

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 425**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2016 PCT/EP2016/066108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17012883**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2016 E 16736163 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3325609**

54 Título: **Métodos para modular perfiles de producción de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

**17.07.2015 EP 15177217**

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

**22.04.2020**

73 Titular/es:

**ARES TRADING S.A (100.0%)  
Zone Industrielle de l'Ouriettaz  
1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

**MUHR, ANAÏS;  
BRUHMANN, DAVID;  
JORDAN, MARTIN;  
BROLY, HERVÉ y  
STETTLER, MATTHIEU**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 755 425 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 modular perfiles de producción de proteínas recombinantes

### Campo de la invención.

5 La invención pertenece al campo del cultivo de células. En particular, la invención se refiere a métodos para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante en un medio de cultivo de células que comprende una cantidad eficaz de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbena-2,2'-disulfónico (DIDS) o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS, por lo que la producción de dicha proteína aumenta en relación con las células cultivadas sin DIDS.

### Antecedentes de la invención.

10 La optimización de las condiciones de cultivo para obtener la mayor productividad posible es uno de los principales objetivos de la producción de proteínas recombinantes. Incluso ligeros aumentos de la productividad pueden ser importantes desde un punto de vista económico. Muchas proteínas de interés comercial se producen en células hospedadoras de forma recombinante. Esto conduce a la necesidad de producir estas proteínas de manera eficiente y rentable. Desgraciadamente, uno de los inconvenientes de la producción de proteínas recombinantes es que las condiciones en las que se realiza el cultivo celular generalmente favorecen una reducción de la viabilidad celular con el tiempo, reduciendo tanto la eficiencia como la productividad general.

15 El cultivo de perfusión, el cultivo discontinuo y el cultivo de alimentación discontinua (*Fed batch culture*) son los métodos básicos para cultivar células animales para producir proteínas recombinantes.

20 Muy a menudo, especialmente en los métodos de alimentación discontinua y de perfusión, se agregan agentes inductores a los medios de cultivo para aumentar la producción de proteínas en las células. Estos inductores inducen a la célula a producir más producto deseado. Uno de tales agentes es el butirato sódico. Sin embargo, el inconveniente de usar butirato sódico en el cultivo celular estriba en que afecta significativamente a la viabilidad celular. Por ejemplo, Kim et al. (2004) han demostrado que, aunque el butirato sódico pudo aumentar la producción de proteínas en células CHO recombinantes en un cultivo discontinuo, la viabilidad celular al final del ciclo de producción (después de 8 días de cultivo) era inferior al 45%. Repitiendo los mismos experimentos en el cultivo por lotes de perfusión, los autores observaron que, dentro de los 6 días posteriores al tratamiento, la viabilidad celular era tan baja como el 15%.

25 Aunque el uso de un inductor puede incrementar la producción de proteínas, hay que tener en cuenta el inconveniente relacionado con la viabilidad celular. De hecho, el uso de un inductor bien conocido, como el butirato sódico, puede ser contraproducente después de aproximadamente 5 días en cultivo, mientras que un período de producción típico es de 12 a 15 días en modo de alimentación por lotes y puede ser de hasta 40-45 días en modo perfusión.

30 Dado que muchas proteínas son producidas de manera recombinante por células desarrolladas en cultivo durante más de 6 días, existe la necesidad de métodos que permitan una mayor productividad celular y ciclos de producción más eficientes, al tiempo que se mantiene una viabilidad celular aceptable durante un tiempo más largo.

35 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de condiciones de cultivo y métodos de producción que permitan aumentar la productividad de la proteína recombinante al mantener una alta densidad celular, aumentar el título y/o evitar una disminución sustancial de la viabilidad celular durante un período de producción. La presente invención aborda esta necesidad proporcionando métodos y composiciones para aumentar la producción de proteínas recombinantes.

### Sumario de la invención.

40 En un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que expresa dicha proteína en medio de cultivo celular, que comprende una cantidad efectiva de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbena-2,2'-disulfónico (DIDS) o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedadora que expresa dicha proteína en medio de cultivo celular complementado con al menos una alimentación que comprende una cantidad efectiva de DIDS.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de dicha célula hospedadora en medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de DIDS o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de DIDS o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS.

50 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbena-2,2'-disulfónico (DIDS) en un medio de cultivo celular para aumentar la producción de proteínas recombinantes.

**Breve descripción de las figuras.**

La Figura 1 muestra la densidad de células viables (Guava®, Figura 1A) y la viabilidad (Guava®, Figura 1B) relacionadas con el tiempo (hasta el día 14), así como el título en el día 14 (Octet®, Figura 1C) para las células hospedadoras que expresan anticuerpos mAb1 cultivados con diferentes concentraciones de DIDS en microplacas. Los resultados se muestran como valor promedio  $\pm$  desviación estándar. La misma leyenda para las Figuras 1A y 1B.

La Figura 2 muestra el análisis cualitativo del anticuerpo segregado mAb1 a diferentes concentraciones de DIDS en microplaca. Los perfiles de glucosilación se analizan mediante el ensayo CGE-LIF.

La Figura 3 muestra la densidad celular viable (ViCell®, figuras 3A y 3E), la viabilidad (ViCell®, figuras 3B y 3F), el título (Biacore®, figuras 3C y 3G) y la productividad específica (figuras 3D y 3H) en relación con el tiempo (hasta el día 14) para las células hospedadoras que expresan el anticuerpo mAb1 (izquierda) y el anticuerpo mAb2 (derecha), cultivadas con diferentes concentraciones de DIDS en tubos Spin (valor promedio  $\pm$  desviación estándar). Una leyenda para las figuras 3A a 3D y otra para las figuras 3E a 3H.

La Figura 4 muestra el perfil de glucosilación (CGE-LIF, figura 4A), así como las relaciones de agregados y fragmentos (SE-HPLC y SDS-electroforesis en gel capilar, figura 4B) para el anticuerpo mAb2 cuando las células hospedadoras se cultivan a diferentes concentraciones de DIDS en tubos Spin. Los resultados se presentan como valor promedio  $\pm$  desviación estándar.

