

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 503**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2015** **PCT/US2015/063271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016** **WO16089919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2015** **E 15816598 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020** **EP 3227454**

54 Título: **Procedimiento para manipular el nivel de contenido de glicano de una glicoproteína**

30 Prioridad:

01.12.2014 US 201462085759 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.09.2020

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

LEISKE, DANIEL R. y
TRENTALANGE, MICHAEL T.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 784 503 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para manipular el nivel de contenido de glicano de una glicoproteína

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una variedad de modificaciones post-traduccionales, que incluyen metilación, sulfatación, fosforilación, adición de lípidos y glicosilación, se realizan en proteínas expresadas por eucariotas superiores. La glicosilación implica la unión covalente de restos de azúcar a aminoácidos específicos, y es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes e importantes para las proteínas recombinantes. La glicosilación de proteínas desempeña un papel en múltiples funciones, que incluyen el plegamiento de proteínas y el control de calidad, el tráfico y la clasificación molecular, y la interacción del receptor de la superficie celular. Se sabe que muchas de las proteínas segregadas, proteínas de membrana y proteínas dirigidas a vesículas o ciertos orgánulos intracelulares están glicosiladas.

Mientras que la glicosilación puede tomar muchas formas, la glicosilación ligada a N es la más común. La glicosilación ligada a N implica la adición de oligosacáridos a un resto de asparagina que se encuentra en ciertas secuencias de reconocimiento en proteínas (por ejemplo, Asn-X-Ser/Thr). Las glicoproteínas ligadas a N contienen estructuras ramificadas estándar que están compuestas de manosa, galactosa, N-acetilglucosamina y ácidos neurámicos. La glicosilación ligada a N del dominio Fc de anticuerpos terapéuticos expresados de forma recombinante es una modificación post-traducciona crítica. Los anticuerpos terapéuticos típicos tienen glicoformas complejas que poseen glicanos bi-antennarios fucosilados con un núcleo de trimanosilo cubierto por un resto de N-acetilgalactosamina (GlcNAc), galactosa y ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) en cada rama. Otras glicoformas pueden ser afucosiladas, galactosiladas, sialiladas, tienen GlcNAc terminal o bisecante, son ricas en manosa (5-9 restos), etc.

La glicosilación puede afectar la eficacia terapéutica de los fármacos proteicos recombinantes. Es bien sabido que las variaciones en la glicosilación de Fc pueden afectar las funciones efectoras mediadas por Fc. Algunas glicoformas, tales como la galactosilación y la sialilación, son deseables para disminuir la inmunogenicidad, y otras, tales como la afucosilación, los restos de GlcNAc bisecantes y los glicanos, con alto contenido de manosa, aumentan la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La glicosilación es importante en la determinación de la estructura y función de los anticuerpos terapéuticos. Determina las capacidades de unión y, a menudo, determina el reconocimiento y el procesamiento del anticuerpo una vez que se introduce en una aplicación terapéutica. En el caso de galactosilación y fucosilación, determinan la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y las funciones de ADCC, respectivamente, en las que influyen.

El nivel de β -galactosilación está relacionado con glicoformas más "maduras". La adición de galactosa es una de las últimas etapas de la glicosilación que tiene lugar en el aparato de Golgi antes de la secreción. La galactosa terminal es necesaria para la sialilación, que puede ser la etapa final en la glicosilación de algunas proteínas. La galactosa también sirve como ligando para las proteínas de unión a la galactosa y es la base de una variedad de respuestas antigénicas que están relacionadas con el contenido de hidratos de carbono. También se ha demostrado que la galactosa afecta la conformación de la proteína en disolución. (Furukawa y Sato, (1999) *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA), 1473 (1), páginas 54-86, y Houde et al., (2010) *Molecular and Cellular Proteomics*, 9(8), páginas 1716-1728.

La fucosilación también tiene lugar en el aparato de Golgi como parte de la maduración de la proteína antes de la secreción. Si una proteína está fucosilada, generalmente ocurre antes de la galactosilación en la ruta de la glicosilación. Sin embargo, la fucosilación no es necesaria para que transcurra la galactosilación (Hossler et al., (2009) *Glycobiology*, 19(9), páginas 936-949).

La influencia de la glicosilación en la bioactividad, la farmacocinética, la inmunogenicidad, la solubilidad y el aclaramiento *in vivo* de las glicoproteínas terapéuticas han hecho que la monitorización y el control de la glicosilación sea un parámetro crítico para la fabricación biofarmacéutica. Por lo tanto, los métodos para manipular el nivel de contenido de glicano de las proteínas terapéuticas serían beneficiosos.

El documento WO 2013/114164 describe un método para aumentar el contenido de glicano afucosilado en una proteína recombinante mediante el cultivo de células hospedantes que expresan la proteína recombinante a pH 7,05 y una primera temperatura (35-37°C) y, posteriormente, a una temperatura más baja (2-7°C más bajos) y un pH de 7,2.

El documento WO 2013/114245 describe un método para aumentar el contenido de glicano afucosilado en una proteína recombinante mediante el cultivo de células hospedantes que expresan la proteína recombinante a un pH entre 6,8 y 7,2 y a una temperatura entre 35 y 37°C en presencia de manganeso divalente (0,35 μ M - 20 μ M).

M. J. Gramer et al., "Modulation of Antibody Galactosylation Through Feeding of Uridine", *Manganese Chloride, and Galactose, Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 108, No. 7, julio 2011, p. 1591-1602, enseñan que la presencia

de galactosa de hasta 60 mM y/o iones de manganeso de hasta 24 μ M en los medios de cultivo de las células aumenta la velocidad de galactosilación de los anticuerpos recombinantes expresados por las células.

El documento US 2012/0276631 enseña un método para controlar el perfil de galactosilación de una proteína expresada recombinantemente que comprende complementar un medio de producción utilizado en la expresión recombinante de dicha proteína con un suplemento de manganeso y/o un suplemento de galactosa.

Existe la necesidad en la industria farmacéutica de manipular y controlar el nivel de contenido de glicano de las glicoproteínas terapéuticas recombinantes, y serían útiles los métodos para lograrlo sin un impacto significativo en el crecimiento, la viabilidad y la productividad celulares. La invención proporciona un método para manipular el contenido de glicano fucosilado en una proteína recombinante regulando el contenido de cobre y manganeso y el pH en medio de cultivo celular.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para manipular el contenido de glicano fucosilado en una proteína recombinante, que comprende inocular un biorreactor con células hospedantes de mamífero que expresan la proteína recombinante, cultivar las células hospedantes de mamífero en un medio de cultivo celular químicamente definido libre de suero; en el que el medio de cultivo celular incluye de 10 a 100 ppb de cobre y de 50 a 1000 nM de manganeso, a pH 7,0, cosechar la proteína recombinante producida por la célula hospedante, en el que el nivel de glicanos afucosilados en la proteína recombinante aumenta en comparación con el nivel de glicano afucosilado obtenido en el mismo medio de cultivo celular a un pH más bajo.

