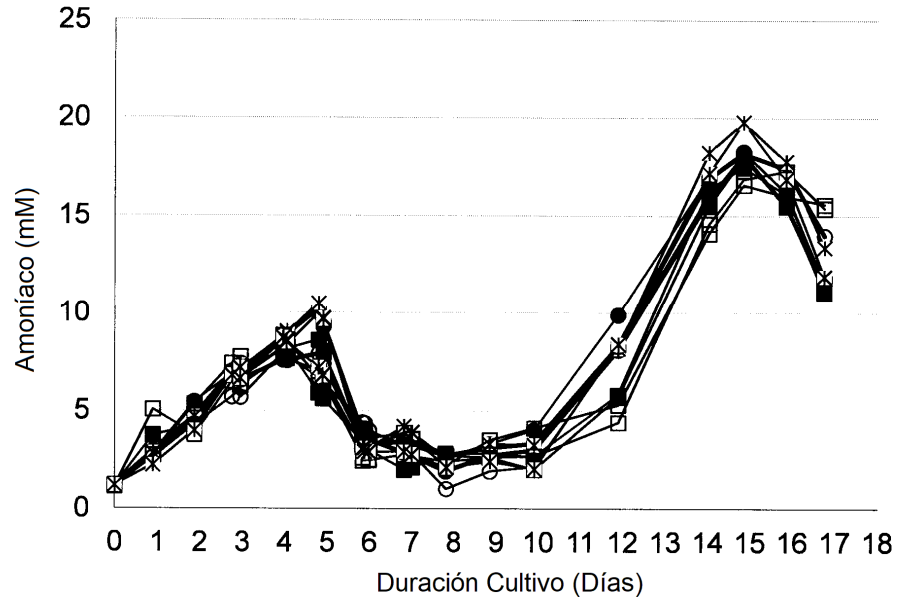


Figura 6E

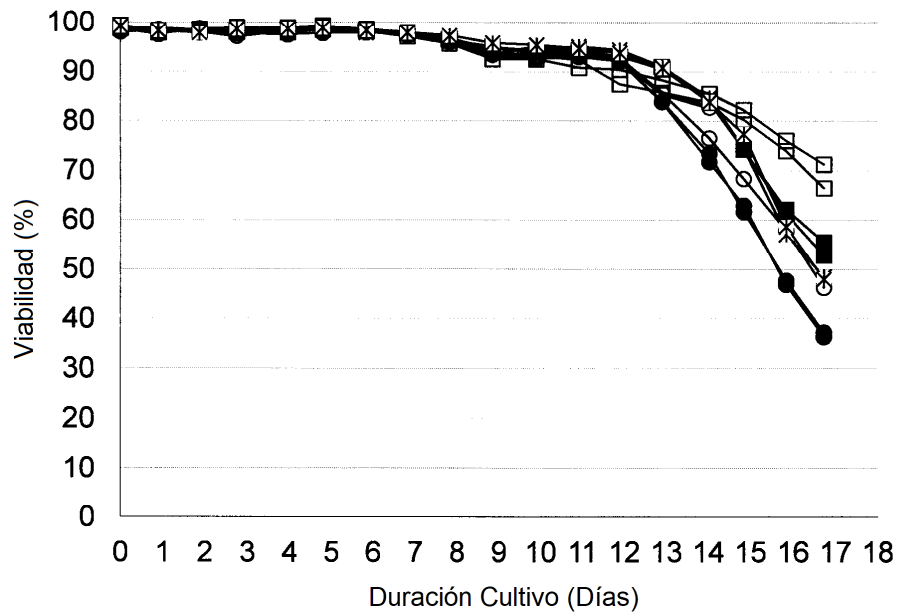


Figura 6F

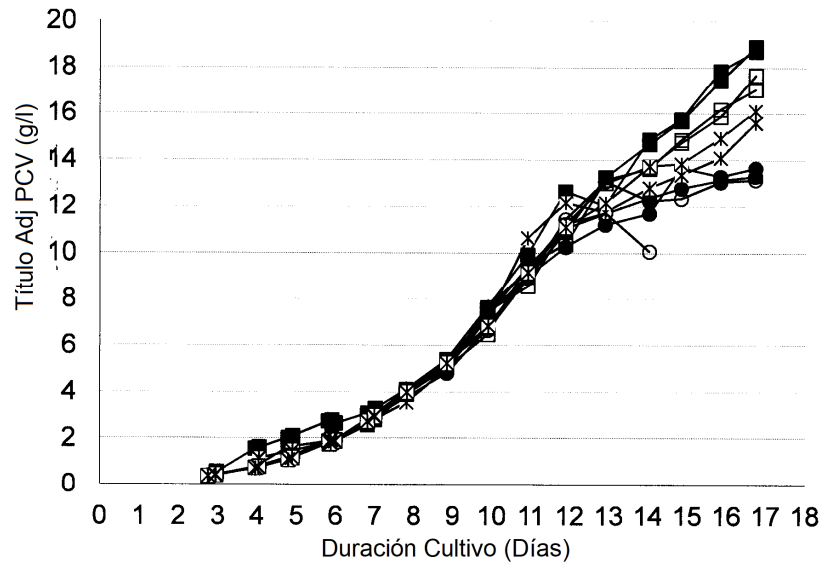
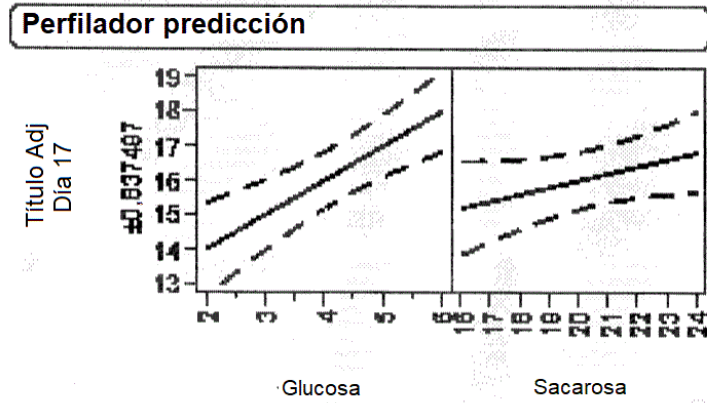