En las Figuras 1-4:  $\mu$ M y  $\mu$ M significan ambos micromolar.

**Descripción detallada de la invención.**

En caso de conflicto predominará la presente memoria, incluyendo las definiciones. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece el tema en cuestión. Como se usa en el presente documento, se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la presente invención.

Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, el término "y/o" usado en una frase tal como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" y "B".

Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, la expresión "cultivo celular" o "cultivo" significa el crecimiento y la propagación de células *in vitro*, es decir, fuera de un organismo o tejido. Las condiciones de cultivo adecuadas para células de mamífero se conocen en la técnica, tal como se enseña en Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies (2005). Las células de mamífero pueden cultivarse en suspensión o mientras están unidas a un sustrato sólido.

Las expresiones "medio de cultivo celular", "medio de cultivo", "medio" y cualquier plural de las mismas, se refieren a cualquier medio en el que se puedan cultivar células de cualquier tipo. Un "medio basal" se refiere a un medio de cultivo celular que contiene todos los ingredientes esenciales útiles para el metabolismo celular. Esto incluye, por ejemplo, aminoácidos, lípidos, fuente de carbono, vitaminas y sales minerales. El DMEM (medio de Eagles modificado por Dulbecco), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) o medio F12 (medio F12 de Ham) son ejemplos de medios basales disponibles comercialmente. Alternativamente, dicho medio basal puede ser un medio patentado completamente desarrollado internamente, también denominado "medio químicamente definido" o "medio de cultivo químicamente definido", en el que todos los componentes pueden describirse en términos de fórmulas químicas y están presentes en concentraciones conocidas. El medio de cultivo puede estar libre de proteínas y/o suero, y puede ser suplementado por cualquier compuesto o compuestos adicionales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, dependiendo de las necesidades de las células en cultivo.

La expresión "medio de alimentación" (y el plural de la misma) se refiere a un medio utilizado como suplemento durante el cultivo para reponer los nutrientes que se consumen. El medio de alimentación puede ser un medio de alimentación disponible comercialmente o un medio de alimentación patentado (en este documento, alternativamente, un medio de alimentación químicamente definido).

El término "biorreactor" o "sistema de cultivo" se refiere a cualquier sistema en el que las células se pueden cultivar, preferiblemente en modo discontinuo o alimentado por lotes. Este término incluye, entre otros, matraces, matraces estáticos, matraces giratorios, tubos, tubos de agitación, botellas de agitación, bolsas de ondas, biorreactores, biorreactores de fibra, biorreactores de lecho fluidizado y biorreactores de tanque agitado con o sin microportadores. Alternativamente, la expresión "sistema de cultivo" incluye también placas de microtítulo, capilares o placas de pocillos múltiples. Se puede usar cualquier tamaño de biorreactor, por ejemplo, de 0,1 mililitros (0,1 mL, escala muy pequeña) a 20000 litros (20000 L o 20 KL, escala grande), como 0,1 mL, 0,5 mL, 1 mL, 5 mL, 0,01 L, 0,1 L, 1 L, 2 L, 5 L, 10 L, 50 L, 100 L, 500 L, 1000 L (o 1 KL), 2000 L (o 2 KL), 5000 L (o 5 KL), 10000 L (o 10 KL), 15000 L (o 15 KL) o 20000 L (20 KL).

La expresión "cultivo alimentado por lotes" se refiere a un método de cultivo de células en el que hay un bolo o un suplemento de medios de alimentación continua para reponer los nutrientes que se consumen. Esta técnica de cultivo

celular tiene el potencial de obtener altas densidades celulares del orden de más de  $10 \times 10^6$  a  $30 \times 10^6$  células/mL, dependiendo de la formulación del medio, la línea celular y otras condiciones de crecimiento celular. Una condición de cultivo bifásico puede ser creada y sostenida por diversas estrategias de alimentación y formulaciones de medios.

5 Alternativamente, puede usarse un cultivo de perfusión. El cultivo de perfusión es uno en el que el cultivo celular recibe medio de alimentación de perfusión fresco mientras se elimina al mismo tiempo el medio gastado. La perfusión puede ser continua, escalonada, intermitente o una combinación de cualquiera de estos. Las velocidades de perfusión pueden ser inferiores a un volumen de trabajo o a muchos volúmenes de trabajo por día. Preferiblemente, las células se retienen en el cultivo y el medio gastado que se elimina está sustancialmente libre de células o tiene significativamente menos células que el cultivo. La perfusión se puede lograr mediante una serie de técnicas de retención celular que incluyen centrifugación, sedimentación o filtración (véase, por ejemplo, Voisard et al., 2003).  
10 Cuando se usan los métodos y/o técnicas de cultivo celular de la presente invención, las proteínas recombinantes generalmente se segregan directamente en el medio de cultivo. Una vez que dicha proteína se segrega en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se pueden concentrar primero usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente.

15 Como se usa en el presente documento, "densidad celular" se refiere al número de células en un volumen dado de medio de cultivo. La "densidad celular viable" se refiere al número de células vivas en un volumen dado de medio de cultivo, según se determina mediante ensayos estándar de viabilidad. Las expresiones "densidad celular más alta" o "densidad celular viable más alta", y equivalentes de las mismas, significa que la densidad celular o la densidad celular viable aumentan en al menos un 15% en comparación con la condición de cultivo de control. La densidad celular se considerará mantenida si está en el margen de -15% a 15% en comparación con la condición de cultivo de control. Las expresiones "densidad celular más baja" o "densidad celular viable más baja", y equivalentes de las mismas, significan que la densidad celular o la densidad celular viable disminuye en al menos un 15% en comparación con la condición de cultivo de control.  
20

25 El término "viabilidad" o "viabilidad celular" se refiere a la relación entre el número total de células viables y el número total de células en cultivo. La viabilidad suele ser aceptable siempre que sea no inferior al 60% en comparación con el inicio del cultivo (sin embargo, el umbral aceptable puede determinarse caso por caso). La viabilidad se usa con frecuencia para determinar el tiempo para la recolección. Por ejemplo, en el cultivo alimentado por lotes, la recolección se puede realizar una vez que la viabilidad alcanza el 60% o después de 14 días en cultivo.