En una realización, el método comprende además un aumento en el nivel de β -galactosilación en la proteína recombinante.

En una realización, la concentración de cobre es 100 ppb.

En una realización, la concentración de manganeso es 1000 nM.

En una realización, el contenido de glicano fucosilado se manipula para influir en la función efectora de la proteína recombinante.

En una realización, el método comprende además un cambio de temperatura que puede ser de 36°C a 31°C. En otra realización relacionada, el cambio de temperatura ocurre en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En aún otra realización relacionada, el cambio de temperatura se produce durante la fase de producción.

En una realización, la célula hospedante que expresa la proteína recombinante se cultiva en un cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión, o combinaciones de los mismos. En una realización relacionada, el cultivo es un cultivo por perfusión. En otra realización relacionada, la perfusión comprende perfusión continua. En otra realización relacionada, la velocidad de perfusión es constante. En otra realización relacionada, la perfusión se realiza a una velocidad menor o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por día. En aún otra realización relacionada, la perfusión se logra alternando el flujo tangencial.

En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l.

En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de 500 l a 2000 l.

En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de 1000 l a 2000 l.

En una realización, el biorreactor se inocula con al menos $0,5 \times 10^6$ células/ml.

En una realización, el medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero es un medio de cultivo celular de perfusión.

Las células hospedantes son células de mamífero.

En una realización, las células hospedantes son células de ovario de hámster chino (CHO).

En una realización, la proteína recombinante es una glicoproteína.

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 citocina.

En una realización, la proteína recombinante producida por la célula hospedante se purifica y formula en una formulación farmacéuticamente aceptable.

La proteína recombinante producida por el método de la invención puede purificarse o formularse en una formulación farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1 Densidad de células viables integradas (10^6 células días/ml)

- 5 pH 6,85 50 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua gris con +)
 pH 6,85 50 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea gris con +)
 pH 6,85 1000 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua gris con círculo blanco)
 pH 6,85 1000 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea gris con círculo blanco)
 pH 7,0 50 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua negra con +)
 10 pH 7,0 50 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea negra con +)
 pH 7,0 1000 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea negra discontinua con círculo en blanco)
 pH 7,0 1000 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea negra con círculo en blanco)

El pH parece ser el único factor que afecta el crecimiento celular. Las concentraciones de manganeso y cobre parecen no tener efecto sobre el crecimiento celular.

Fig. 2 Viabilidad (%)

- 15 pH 6,85 50 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua gris con +)
 pH 6,85 50 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea gris con +)
 pH 6,85 1000 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua gris con círculo blanco)
 pH 6,85 1000 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea gris con círculo blanco)
 20 pH 7,0 50 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua negra con +)
 pH 7,0 50 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea negra con +)
 pH 7,0 1000 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua negra con círculo blanco)
 pH 7,0 1000 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea negra con círculo blanco)

Hacia el día 17, los cultivos a pH 6,85 tenían una viabilidad final más alta en comparación con los cultivos a pH 7,0. Sin embargo, la viabilidad final fue superior al 80%, independientemente del pH. La concentración de cobre y manganeso en los intervalos ensayados no tuvo efecto sobre la viabilidad.

Fig. 3 Título ajustado de células empaquetadas (g/l)

- 30 pH 6,85 50 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua gris con +)
 pH 6,85 50 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea gris con +)
 pH 6,85 1000 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea discontinua gris con círculo blanco)
 pH 6,85 1000 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea gris con círculo blanco)
 pH 7,0 50 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (línea negra discontinua con +)
 pH 7,0 50 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea negra con +)
 pH 7,0 1000 Mn^{2+} 10 Cu^{2+} (negro línea discontinua con círculo blanco)
 35 pH 7,0 1000 Mn^{2+} 100 Cu^{2+} (línea negra con círculo blanco)

El pH parece no tener un impacto estadístico en el título ajustado de células empaquetadas; del mismo modo, la concentración de cobre y manganeso no tuvo efecto en esta línea celular y proceso.

Fig. 4 Densidad de células viables (10^5 células días/ml)

pH 6,85 50 Mn 10 Cu (línea discontinua gris con +)

pH 6,85 50 Mn 100 Cu (línea gris con +)

pH 6,85 1000 Mn 10 Cu (línea discontinua gris con círculo blanco)

pH 6,85 1000 Mn²⁺ 100 Cu²⁺ (línea gris con círculo blanco)

5 pH 7,0 50 Mn²⁺ 10 Cu²⁺ (línea discontinua negra con +)

pH 7,0 50 Mn²⁺ 100 Cu²⁺ (línea negra con +)

pH 7,0 1000 Mn²⁺ 10 Cu²⁺ (línea discontinua negra con círculo blanco)

pH 7,0 1000 Mn²⁺ 100 Cu²⁺ (línea negra con círculo blanco)

10 Los reactores que funcionan a pH 6,85 crecieron a densidades celulares de casi 10⁶ células por ml más que los reactores que crecieron a pH 7,0. La concentración de cobre y manganeso no tuvo un efecto estadísticamente significativo en el crecimiento celular en este experimento para esta línea celular y proceso. El pH fue el único factor que impactó el crecimiento celular.

15 Fig. 5 β -Galactosilación (Adj. R² = 0,95) Generador de perfiles de predicción generado con el software estadístico JMP. El perfil ilustra la direccionalidad y la magnitud de los cambios en la β -galactosilación como resultado de la manipulación del pH y la concentración de manganeso. Los términos en el generador de perfiles representan los términos restantes en el modelo estadístico después de eliminar aquellos términos que no eran estadísticamente significativos. La adición de manganeso tuvo un efecto significativo en el nivel de beta-galactosilación; cuanto mayor es la concentración de manganeso, mayor es el porcentaje de beta-galactosilación. El pH también tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la beta-galactosilación, ya que el pH aumentó, la beta-galactosilación también aumentó, pero no en la medida observada cuando se añadió manganeso.

20 Fig. 6 Afucosilación (Adj. R² = 0,92) Generador de perfiles de predicción generado con el software estadístico JMP. El perfil ilustra la direccionalidad y la magnitud de los cambios en la afucosilación como resultado de la manipulación del pH, concentraciones manganeso y de cobre. Los términos en el generador de perfiles representan los términos restantes en el modelo estadístico después de eliminar aquellos términos que no eran estadísticamente significativos. El cobre, el manganeso y el pH tuvieron un impacto estadísticamente significativo en los niveles de afucosilación. Los niveles crecientes de cobre y manganeso, así como el aumento del pH, dieron como resultado un aumento de la afucosilación.