Figura 6G



**Estimados parámetro**

Término	Estimado	Error Estd	Relación t	Prob> t
Intercepto	16,042765	0,342267	46,87	<0001*
Glucosa (2,6)	2,0017892	0,388992	5,15	0,0021*
Sacarosa (16,24)	0,8105292	0,388992	2,08	0,0823

Figura 7A



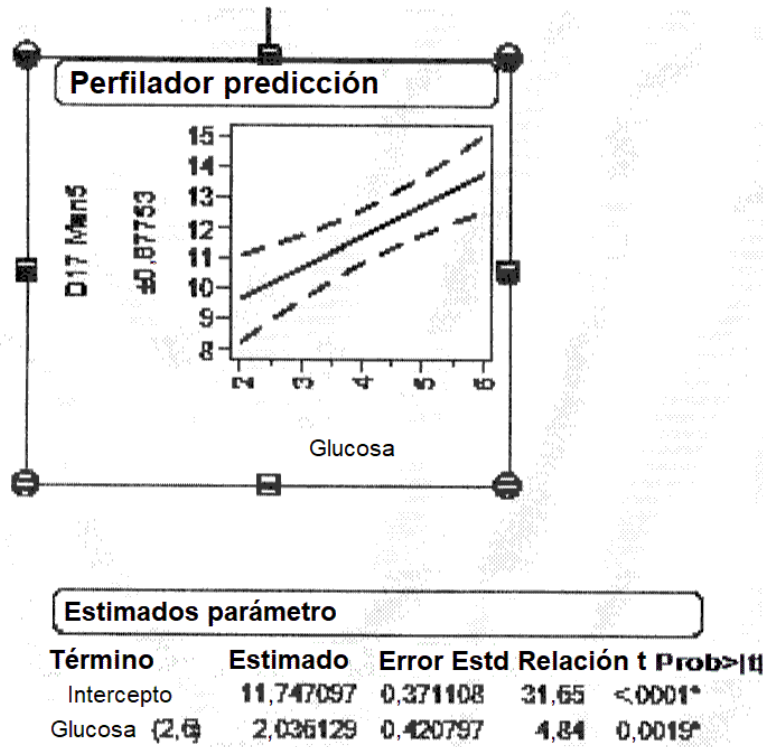


Figura 7B

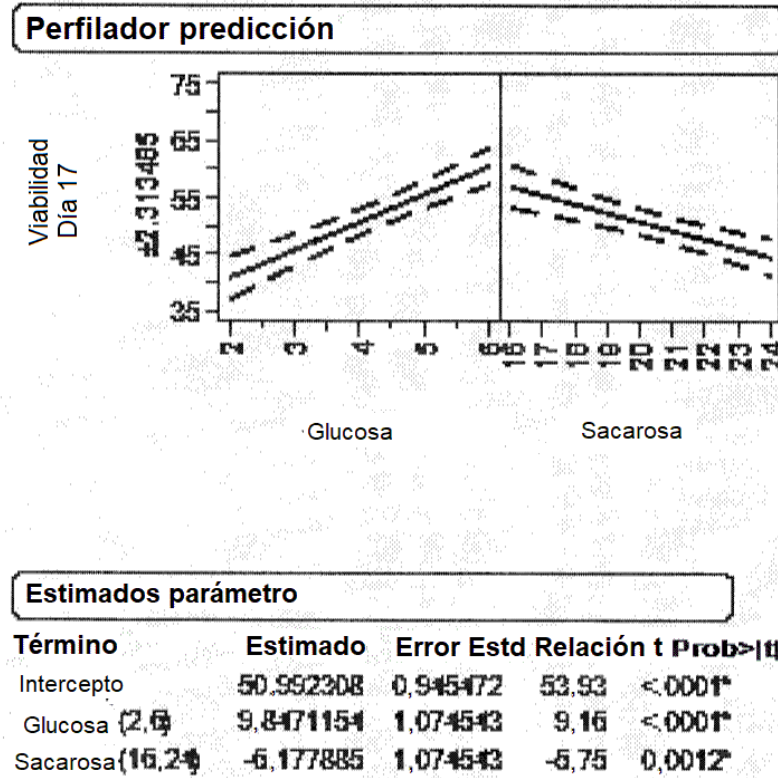


Figura 7C