30 El término "título" se refiere a la cantidad o concentración de una sustancia, aquí la proteína de interés, en solución. Es una indicación del número de veces que se puede diluir la solución y aún contiene cantidades detectables de la molécula de interés. Se calcula de forma rutinaria, por ejemplo, diluyendo en serie (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.) la muestra que contiene la proteína de interés y luego utilizando el método de detección apropiado (colorimétrico, cromatográfico, etc.), cada dilución se analiza para detectar la presencia de niveles detectables de la proteína de interés. El título también se puede medir por medios como forteBIO Octet® o con Biacore C®, como se usa en la sección de ejemplos.

35 La expresión "productividad específica" se refiere a la cantidad de una sustancia, aquí la proteína de interés, producida por célula por día.

40 Las expresiones "título más alto" o "productividad más alta", y equivalentes de los mismos, significan que el título o la productividad se incrementan en al menos un 10% en comparación con la condición de cultivo de control. El título o la productividad específica se considerarán mantenidos si están en el margen de -10% a 10% en comparación con la condición de cultivo de control. Las expresiones "título más bajo" o "productividad más baja", y los equivalentes de las mismas, significa que el título o la productividad se reducen en al menos un 10% en comparación con la condición de cultivo de control.

45 El término "proteína" como se usa en el presente documento incluye péptidos y polipéptidos y se refiere al compuesto que comprende dos o más restos de aminoácidos. Una proteína según la presente invención incluye, pero no se limita a ella, una citocina, un factor de crecimiento, una hormona, una proteína de fusión, un anticuerpo o un fragmento de la misma. Una proteína terapéutica se refiere a una proteína que se puede usar o que se usa en terapia.

El término "proteína recombinante" significa una proteína producida por técnicas recombinantes. Las técnicas recombinantes forman parte del conocimiento de los expertos (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, y actualizaciones).

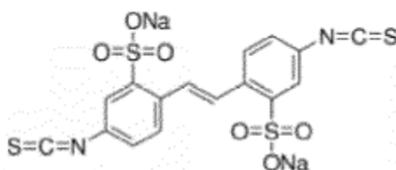
50 Como se usa en la especificación y las reivindicaciones, el término "anticuerpo" y su forma plural "anticuerpos", incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, tales como F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos proteolíticos Fab y fragmentos de región variable de cadena sencilla (scFvs). También se incluyen los anticuerpos o fragmentos intactos diseñados genéticamente, como los anticuerpos quiméricos, los fragmentos scFv y Fab, así como los péptidos y polipéptidos sintéticos de unión al antígeno.  
55

El término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (usualmente un ratón o una rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDRs se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco

- se denomina "aceptor" (humanización injertando CDRs no humanas en el marco humano y regiones constantes, o mediante la incorporación de dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas (quimerización). Las regiones constantes no necesitan estar presentes pero, si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más, idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDRs y algunos restos en la región constante de la cadena pesada si se necesita la modulación de las funciones efectoras, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Mediante humanización de anticuerpos, la vida mitad biológica puede aumentar, y se reduce el potencial de reacciones inmunes adversas tras la administración a seres humanos.
- 5
- 10 Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, la expresión inmunoglobulina "completamente humana" se refiere a una inmunoglobulina que comprende tanto una región marco humana como CDRs humanas. Las regiones constantes no necesitan estar presentes pero, si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente aproximadamente el 95%, o más, idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina completamente humana, excepto posiblemente algunos residuos en la región constante de la cadena pesada si se necesita la modulación de las funciones efectoras o propiedades farmacocinéticas, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. En algunos casos, pueden introducirse mutaciones de aminoácidos dentro de las CDRs, las regiones marco o la región constante, para mejorar la afinidad de unión y/o reducir la inmunogenicidad y/o mejorar las propiedades bioquímicas / biofísicas del anticuerpo.
- 15
- 20 La expresión "anticuerpos recombinantes" significa anticuerpos producidos mediante técnicas recombinantes. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden ser rediseñados para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y van desde el cambio de solamente un aminoácido, o unos pocos aminoácidos, hasta el rediseño completo de, por ejemplo, el dominio variable o la región constante. En general, se realizarán cambios en la región constante para mejorar, reducir o alterar características, como la fijación del complemento (por ejemplo, citotoxicidad dependiente del complemento, CDC), la interacción con los receptores Fc y otras funciones efectoras (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC), propiedades farmacocinéticas (p. ej. unión al receptor Fc neonatal; FcRn). Se realizarán cambios en el dominio variable para mejorar las características de unión al antígeno. Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en otras diversas formas que incluyen, por ejemplo, cadena simple o Fv, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multiespecíficos.
- 25
- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de anticuerpo" se refiere a un fragmento de una cadena o anticuerpo intacto o de longitud completa, normalmente la región de unión o variable. Dichas porciones o fragmentos deben mantener al menos una actividad de la cadena/anticuerpo intacta, es decir, hay "porciones funcionales" o "fragmentos funcionales". Si mantienen al menos una actividad, preferiblemente mantienen la propiedad de unión con la diana. Los ejemplos de porciones de anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) incluyen, pero no se limitan a ellos, "Fv de cadena sencilla", "anticuerpos de cadena sencilla", "Fv" o "scFv". Estos términos se refieren a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios variables de ambas cadenas, pesada y ligera, pero carecen de las regiones constantes, todo dentro de una sola cadena de polipéptidos. Generalmente, un anticuerpo de cadena sencilla comprende además un conector de polipéptido entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. En realizaciones específicas, los anticuerpos de cadena sencilla pueden también ser biespecíficos y/o humanizados.
- 35
- 40 Un "fragmento Fab" se compone de una cadena ligera y los dominios variable y CH1 de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab'" que contiene una cadena ligera y una cadena pesada y contiene más de la región constante, entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas, se denomina molécula F(ab')<sub>2</sub>. Un "F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.
- 45
- 50 Habiendo definido algunos términos importantes, es ahora posible centrar la atención en realizaciones particulares de la presente invención.
- Los ejemplos de anticuerpos conocidos que se pueden producir de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a ellos, adalimumab, alemtuzumab, belimumab, bevacizumab, canakinumab, certolizumab, pegol, cetuximab, denosumab, eculizumab, golimumab, infliximab, natalizumab, ofatumumab, ofatumumab, ofatumumab, ofatumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, siltuximab, tocilizumab, trastuzumab, ustekinumab o vedolizomab.
- 55
- Las expresiones "agente inductor", "inductor" o "potenciador de la productividad" se refieren a un compuesto que permite un aumento de la producción de proteínas cuando se agrega en cultivos celulares. Por ejemplo, uno de los inductores conocidos para la producción de *E. coli* es IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) y los inductores para la producción de CHO son, entre otros, butirato sódico, doxiciclina o dexametasona.