25 Fig. 7 Citotoxicidad relativa de ADCC, en la afucosilación de base (4%), 6% de afucosilación y 8% de afucosilación.

30 Fig. 8 Respuesta a la dosis escalada de la CDC, en la β -galactosilación basal, (2,7%), 25% de β -galactosilación y 50% de β -galactosilación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 La variación de la concentración de manganeso en el medio de cultivo celular puede influir en el grado de β -galactosilación de los anticuerpos recombinantes. El manganeso actúa como cofactor en la modulación de la actividad de galactosiltransferasa. La reacción mediada por galactosiltransferasa emplea UDP-galactosa como sustrato de azúcar, y manganeso como cofactor. Un cambio en el nivel de galactosilación puede ser causado por un cambio en la disponibilidad de UDP-galactosa o un cambio en la actividad enzimática (por ejemplo, alterando la concentración de cofactor de manganeso), o ambos.

40 Análogamente, la fucosilación puede moderarse alterando los niveles del sustrato de GDP-fucosa, interfiriendo con la actividad de la fucosiltransferasa o modificando el mecanismo del transportador de GDP-fucosa. Sin embargo, no se ha informado que los iones metálicos desempeñen un papel directo en ninguno de estos mecanismos. Como se describe en el presente documento, se encontró que aumentar el nivel de manganeso y cobre impacta el contenido de glicano fucosilado de proteína recombinante al aumentar significativamente el nivel de glicanos afucosilados.

45 Además, se encontró que el pH también desempeñaba un papel importante en la determinación de los patrones de glicosilación.

Se sabe que el tipo y la extensión de la glicosilación ligada a N en los anticuerpos IgG1 afectan las funciones efectoras mediadas por Fc. Por ejemplo, el nivel de afucosilación aumenta fuertemente la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) al aumentar la afinidad de unión a los receptores Fc γ , mientras que el nivel de galactosilación puede influir en la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Esto hace

50 que sea crítico comprender y controlar la naturaleza y el nivel de glicosilación de las proteínas terapéuticas. Como

se describe en este documento, la mejora de la afucosilación y galactosilación tuvo un impacto sustancial en el efector de ADCC y CDC

Se proporciona un método para mejorar el control de los niveles de glicanos afucosilados en una proteína recombinante mediante la manipulación del pH y las concentraciones de manganeso (Mn^{2+}) y cobre (Cu^{2+}) en un medio de cultivo celular. Los niveles de glicanos afucosilados y β -galactosilados se incrementaron sin afectar el rendimiento del cultivo celular.

La invención proporciona un método para manipular el contenido de glicano fucosilado en una proteína recombinante, que comprende inocular un biorreactor con células hospedantes de mamífero que expresan la proteína recombinante, cultivar las células hospedantes de mamífero en un medio de cultivo celular químicamente definido libre de suero; en el que el medio de cultivo celular incluye de 10 a 100 ppb de cobre y de 50 a 1000 nM de manganeso, a pH 7,0, cosechar la proteína recombinante producida por la célula hospedante, en el que el nivel de glicanos afucosilados en la proteína recombinante aumenta en comparación con el nivel de glicano afucosilado obtenido en el mismo medio de cultivo celular a un pH más bajo. En una realización, el método comprende además un aumento en el nivel de β -galactosilación en la proteína recombinante. En una realización, la concentración de cobre es 100 ppb. En una realización, la concentración de manganeso es 1000 nM. En una realización, el contenido de glicano fucosilado se manipula para influir en la función efectora de la proteína recombinante.

En una realización, el método comprende además un cambio de temperatura. El cambio de temperatura puede ser de 36°C a 31°C. En otra realización relacionada, el cambio de temperatura ocurre en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En aún otra realización relacionada, el cambio de temperatura se produce durante la fase de producción.

En una realización, la célula hospedante que expresa la proteína recombinante se cultiva en un cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión, o combinaciones de los mismos. En una realización relacionada, el cultivo es un cultivo por perfusión. En otra realización relacionada, la perfusión comprende perfusión continua. En otra realización relacionada, la velocidad de perfusión es constante. En otra realización relacionada, la perfusión se realiza a una velocidad menor o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por día. En aún otra realización relacionada, la perfusión se logra alternando el flujo tangencial.

En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de al menos 500 l. En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de 500 l a 2000 l. En una realización, el biorreactor tiene una capacidad de 1000 l a 2000 l. En una realización, el biorreactor se inocula con al menos $0,5 \times 10^6$ células/ml.

En una realización, el medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero es un medio de cultivo celular de perfusión. Las células hospedantes son células de mamífero. En una realización, las células hospedantes son células de ovario de hámster chino (CHO).

En una realización, la proteína recombinante es una glicoproteína. 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 citocina. La proteína recombinante producida por la célula hospedante de mamífero puede purificarse y formularse en una formulación farmacéuticamente aceptable.

Cultivo de células

Por "cultivo celular" o "cultivo" se entiende el crecimiento y la propagación de células fuera de un organismo o tejido multicelular. Las condiciones de cultivo adecuadas para células de mamífero se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Las células de mamífero pueden cultivarse en suspensión o mientras están unidas a un sustrato sólido.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "medio de cultivo celular" (también denominado "medio de cultivo", "medio de cultivo celular", "medio de cultivo de tejidos") se refieren a cualquier disolución nutritiva utilizada para el crecimiento de células, por ejemplo células animales o de mamíferos, y que generalmente proporciona al menos uno o más componentes de los siguientes: una fuente de energía (generalmente en forma de hidratos de carbono tal como la glucosa); uno o más de todos los aminoácidos esenciales, y generalmente los veinte aminoácidos básicos, más cisteína; vitaminas y/u otros compuestos orgánicos típicamente requeridos a bajas concentraciones; lípidos o ácidos grasos libres; y oligoelementos, por ejemplo compuestos inorgánicos o elementos naturales que normalmente se requieren a concentraciones muy bajas, generalmente en el intervalo micromolar.

La disolución nutritiva puede complementarse opcionalmente con componentes adicionales para optimizar el crecimiento de las células, tales como hormonas y otros factores de crecimiento, por ejemplo insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, suero, y similares; sales, por ejemplo calcio, magnesio y fosfato, y amortiguadores, por ejemplo HEPES; nucleósidos y bases, por ejemplo adenosina, timidina, hipoxantina; e hidrolizados de proteínas y tejidos, por ejemplo proteína animal hidrolizada (peptona o mezclas de peptona, que pueden obtenerse a partir de subproductos animales, gelatina purificada o material vegetal); antibióticos, por ejemplo gentamicina; protectores celulares o tensioactivos, poliaminas, por ejemplo putrescina, espermidina o espermina (véase, por ejemplo,

Publicación de la OMPI nº WO 2008/154014) y piruvato (véase, por ejemplo, Patente US nº 8053238), dependiendo de los requisitos de las células a cultivar y/o los parámetros de cultivo celular deseados.

Los tensioactivos no iónicos también se pueden añadir al medio de cultivo celular. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen, pero sin limitación, alcohol polivinílico, polietilenglicol, y tensioactivos de copolímero de bloques no iónicos. También se incluyen alquil poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (copolímeros de bloques de EO-PO), poli(vinilpirrolidona), alquilpoliglucósidos (tales como monoestearato de sacarosa, lauril diglucósido o monolaureato de sorbitán, octil glucósido y decil maltósido), alcoholes grasos (alcohol cetílico u alcohol oleílico) o cocamidas (cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA).