Se entiende que el término "sujeto" incluye (pero sin limitarse a ellos) mamíferos tales como seres humanos, perros, vacas, caballos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos o ratas. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano. La presente invención proporciona métodos y composiciones para aumentar la producción de una proteína recombinante mientras se mantiene una alta densidad celular y se evita una disminución sustancial de la viabilidad celular a lo largo de un período de producción. La presente invención se basa en la optimización de las condiciones de cultivo celular para la fabricación de proteínas, como la producción de anticuerpos o fragmentos de unión a un antígeno, lo que tiene como resultado una mayor producción de una proteína recombinante mientras se mantiene una alta densidad celular y se evita una disminución sustancial de la viabilidad celular durante un período de producción.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que, en condiciones de cultivo celular que contienen o suplementan con ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS), la producción de una proteína recombinante puede incrementarse (es decir, el título y/o la productividad específica aumentan), la densidad celular también aumenta o al menos se mantiene, y se evita una disminución sustancial o significativa de la viabilidad celular durante un período de producción. Por lo tanto, durante el ciclo de producción del cultivo celular, cuando es deseable aumentar el título de la proteína recombinante que se produce, el cultivo celular puede complementarse con DIDS. Alternativamente el medio de cultivo celular ya puede comprender DIDS, ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS).



En un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que expresa dicha proteína en medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de DIDS o suplementada con una cantidad efectiva de DIDS. En algunas realizaciones preferidas, las células hospedadoras son células de ovario de hámster chino (CHO).

Alternativamente, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que expresa dicha proteína en medio de cultivo celular complementado con al menos una alimentación que comprende una cantidad efectiva de DIDS. En algunas realizaciones preferidas, las células hospedadoras son células de ovario de hámster chino (CHO).

En otro aspecto, la invención proporciona un método para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar dicha célula hospedadora en medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de DIDS o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS. En algunas realizaciones preferidas, las células hospedadoras son células de ovario de hámster chino (CHO).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de DIDS o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de DIDS en un medio de cultivo celular para aumentar la producción de proteínas recombinantes.

En el contexto de la invención en su conjunto, una cantidad efectiva de DIDS es la cantidad de DIDS presente en un medio de cultivo celular al comienzo del cultivo o que se agrega a un cultivo celular (o un medio de cultivo celular), como suplemento o como alimentación, que aumentará la expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras, y posiblemente también aumentará la densidad celular, en una cantidad detectable en comparación con las células cultivadas sin DIDS. El DIDS está presente preferiblemente en un medio de cultivo celular al comienzo del cultivo o agregado a un cultivo celular (o un medio de cultivo celular), como suplemento o como alimento, a una concentración de aproximadamente 0,01  $\mu\text{M}$  a 150  $\mu\text{M}$ , preferiblemente de 0,1  $\mu\text{M}$  a 120  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente de 1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, la concentración de DIDS puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,4  $\mu\text{M}$ , 0,9  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 4,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 9,0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 85  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$ , 95  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  (concentración de DIDS una vez en el medio de cultivo en el sistema de cultivo). Por ejemplo, pero no a título de limitación, al ajustar la concentración de DIDS puede modularse la producción de proteína recombinante segregada (es decir, aumentada).

En el contexto de la invención en su conjunto, cuando DIDS está presente en un medio de cultivo celular al comienzo del cultivo o se agrega a un cultivo celular (o medio de cultivo celular), como suplemento o como alimentación, la viabilidad celular no disminuye sustancial o significativamente y la producción de la proteína recombinante aumenta en relación con las células cultivadas sin DIDS.

Como se usa en el presente documento, la frase "la viabilidad celular no se reduce sustancial ni significativamente", en comparación con las células cultivadas sin un DIDS o cualquier otro inductor, significa que la viabilidad celular no disminuye más de aproximadamente el 15% en comparación con los cultivos de control (es decir, células cultivadas

sin un DIDS o cualquier otro inductor).

Para los fines de esta invención, el medio de cultivo celular es un medio adecuado para el crecimiento de células animales, tales como células de mamífero, en cultivo celular *in vitro*. Las formulaciones de medios de cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Los medios de cultivo celular pueden complementarse con componentes adicionales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento, según las necesidades de las células en cultivo. Preferiblemente, los medios de cultivo celular están libres de componentes animales; pueden estar libres de suero y/o proteínas.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el medio de cultivo celular se suplementa con DIDS, por ejemplo, al comienzo del cultivo, y/o en un lote alimentado o de manera continua. La adición del suplemento DIDS puede basarse en el título intermedio medido.

En una realización de la presente invención, la célula hospedadora es preferiblemente una célula hospedadora de mamífero (en el presente documento también se denomina célula de mamífero) que incluye, pero sin limitarse a ellas, HeLa, Cos, 3T3, líneas celulares de mieloma (por ejemplo NS0, SP2/0), y células de ovario de hámster chino (CHO). En una realización preferida, las células hospedadoras son células de ovario de hámster chino (CHO).

En el contexto de la invención en su conjunto, la célula recombinante, preferiblemente una célula de mamífero, se desarrolla en un sistema de cultivo tal como un biorreactor. El biorreactor se inocula con células viables en un medio de cultivo. Dicho medio de cultivo ya puede comprender DIDS, o puede complementarse con DIDS al comienzo del cultivo y/o en cualquier momento después del inicio del cultivo. Preferiblemente, el medio de cultivo está libre de suero y/o libre de proteínas. Una vez inoculadas en el biorreactor de producción, las células recombinantes experimentan una fase de crecimiento exponencial. La fase de desarrollo se puede mantener utilizando un proceso de alimentación por lotes con alimentación en bolo de un medio de alimentación opcionalmente suplementado con DIDS. Preferiblemente, el medio de alimentación es un medio libre de suero y de proteínas. Las alimentaciones en bolo suplementarias generalmente comienzan poco después de inocular las células en el biorreactor, en un momento en que se anticipa o se determina que el cultivo celular necesita alimentación. Por ejemplo, los alimentos suplementarios pueden comenzar el día 3 o 4 del cultivo, o aproximadamente uno o dos días antes o después. El cultivo puede recibir uno, dos, tres o más alimentos en bolo durante la fase de crecimiento. Cualquiera de estos alimentos en bolo puede complementarse opcionalmente con DIDS. La suplementación con DIDS puede realizarse al inicio del cultivo, en lotes alimentados y/o de manera continua. El medio de cultivo puede comprender un azúcar, tal como glucosa, o ser suplementado con un azúcar, tal como glucosa. Dicha suplementación se puede realizar al comienzo del cultivo, en lotes alimentados y/o de manera continua.

Los métodos, composiciones y usos según la presente invención pueden usarse para mejorar la producción de proteínas recombinantes en procesos de cultivo de etapas múltiples. En un proceso de etapas múltiples, las células se cultivan en dos o más fases distintas. Por ejemplo, las células se cultivan primero en una o más fases de crecimiento, en condiciones que mejoran la proliferación y la viabilidad celular, luego se transfieren a la fase o fases de producción, en condiciones que mejoran la producción de proteínas. En un proceso de cultivo de varios pasos, algunas condiciones pueden cambiar de un paso (o una fase) a otro: composición del medio, cambio de pH, cambio de temperatura, etc. La fase de crecimiento se puede realizar a una temperatura más alta que en la fase de producción. Por ejemplo, la fase de crecimiento se puede realizar a una primera temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 38 °C, y luego la temperatura se cambia para la fase de producción a una segunda temperatura de aproximadamente 29 °C a aproximadamente 37 °C. Los cultivos celulares se pueden mantener en la fase de producción durante días o incluso semanas antes de la recolección.

Las líneas celulares (también denominadas "células recombinantes" o "células hospedadoras") utilizadas en la invención están diseñadas genéticamente para expresar una proteína de interés comercial o científico. Los métodos y vectores para la ingeniería genética de células y/o líneas celulares para expresar un polipéptido de interés son bien conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, varias técnicas se ilustran en Ausubel et al. (1988 y actualizaciones) o Sambrook et al. (1989 y actualizaciones). Los métodos de la invención pueden usarse para cultivar células que expresan proteínas recombinantes de interés. Las proteínas recombinantes generalmente se segregan en el medio de cultivo del que se pueden recuperar. Las proteínas recuperadas se pueden entonces purificar, o purificarse parcialmente, utilizando procesos conocidos y productos disponibles de proveedores comerciales. Las proteínas purificadas se pueden formular entonces como composiciones farmacéuticas. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995.

En el contexto de la invención en su conjunto, la proteína recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tal como un anticuerpo humano o una porción de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado o una porción de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo quimérico o una porción de unión a antígeno del mismo, una proteína de fusión recombinante, un factor de crecimiento, una hormona o una citocina.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente, estando indicado el alcance de la invención por las reivindicaciones anexas.

La descripción anterior se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Tales ejemplos, sin embargo, son ejemplos de métodos para llevar a la práctica la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

**Ejemplos.**

Materiales y métodos.

5 I. Células, expansión celular y crecimiento celular.

1) Células.

Los ensayos se realizaron con 2 líneas de células CHO:

- 10 - Células CHO-S que expresan mAb1 IgG1, en este documento "Células mAb1" o "células mAb1". "mAb1" es un anticuerpo monoclonal completamente humano dirigido contra una proteína soluble. Su punto isoeléctrico (pI) es aproximadamente 8,20-8,30.
- Células CHO-K1 que expresan mAb2 IgG1, en este documento "Células mAb2" o "células mAb2". "mAb2" es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra un receptor que se encuentra en la membrana celular. Su punto isoeléctrico (pI) es aproximadamente 9,30.

2) Expansión celular.

15 La expansión celular se realizó en tubos en un medio adecuado para la expansión celular. Los ensayos en lotes alimentados comenzaron después de al menos una semana de expansión.

3) Inoculación.

Las células que expresan mAb2 se inocularon a  $0,2 \times 10^6$  células por mililitro (mL), mientras que las células que expresan mAb1 se inocularon a  $0,3 \times 10^6$  células por mL.

20 4) Cultivo alimentado por lotes (Fed-batch).

Todos los ensayos se realizaron en cultivo alimentado por lotes. Las células hospedadoras se cultivaron en un sistema alimentado por lotes, bien sea en microplacas ("placa de pocillos profundos") o en Spin tubes®, y se incubaron a 36,5 °C, 90% de humedad relativa, 5% de CO<sub>2</sub> y agitación a 320 rpm durante 14 días.

II. Métodos analíticos.

25 La densidad y la viabilidad celulares viables se midieron con el citómetro de flujo easyCyte® de Guava o con el ViCell.