También se incluyen copolímeros de bloques basados en óxido de etileno y óxido de propileno, también denominados copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno. Estas moléculas son copolímeros de tribloques no iónicos que tienen una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)). De particular interés son los que tienen 70 unidades de polioxipropileno y 30 unidades de cada una de las cadenas de polioxietileno. En una realización preferida, el copolímero de bloques es el poloxámero 188 (CAS # 90003-11-6 con un peso molecular promedio de 8,4 kd, BASF Chemical, Washington, NJ) que se vende bajo varias marcas tales como Pluronic® F68, Kolliphor® P-188, Lutrol® F68, y Lutrol® 188. Tales tensioactivos no iónicos se pueden añadir a concentraciones de hasta 5 g/l o más, y se pueden usar para mantener la viabilidad celular durante períodos de cultivo más largos en condiciones de perfusión ATF.

La presente invención proporciona un medio de cultivo celular que contiene de 10 a 100 ppb de cobre y de 50 a 1000 nM de manganeso. En una realización, el medio de cultivo celular contiene 100 ppb de manganeso. En otra realización, el medio de cultivo celular contiene 1000 nM de manganeso. En otra realización, el medio de cultivo celular contiene 100 ppb de manganeso y 1000 nM de manganeso. Las sales de cobre y manganeso útiles para esta invención incluyen, pero no se limitan a, sulfato cúprico pentahidrato y sulfato de manganeso monohidratado.

Los componentes del medio de cultivo celular, que incluyen cobre y manganeso, se pueden moler completamente en una formulación de medio en polvo; se pueden moler parcialmente con suplementos líquidos añadidos al medio de cultivo celular según sea necesario; o los componentes del medio de cultivo celular pueden añadirse en una forma completamente líquida al cultivo celular.

El medio de cultivo celular incluye aquellos que se emplean típicamente y/o se conocen para uso con cualquier procedimiento de cultivo celular, tales como, pero sin limitación, cultivo discontinuo, discontinuo extendido, discontinuo alimentado y/o de perfusión o continuo de células.

Un medio de cultivo celular "base" (o discontinuo) se refiere a un medio de cultivo celular que se usa típicamente para iniciar un cultivo celular y que es suficientemente completo para mantener el cultivo celular.

Un medio de cultivo celular de "crecimiento" se refiere a un medio de cultivo celular que se usa típicamente en cultivos celulares durante un período de crecimiento exponencial, una "fase de crecimiento", y que es suficientemente completo para mantener el cultivo celular durante esta fase. Un medio de cultivo celular de crecimiento también puede contener agentes de selección que confieren resistencia o supervivencia a marcadores seleccionables incorporados en la línea celular hospedante. Dichos agentes de selección incluyen, pero no se limitan a, geneticina (G4118), neomicina, higromicina B, puromicina, zeocina, metionina sulfoximina, metotrexato, medio de cultivo celular libre de glutamina, medio de cultivo celular que carece de glicina, hipoxantina y timidina, o timidina sola.

Un medio de cultivo celular de "producción" se refiere a un medio de cultivo celular que se usa típicamente en cultivos celulares durante las fases de transición y producción cuando finaliza el crecimiento exponencial y la producción de proteínas se hace cargo, y es lo suficientemente completo como para mantener una densidad celular deseada, viabilidad y/o título del producto durante estas fases.

Un medio de cultivo celular de "perfusión" se refiere a un medio de cultivo celular que se usa típicamente en cultivos celulares que se mantienen por perfusión o métodos de cultivo continuo y que es suficientemente completo para mantener el cultivo celular durante este proceso. Las formulaciones de medio de cultivo celular de perfusión se pueden enriquecer o concentrar más que las formulaciones de medio de cultivo celular de base para adecuarlas al método utilizado para eliminar el medio gastado. El medio de cultivo celular de perfusión se puede usar durante las fases tanto de crecimiento como de producción.

Los cultivos celulares pueden complementarse con un 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. El medio de cultivo celular concentrado puede contener algunos o todos los nutrientes necesarios para mantener el cultivo celular; en particular, el medio concentrado puede contener nutrientes identificados o que se sabe que se consumen durante el curso de la fase de producción del cultivo celular. El medio concentrado puede basarse en casi cualquier formulación de medio de cultivo celular. Tal medio de alimentación concentrado puede contener algunos o todos los componentes del medio de cultivo celular en, por ejemplo,

alrededor de 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 25X, 30X, 40X, 50X, 75X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X, o incluso 1000X de su cantidad normal.

El medio de cultivo celular, en ciertas realizaciones, puede estar libre de suero y/o libre de productos o ingredientes de origen animal. El medio de cultivo celular, en ciertas realizaciones, puede definirse químicamente, en el que se conocen todos los componentes químicos.

Como aprecia el profesional, las células de animales o mamíferos se cultivan en un medio adecuado para las células particulares que se cultivan y que puede determinar la persona experta en la técnica sin experimentación excesiva. Los medios disponibles comercialmente se pueden utilizar e incluyen, pero no se limitan a, medio de Dulbecco modificado de Iscove, RPMI 1640, y medio esencial mínimo-alfa (MEM-alfa), medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DME/F12, alfa MEM, medio basal de Eagle con BSS de Earle, DMEM rico en glucosa, con glutamina, DMEM rico en glucosa, sin glutamina, DMEM bajo en glucosa, sin glutamina, DMEM:F12 1:1, con glutamina, GMEM (MEM de Glasgow), GMEM con glutamina, medio de insecto completo de Grace, medio de insecto de Grace, sin FBS, medio de Ham F-10, con glutamina, medio de Ham F-12, con glutamina, IMDM con HEPES y glutamina, IMDM con HEPES y sin glutamina, medio de insecto IP41, 15 (Leibovitz) (2X), sin glutamina o Rojo Fenol, 15 (Leibovitz), sin glutamina, medio modificado 5A de McCoy, medio 199, MEM de Eagle, sin glutamina o rojo fenol (2X), MEM de Eagle con BSS de Earle, con glutamina, MEM de Eagle con BSS de Earle, sin glutamina, MEM Eagle con BSS de Hank, sin glutamina, NCTC-109, con glutamina, medio CM de Richter, con glutamina, RPMI 1640 con HEPES, glutamina y/o penicilina-estreptomicina, RPMI 1640, con glutamina, RPMI 1640, sin glutamina, medio de insecto de Schneider, o cualquier otro medio conocido por un experto en la técnica, que se formulan para tipos de células particulares. A los medios ejemplares anteriores se pueden añadir componentes o ingredientes suplementarios, que incluyen componentes opcionales, en concentraciones o cantidades apropiadas, según sea necesario o deseado, y como sería conocido y practicado por aquellos que tienen experiencia en la técnica usando habilidades rutinarias.

Los cultivos celulares también pueden complementarse con alimentos concentrados independientes de nutrientes particulares que pueden ser difíciles de formular o agotarse rápidamente en cultivos celulares. Dichos nutrientes pueden ser aminoácidos tales como tirosina, cisteína y/o cistina (véase, por ejemplo, la Publicación de la OMPI nº 2012/145682). Por ejemplo, una disolución concentrada de tirosina puede alimentarse independientemente a un cultivo celular cultivado en un medio de cultivo celular que contiene tirosina. Una disolución concentrada de tirosina y cistina también puede alimentarse independientemente al cultivo celular que se cultiva en un medio de cultivo celular que carece de tirosina, cistina y/o cisteína. Las alimentaciones independientes pueden comenzar antes o al comienzo de la fase de producción. Las alimentaciones independientes se pueden llevar a cabo alimentando por lotes al medio de cultivo celular en el mismo día o en días diferentes que el medio de alimentación concentrado. Las alimentaciones independientes también se pueden perfundir en el mismo día o en días diferentes que el medio perfundido.

Se pueden emplear métodos para alimentar de forma continua un cultivo de células de mamífero, tal como los que no emplean control de retroalimentación (véase la publicación de la OMPI nº WO 2013/040444).

Medios de tratamiento

El medio de cultivo celular puede tratarse usando métodos o dispositivos para esterilizar o desinfectar medios antes de la adición al biorreactor y/o cultivo celular. Los medios de cultivo celular se pueden tratar usando tiempo corto a alta temperatura (HTST) (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 7.420.183). Los medios de cultivo celular también pueden tratarse usando UV en combinación con filtración (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de la OMPI WO 2008/157247; WO 2012/115874; WO 2013/063298 y WO 2013/138159). Los medios de cultivo celular pueden someterse a nanofiltración (véase, por ejemplo, Liu et al., (2000) Biotechnol. Prog. 16:425-434). Los medios de cultivo celular pueden tratarse con productos químicos que inactivan virus, tales como disolventes, detergentes, psoraleno, o beta-propiolactona.

Células

Las líneas celulares (también denominadas "células hospedantes") utilizadas en la invención están diseñadas genéticamente para expresar un polipéptido de interés comercial o científico. Las líneas celulares derivan típicamente de un linaje que surge de un cultivo primario que puede mantenerse en cultivo durante un tiempo ilimitado. Las células pueden contener, por ejemplo, mediante transformación, transfección, infección o inyección, vectores de expresión (constructos), tales como plásmidos y similares, que albergan secuencias codificantes, o porciones de las mismas, que codifican las proteínas para la expresión y producción en el proceso de cultivo. Dichos vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Los métodos que son bien conocidos y practicados por los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican las proteínas y polipéptidos producidos, así como los elementos de control transcripcionales y traduccionales apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en J. Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 4ª edición Cold Spring

Harbor Press, Plainview, N.Y. o cualquiera de las ediciones anteriores; F. M. Ausubel et al., 2013, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. o cualquiera de las ediciones anteriores; Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, todas las cuales se incorporan aquí para cualquier fin.

Las células hospedantes de mamífero son células que pueden cultivarse según los procedimientos de esta invención. Dichas células son líneas celulares obtenidas o derivadas de mamíferos, y son capaces de crecer y sobrevivir cuando se colocan en cultivo en monocapa o en cultivo en suspensión en un medio que contiene nutrientes apropiados y/u otros factores, tales como los descritos aquí. Las células se seleccionan típicamente que pueden expresar y segregar proteínas, o que pueden ser modificadas molecularmente para expresar y segregar grandes cantidades de una proteína particular, más particularmente, una glicoproteína de interés, en el medio de cultivo. Se entenderá que la proteína producida por una célula hospedante puede ser endógena u homóloga a la célula hospedante. Alternativamente, la proteína es heteróloga, es decir, extraña, a la célula hospedante, por ejemplo una proteína humana producida y segregada por una célula hospedante de ovario de hámster chino (CHO). Además, las proteínas de mamífero, es decir, las obtenidas originalmente o derivadas de un organismo de mamífero, se obtienen mediante los métodos de la presente invención y pueden ser segregadas por las células en el medio de cultivo.

El método de la presente invención puede usarse en el cultivo de una variedad de células. En una realización, las células cultivadas son células eucariotas tales como células vegetales y/o animales. Las células son células de mamífero. Una amplia variedad de líneas celulares de mamíferos adecuadas para el crecimiento en cultivo están disponibles en la American Type Culture Collection (Manassas, Va.) y otros depósitos así como también en vendedores comerciales. Las células que pueden usarse en los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, células MK2.7, células PER-C6, células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; Kolkekar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909; y WO 01/92337 A2), células CHO negativas a dihidrofolato reductasa (CHO/-DHFR, Urlaub y Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216), y Células dp12.CHO (patente U.S. nº 5.721.121); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL-70); células CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (células COS, COS-7, ATCC CRL-1651); células HEK 293 y células Sp2/0, células de hibridoma 5L8, células Daudi, células EL4, células HeLa, células HL-60, células K562, células Jurkat, células THP-1, células Sp2/0, células epiteliales primarias (por ejemplo, queratinocitos, células epiteliales cervicales, células epiteliales bronquiales, células epiteliales traqueales, células epiteliales renales y células epiteliales retinianas) y líneas celulares establecidas y sus cepas (por ejemplo, células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293, o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL-10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL-2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL-34); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL-75); células de hepatoma humano (HEP-G2, HB 8065); células tumorales mamarias de ratón (MMT 060562, ATCC CCL-51); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL-1442); células TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); células MCR 5; células FS4; células retinianas PER-C6, células MDBK (NBL-1), células 911, células CRFK, células MDCK, células BeWo, células de Chang, células Detroit 562, células HeLa 229, células HeLa S3, células Hep-2, células KB, células LS 180, células LS 174T, células NCI-H-548, células RPMI 2650, células SW-13, células T24, WI-28 VA13, células 2RA, células WISH, células BS-C-1, células LLC-MK₂, células de clon M-3, células 1-10, células RAG, células TCMK-1, células Y-1, células LLC-PK₁, células PK(15), células GH₁, células GH₃, células L2, células LLC-RC 256, células MH₁C₁, células XC, células MDOK, células VSW, y células TH-1, B1, o derivados de las mismas), células de fibroblastos de cualquier tejido u órgano (incluyendo, pero sin limitarse a, corazón, hígado, riñón, colon, intestino, esófago, estómago, tejido neural (cerebro, médula espinal), pulmón, tejido vascular (arteria, vena, capilar), tejido linfoide (glándula linfática, adenoides, amígdalas, médula ósea, y sangre), bazo, y líneas celulares de fibroblastos y similares a fibroblastos (por ejemplo, células TRG-2, células IMR-33, células Don, células GHK-21, células de citrulinemia, células de Dempsey, células Detroit 551, células Detroit 510, células Detroit 525, células Detroit 529, células Detroit 532, células Detroit 539, células Detroit 548, células Detroit 573, células HEL 299, células IMR-90, células MRC-5, células WI-38, células WI-26, células MiCl₁, células CV-1, células COS-1, células COS-3, células COS-7, células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); células DBS-Frhl-2, células BALB/3T3, células F9, células SV-T2, células M-MSV-BALB/3T3, células K-BALB, células BLO-11, células NOR-10, células C₃H/IOTI/2, células HSDM₁C₃, células KLN205, células de McCoy, células L de ratón, células Cepa 2071 (Ratón L), células de cepa L-M (Ratón L), células L-MTK (Ratón L), clones NCTC 2472 y 2555, células SCC-PSA1, células Swiss/3T3, células de muntjac de la India, células SIRC, células C₁₁, y células de Jensen, o derivados de las mismas), o cualquier otro tipo de célula conocido por un experto en la técnica.