Los títulos de anticuerpos se midieron con forteBIO Octet® o con Biacore C®.

Los perfiles de glucosilación se establecieron mediante electroforesis en gel capilar con fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF). Las dosis de agregados y fragmentos se realizaron respectivamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaños (SE-HPLC) y mediante electroforesis en gel capilar SDS.

30 Resultados y discusiones.

Ejemplo 1: Cultivo celular en microplacas.

35 Las células hospedadoras que expresan el anticuerpo mAb1 se cultivaron en presencia de DIDS a concentraciones que varían entre 0,4 μM y 83 μM. La densidad y la viabilidad celulares se midieron durante el cultivo, mientras que el título se midió el día 14 (Figuras 1A-1C). La adición de DIDS en el medio de cultivo permitió el aumento de la densidad celular viable y el título. Específicamente, la concentración de 83 μM de DIDS permitió duplicar la densidad celular en el día 7 (WD7) y multiplicar el título por el factor 1,4 al final del proceso de cultivo en el día 14 (WD14). La viabilidad se mantuvo, en comparación con el control, hasta el día 12. Para las concentraciones ensayadas, el perfil de glucosilación del anticuerpo mAb1 no varió (Figura 2).

Ejemplo 2: Cultivo de células en tubos Spin.

40 La eficacia de DIDS también se probó en tubos Spin a concentraciones de aproximadamente 40 μM (41 μM) y/o aproximadamente 85 μM (82 μM para mAb1 y 87 μM para mAb2). Estas concentraciones no son tóxicas para las células hospedadoras que expresan los anticuerpos mAb1 y mAb2 y permitieron obtener un aumento importante de la densidad celular y del título del anticuerpo mAb1 (figura 3). Como se esperaba para las células que expresan el anticuerpo mAb1, la densidad celular viable y la producción específica aumentan en presencia de DIDS, lo que permitió

45 que la concentración de DIDS de 82 μM multiplique el título por el factor 1,4 en comparación con el control (figuras 3A-3D). El impacto del perfil de glucosilación del anticuerpo mAb1 fue insignificante: a las concentraciones probadas, el perfil de glucosilación del anticuerpo mAb1 no varió (datos no mostrados). Se observan resultados similares para mAb2: DIDS permitió el aumento de la productividad específica de las células hospedadoras que expresan los

anticuerpos mAb2 (aumento de aproximadamente el 20% el día 10), y puede mantener la viabilidad de las células durante aproximadamente 10 días (figuras 3E-H). El perfil de glicosilación del anticuerpo mAb2 no varió (figura 4A). Curiosamente, el porcentaje de fragmentos y agregados disminuyó ligeramente (figura 4B).

Conclusión general:

5 Por consiguiente, el DIDS es un compuesto muy prometedor para aumentar la cantidad de proteína recombinante producida, sin modificar el perfil de glucosilación de la proteína o tener un impacto negativo en la viabilidad celular. Por tanto, el DIDS podría usarse como inductor, sin el inconveniente de la viabilidad celular observado con butirato sódico en la bibliografía.

10 Una persona experta comprenderá a partir de los resultados de los ejemplos 1 y 2 que puede usar DIDS para modular el perfil de producción de cualquier anticuerpo y cualquier proteína, sea cual sea la línea celular que se use para la producción. La concentración óptima de DIDS a añadir en los medios de cultivo celular deberá determinarse caso por caso. Esta determinación puede hacerse sin involucrar ninguna habilidad inventiva, basada en la enseñanza de la presente invención. Los expertos en la técnica también comprenderán que pueden usar DIDS en cualquier método para producir una proteína como un anticuerpo, incluso si no tiene como objetivo alcanzar un perfil de producción particular, sino simplemente aumentar la productividad celular y obtener ciclos de producción más eficientes, al tiempo que se mantiene una viabilidad celular aceptable durante más tiempo.

15 Referencias

- 1) Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Sadettin Ozturk, Wei-Shou Hu, ed., CRC Press (2005 )
- 20 2) Kim et al., 2004, Biotechnol. Prog., 20:1788-1796
- 3) Voisard et al., 2003, Biotechnol. Bioeng. 82:751-765
- 4) Ausubel et al., 1988 and updates, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Wiley & Sons, Nueva York .
- 5) Sambrook et al., 1989 and updates, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press .

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo celular que comprende una cantidad eficaz de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de DIDS varía en el intervalo de 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M.  
5
2. Un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo celular complementado con al menos una alimentación que comprende una cantidad efectiva de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS), en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de DIDS varía en el intervalo de 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M.  
10
3. Un método para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de dicha célula hospedadora en un medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de DIDS varía en el intervalo de 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M.  
15
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células hospedadoras son células de ovario de hámster chino (CHO).
5. Una composición que comprende un medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) o suplementado con una cantidad efectiva de DIDS, en donde la cantidad efectiva de DIDS varía en el intervalo de 1  $\mu$ M a 100  $\mu$ M.  
20
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o la composición de la reivindicación 5, en donde la proteína recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un anticuerpo humano o una porción de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado o una porción de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo quimérico o una porción de unión al antígeno del mismo, una proteína de fusión recombinante, un factor de crecimiento, una hormona o una citocina.  
25
7. Uso de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) en un cultivo celular de mamífero para aumentar la producción de proteínas recombinantes.
8. Uso de ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) como inductor de la expresión de proteínas en un cultivo celular de mamífero.  
30