Las células pueden ser adecuadas para cultivo adherente, de monocapa o de suspensión, transfección, y expresión de proteínas, por ejemplo anticuerpos. Las células pueden usarse con métodos de cultivo discontinuo, discontinuo alimentado y de perfusión o continuo.

Tipos de cultivos celulares

A los efectos de la comprensión, pero sin limitación, el profesional experto apreciará que los cultivos celulares y los experimentos de cultivo para la producción de proteínas pueden incluir tres tipos generales; a saber, cultivo

discontinuo o discontinuo extendido, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión, o combinaciones de los mismos. En el cultivo discontinuo, las células se cultivan inicialmente en medio y este medio no se elimina, reemplaza o complementa, es decir, las células no se “alimentan” con medio nuevo, durante o antes del final del experimento de cultivo. El producto deseado se cosecha al final del experimento de cultivo.

5 Para cultivos discontinuos alimentados, el tiempo del experimento de cultivo se incrementa al suplementar el medio de cultivo una o más veces (o continuamente) con medio reciente durante el ciclo, es decir, las células se “alimentan” con medio nuevo (“medio alimentado”) durante el período de cultivo. Los cultivos discontinuos alimentados pueden incluir los diversos regímenes y tiempos de alimentación, por ejemplo diariamente, día sí día no, cada dos días, etc., más de una vez al día, o menos de una vez al día, y así sucesivamente. Además, los cultivos
10 discontinuos alimentados pueden alimentarse continuamente con medio de alimentación. El producto deseado se puede cosechar entonces al final del experimento de cultivo/producción.

El cultivo por perfusión, a veces denominado cultivo continuo, es uno en el que el cultivo celular recibe medio de perfusión reciente, y en el que el medio gastado se retira del biorreactor durante el experimento. La perfusión de medios recientes en el cultivo celular y la eliminación de los medios gastados pueden ser continuos, escalonados,
15 intermitentes, o una combinación de cualquiera o todos estos. Las tasas de perfusión pueden variar de menos de un volumen de trabajo por día a muchos volúmenes de trabajo por día.

La expresión “caudal de perfusión” es la cantidad de medio que se hace pasar (se añade y se elimina) desde un biorreactor, típicamente expresada como una parte o un múltiplo del volumen de trabajo, en un momento dado. El caudal de perfusión puede variar durante la duración del experimento de cultivo celular. El “volumen de trabajo” se
20 refiere a la cantidad de volumen de biorreactor utilizado para el cultivo celular. En una realización, el caudal de perfusión es menor o igual a un volumen de trabajo por día. El medio de alimentación de perfusión se puede formular para maximizar la concentración de nutrientes de perfusión para minimizar la velocidad de perfusión.

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. Las proteínas recombinantes expresadas por el
25 cultivo celular también pueden retenerse en el cultivo para su posterior recolección o eliminarse con el medio gastado.

La perfusión se puede lograr por varios medios, incluyendo la centrifugación, sedimentación o filtración. Véase, por ejemplo, Voisard et al., (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. En una realización, se usa un método de filtración. Los filtros incluyen filtros de membrana, filtros cerámicos y filtros metálicos, y pueden tener cualquier
30 forma, incluyendo enrollada en espiral o tubular, o en forma de lámina. Uno o más filtros se pueden conectar a, en comunicación fluida con, un biorreactor juntos o de forma independiente, en serie o en paralelo.

Los filtros de fibra hueca se pueden usar en el cultivo por perfusión de células de mamíferos para la retención de proteínas celulares y/o recombinantes. Cuando el cultivo celular, que incluye los medios de cultivo celular, las células (enteras y lisadas), proteínas recombinantes expresadas solubles, proteínas de la célula hospedante, productos de desecho, y similares, se introduce en el filtro, según el tamaño de poro o el corte de peso molecular (MWCO), el material de fibra hueca puede retener ciertos componentes de cultivo celular en el lado de la luz (interior) y puede permitir que ciertos componentes pasen a través del filtro (permeado) en función del tamaño de poro o el corte del peso molecular del material de fibra hueca. El material retenido (retenido) se devuelve al biorreactor. Se añaden medios de cultivo celular de perfusión recientes al biorreactor, y el permeado se retira del
40 filtro a intervalos predeterminados o continuamente para mantener un volumen de biorreactor deseado o constante. El permeado puede desecharse, almacenarse en tanques de retención, bolsas, o se puede transferir directamente a otra operación de la unidad, tal como filtración, floculación, centrifugación y/u otros métodos de purificación aguas abajo, o similares. Las fibras huecas para microfiltración típicamente tienen un tamaño de poros que oscila de 0,1 μm a 5-10 μm , o un corte de peso molecular de 500 kDa o más, y pueden usarse para permitir que la proteína pase al permeado. Las fibras huecas de ultrafiltración tienen típicamente un intervalo de tamaño de poros de 0,01 μm a 0,1 μm , o un corte de peso molecular de 300 kDa o menos, y pueden usarse para retener la proteína deseada en el retenido y devolverla al biorreactor. Esto puede usarse, por ejemplo, para concentrar el producto de proteína recombinante para la cosecha. Dichos filtros están disponibles comercialmente, tales como Xampler UFP-750-E-4MA, Xampler UFP-30-E-4MA, (GE Healthcare, Pittsburg, PA), y Midikros TC Modules T02-E030-10, T02-050-10, T02-E750-05, T02-M10U-06 (Spectrum Laboratories, Inc, Dominguez, CA).
50

El cultivo celular puede extraerse del biorreactor y entrar al filtro mediante un sistema de bombeo, que pasa el cultivo celular a través del lado de la luz de la fibra hueca. Los ejemplos de sistemas de bombeo de células incluyen bombas peristálticas, bombas de doble diafragma, bombas de bajo cizallamiento (bombas Levitronix®, Zurich, Suiza), y sistemas de flujo tangencial alternos (ATF™, Refine Technology, Pine Brook, NJ, véase por ejemplo la patente US nº 6.544.424; Furey (2002) *Gen. Eng. News.* 22 (7), 62-63). El permeado puede extraerse de los filtros mediante el uso de bombas peristálticas. En una realización preferida, la perfusión se logra mediante el uso de un sistema de flujo tangencial alterno.
55

Procedimientos de cultivo celular

El cultivo celular se puede llevar a cabo bajo condiciones para la producción a pequeña y gran escala de proteínas recombinantes usando recipientes de cultivo y/o aparatos de cultivo que se emplean convencionalmente para el cultivo celular de animales o mamíferos. Como aprecian los expertos en la técnica, los placas de cultivo de tejidos, los matraces en T y los matraces giratorios se usan típicamente en una escala de laboratorio. Para el cultivo a mayor
 5 escala, se puede usar equipo tal como, pero sin limitarse a, dispositivos de cultivo en tanque tipo fermentador, dispositivos de cultivo de tipo de elevación de aire, biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, cultivos de botellas giratorias, sistemas de biorreactor de tanque agitado, dispositivos de cultivo de tipo de lecho empaquetado, y bolsas desechables de un solo uso o cualquier otro dispositivo adecuado conocido por un experto en la técnica. Los microportadores pueden usarse con los sistemas de botella giratoria o de biorreactor de tanque
 10 agitado. Los sistemas se pueden operar en un modo discontinuo, discontinuo alimentado, o de perfusión/continuo. Además, el aparato o sistema de cultivo puede estar equipado con un aparato adicional, tal como separadores de células que usan filtros, gravedad, fuerza centrífuga, y similares.

La producción de proteínas recombinantes se puede realizar en procedimientos de cultivo de múltiples fases. En un procedimiento de múltiples fases, las células se cultivan en dos o más fases distintas. Por ejemplo, las células
 15 pueden cultivarse primero en una o más fases de crecimiento, en condiciones ambientales que maximicen la proliferación y la viabilidad celular, después se pueden pasar a una fase de producción, en condiciones que maximicen la producción de proteínas. En un procedimiento comercial para la producción de proteínas recombinantes por células de mamíferos, comúnmente hay múltiples, por ejemplo, al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más fases de crecimiento que ocurren en diferentes recipientes de cultivos (Nx a N-1) que preceden a
 20 un cultivo de producción final. Las fases de crecimiento y producción pueden estar precedidas o separadas por una o más fases de transición. Se puede realizar una fase de producción a gran escala.

La expresión "fase de crecimiento" de un cultivo celular se refiere al período de crecimiento celular exponencial (es decir, la fase logarítmica) en el que las células generalmente se dividen rápidamente. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un período de alrededor de un día, o alrededor de dos días, o alrededor de tres días, o
 25 alrededor de cuatro días, o más de cuatro días. La duración del tiempo durante el cual las células se mantienen en la fase de crecimiento variará según el tipo de célula y/o la tasa de crecimiento celular y/o las condiciones de cultivo, por ejemplo.

La expresión "fase de transición" se refiere a un período de tiempo entre la fase de crecimiento y la fase de producción. Generalmente, la fase de transición es el tiempo durante el cual las condiciones de cultivo pueden controlarse para mantener un cambio desde la fase de crecimiento a la fase de producción. Varios parámetros de
 30 cultivo celular que pueden controlarse incluyen, pero no se limitan a, uno o más de, temperatura, pH, osmolalidad, vitaminas, aminoácidos, azúcares, peptonas, amonio, sales, y similares.

La expresión "fase de producción" de un cultivo celular se refiere al período de tiempo en que el crecimiento celular se ha estancado. El crecimiento celular logarítmico generalmente termina antes o durante esta fase, e interviene la
 35 producción de proteínas. Los procedimientos de cultivo celular discontinuo alimentado y de perfusión complementan el medio de cultivo celular o proporcionan medio reciente para lograr y mantener la densidad celular deseada, la viabilidad y el título del producto en esta etapa. Se puede realizar una fase de producción a gran escala. Los cultivos celulares a gran escala se pueden mantener en un volumen de al menos alrededor de 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10.000, 15.000, 20.000 litros. En una realización de la invención, la fase de producción se realiza
 40 en biorreactores de 500 l, 1000 l y/o 2000 l.

Típicamente, los cultivos celulares que preceden a un cultivo de producción final pasan por dos fases anteriores, las series de siembra y del inóculo. La fase de la serie de siembra (N-X) tiene lugar a pequeña escala, en la que las células se expanden rápidamente en número. En la fase de la serie del inóculo (N-1), las células se expanden aún
 45 más para generar el inóculo para el biorreactor de producción, tal como un inóculo de al menos $0,5 \times 10^6$ células/ml. Las series de siembra y de N-1 se pueden producir mediante cualquier método de cultivo, típicamente cultivos celulares discontinuos. Las densidades celulares de N-1 de $\geq 0,5 \times 10^5$ células/ml son típicas para el sembrado de biorreactores de producción. Las densidades celulares más altas de N-1 pueden disminuir o incluso eliminar el tiempo necesario para alcanzar una densidad celular deseada en el biorreactor de producción. Un método preferido para lograr mayores densidades celulares de N-1 es el cultivo por perfusión que usa filtración de flujo tangencial
 50 alterno. Un cultivo celular de N-1 cultivado mediante un proceso de perfusión que utiliza filtración de flujo tangencial alterno puede proporcionar células a cualquier densidad deseada, tales como densidades de $>90 \times 10^6$ células/ml o más. El cultivo celular de N-1 puede usarse para generar un cultivo de inoculación de un solo bolo, o puede usarse como un cultivo madre de siembra giratorio que se mantiene para inocular múltiples biorreactores de producción. La densidad de inoculación puede tener un impacto positivo en el nivel de proteína recombinante producida. Los niveles
 55 de producto tienden a aumentar con el aumento de la densidad de inoculación. La mejora en el título está ligada no solo a una mayor densidad de inoculación, sino que es probable que esté influenciada por el estado metabólico y del ciclo celular de las células que se ponen en producción. En una realización de la invención, el cultivo celular se establece inoculando el biorreactor con al menos $0,5 \times 10^6$ células/ml.

La expresión "densidad celular" se refiere al número de células en un volumen dado de medio de cultivo. La
 60 "densidad de células viables" se refiere al número de células vivas en un volumen dado de medio de cultivo, según

se determina mediante ensayos de viabilidad estándar (tales como el método de exclusión de colorante azul de tripano). La expresión "volumen celular empaquetado" (PCV), también denominado "porcentaje de volumen celular empaquetado" (% PCV), es la relación entre el volumen ocupado por las células y el volumen total de cultivo celular, expresada como un porcentaje (véase Stettler, et al., (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dec 20:95(6): 1228-33). El volumen celular empaquetado es una función de la densidad celular y el diámetro celular; aumentos en el volumen celular empaquetado podrían surgir de aumentos en la densidad celular o el diámetro celular, o ambos. El volumen celular empaquetado es una medida del nivel de sólidos en el cultivo celular.