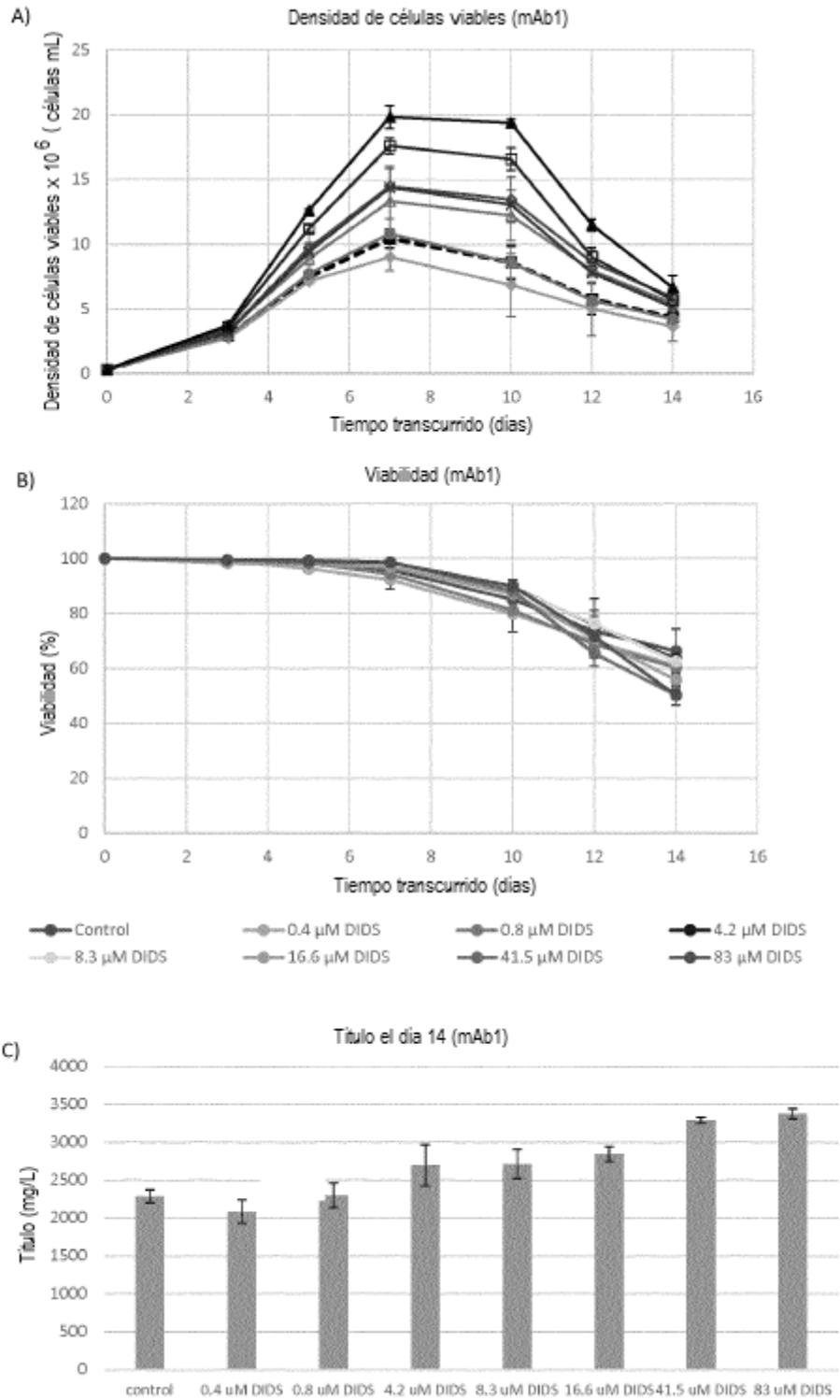


Figura 1

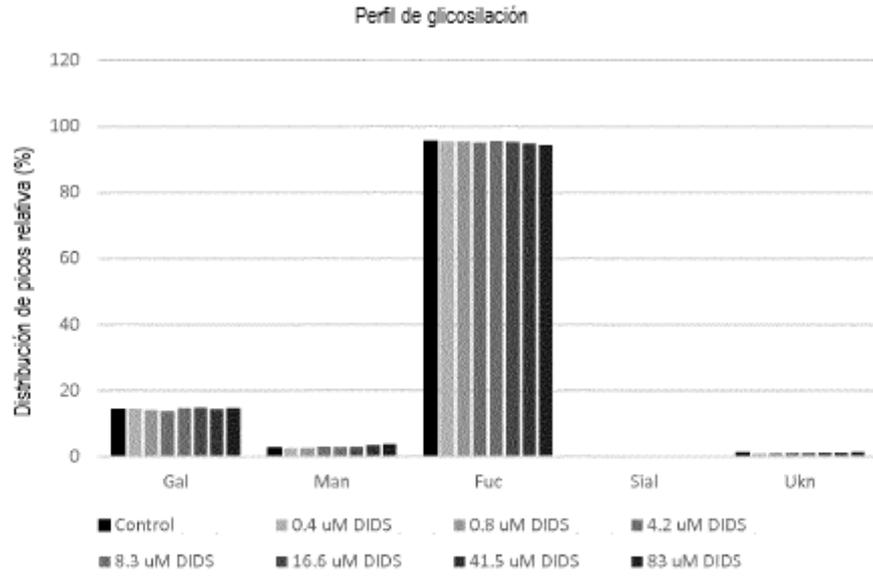


Figura 2

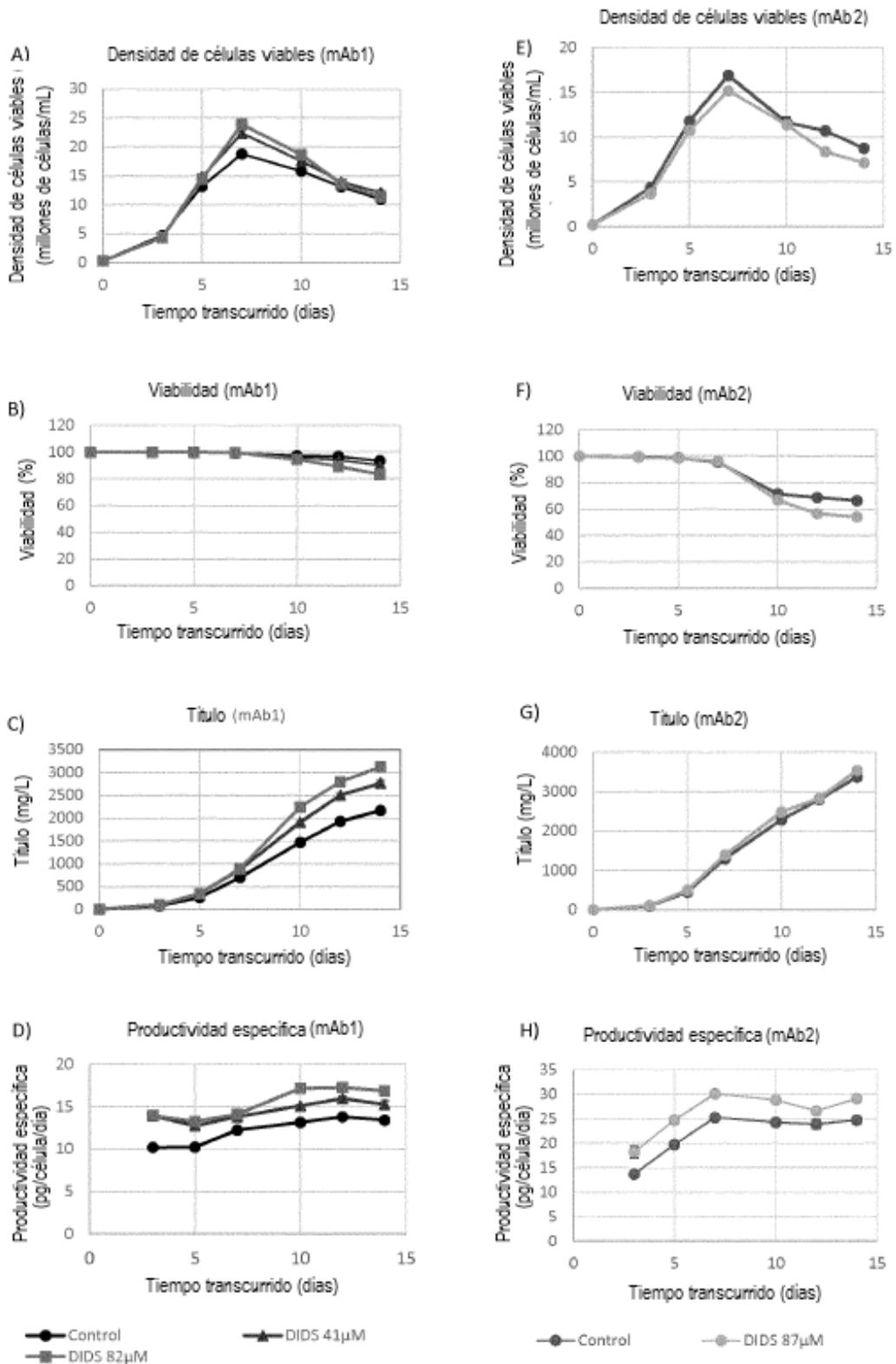


Figura 3

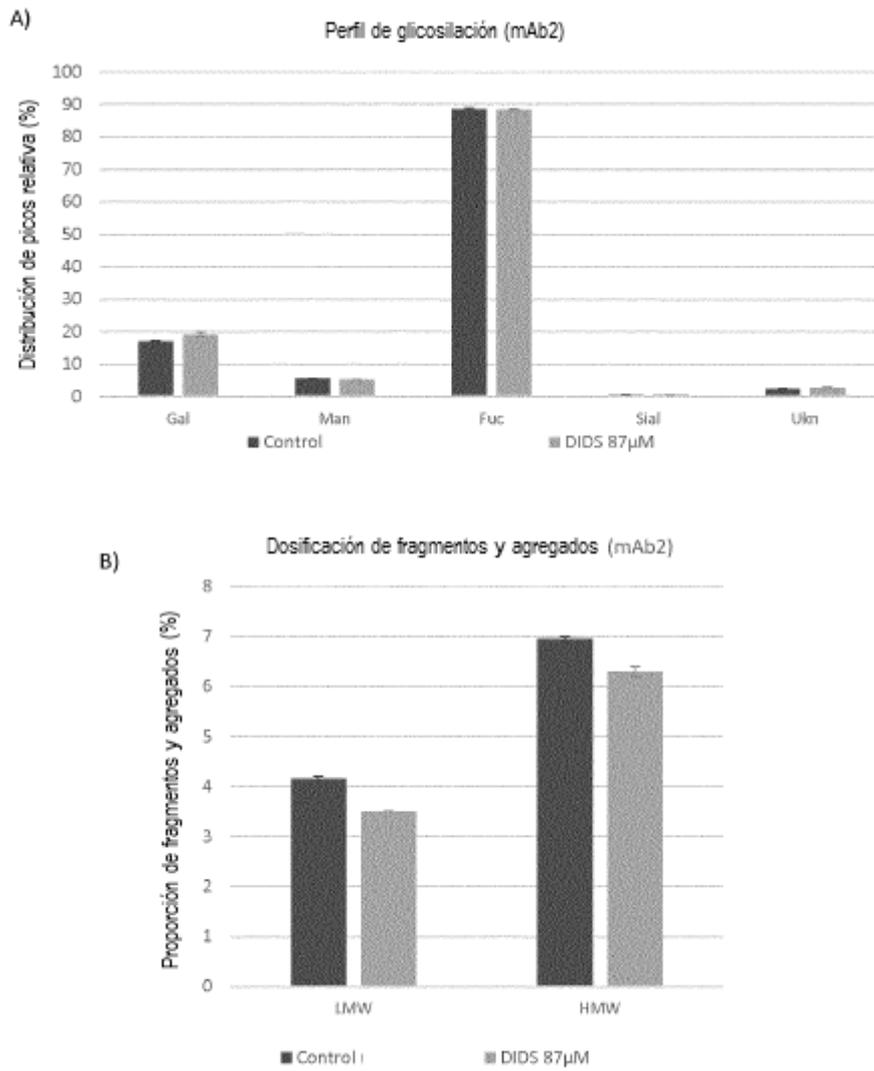


Figura 4