Controles de cultivo celular

Las condiciones de cultivo celular adecuadas para los métodos de la presente invención son aquellas que se emplean típicamente y se conocen para el cultivo discontinuo, discontinua alimentado, o de perfusión (continua) de células, o cualquier combinación de esos métodos, con atención al pH, oxígeno disuelto (O₂), y dióxido de carbono (CO₂), agitación y humedad, y temperatura. Durante la producción de proteínas recombinantes, es deseable tener un sistema controlado en el que las células crecen durante un tiempo deseado o hasta una densidad deseada, y después el estado fisiológico de las células se cambia a un estado de alta productividad, de crecimiento limitado o detenido, en el que las células usan energía y sustratos para producir la proteína recombinante a favor del aumento de la densidad celular. Para el cultivo celular a escala comercial y la fabricación de productos terapéuticos biológicos, es muy deseable la capacidad de limitar o detener el crecimiento celular y poder mantener las células en un estado de crecimiento limitado o detenido durante la fase de producción. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, cambios de temperatura, uso de inductores químicos de producción de proteínas, limitación de nutrientes o inanición, e inhibidores del ciclo celular, ya sea solos o en combinación.

Uno de estos mecanismos para limitar o detener el crecimiento es cambiar la temperatura durante el cultivo celular. Los cambios de temperatura pueden ocurrir en cualquier momento durante el cultivo celular. Una fase de crecimiento puede ocurrir a una temperatura más alta que una fase de producción. Se puede realizar un cultivo celular a un primer punto de ajuste de temperatura de alrededor de 35°C a alrededor de 38°C, y entonces la temperatura se cambia a un segundo punto de ajuste de temperatura de alrededor de 29°C a alrededor de 37°C, opcionalmente de alrededor de 30°C a alrededor de 36°C, o de alrededor de 30°C a alrededor de 34°C. En una realización, puede producirse un cambio de temperatura durante la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción. En otra realización, puede producirse un cambio de temperatura durante la fase de producción.

El cambio del punto de ajuste de temperatura se puede hacer manualmente o automáticamente mediante el uso de sistemas de control de biorreactor. El punto de ajuste de la temperatura puede cambiarse a un tiempo predeterminado o en respuesta a uno o más parámetros de cultivo celular, tales como la densidad celular, el título o la concentración de uno o más componentes del medio. Uno de estos métodos utiliza una herramienta de monitorización de biomasa en línea integrada en el sistema de control del biorreactor para activar un cambio en el punto de ajuste de temperatura cuando se alcanza la densidad celular deseada. Por ejemplo, una sonda de biomasa basada en capacitancia se puede usar para estimar la densidad celular en línea, y los datos de las medidas en línea se pueden usar para desencadenar un cambio en la temperatura del biorreactor. Tales sondas basadas en capacitancia incluyen el sensor de capacitancia Fogale (DN12-200) (Nimes, Francia).

Los inductores químicos de la producción de proteínas, tales como la cafeína, el butirato y/o la hexametilén bisacetamida (HMBA), se pueden añadir independientemente o al mismo tiempo que antes o después de un cambio de temperatura. Si se añaden inductores 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 entonces durante días o incluso semanas, mientras que las células producen la proteína o proteínas deseadas.

Otro método para mantener las células en un estado fisiológico deseado es inducir la detención del crecimiento celular mediante la exposición del cultivo celular a condiciones bajas de L-asparagina (véase, por ejemplo, la Publicación de la OMPI nº WO2013/006479). La detención del crecimiento celular puede lograrse y mantenerse a través de un medio de cultivo que contiene una concentración limitante de L-asparagina y que mantiene una baja concentración de L-asparagina en el cultivo celular. Mantener la concentración de L-asparagina a 5 mM o menos puede usarse para mantener las células en un estado de detención del crecimiento.

Los inhibidores del ciclo celular, compuestos conocidos o sospechosos de regular la progresión del ciclo celular y los procesos asociados de transcripción, reparación del ADN, diferenciación, senescencia y apoptosis relacionados con esto, también son útiles para inducir la detención del crecimiento celular. Son útiles los inhibidores del ciclo celular que interactúan con la maquinaria del ciclo, tales como las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), al igual que lo son las moléculas que interactúan con proteínas de otras rutas, tales como AKT, mTOR, y otras rutas que afectan, directa o indirectamente, al ciclo celular.

Cosecha y purificación

Las proteínas recombinantes expresadas pueden segregarse en el medio de cultivo del que pueden recuperarse y/o recogerse. Las proteínas recombinantes pueden someterse luego a una o más etapas de procesamiento que incluyen cosechado, purificación, inactivación/filtración de endotoxinas, y/o virus, y/o ultrafiltración/diafiltración.

Las proteínas recombinantes expresadas pueden capturarse en el permeado de cosecha. Las proteínas pueden purificarse, o purificarse parcialmente, de los permeados de la cosecha usando procedimientos y productos disponibles comercialmente conocidos en la técnica y/o disponibles de vendedores comerciales. Dichos métodos incluyen floculación; centrifugación; precipitación; métodos de filtración tales como filtración profunda; métodos de cromatografía que incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio aniónico en modo mixto, cromatografía de interacción hidrofoba, y cromatografía de hidroxiapatita, entre otros métodos disponibles.

Las proteínas purificadas pueden entonces "formularse", es decir, intercambiar amortiguador, esterilizarse, envasarse a granel y/o envasarse para un usuario final. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas son conocidas en la técnica, e incluyen las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

Técnicas analíticas de procedimiento

Las tecnologías y métodos analíticos de procedimientos están disponibles para monitorizar y evaluar las muestras tomadas durante el cultivo celular y los procedimientos de purificación para monitorizar cuantitativamente y/o cualitativamente las características de la proteína recombinante y el procedimiento de producción. Esta información en tiempo real o en línea se puede utilizar para monitorizar y/o controlar el producto y los parámetros de producción, tales como el título, la densidad celular; atributos de calidad del producto, tales como modificaciones posteriores a la traducción; variabilidad del producto o procedimiento, tales como impurezas y similares, para tomar decisiones oportunas y modificar procedimientos según sea necesario.

Cada etapa de un procedimiento de cultivo celular aguas arriba o un procedimiento de purificación aguas abajo puede monitorizarse para proporcionar información sobre la cantidad de un atributo de calidad de producto (PQA) en particular y para controlar este PQA con un objetivo e intervalo preestablecidos.

Las muestras se pueden tomar de forma intermitente, a las frecuencias deseadas, o de forma continua. Las muestras pueden analizarse en tiempo real o casi en tiempo real o almacenarse para su posterior análisis. Esta información se puede utilizar para realizar cambios durante los procedimientos aguas arriba y aguas abajo.

La detección del atributo de calidad del producto se puede hacer usando espectrometría de masas, cromatografía de líquidos con detección por UV y/o espectrometría de masas, y electroforesis capilar, y similares.

Estos procedimientos son adaptables a la monitorización continua con ajustes de procedimiento manuales o automatizados, tales como las alimentaciones, la temperatura, la duración del procedimiento según lo determinado por el nivel de un atributo de calidad de producto especificado.

El análisis de masa intacta para detectar la presencia de modificaciones post-traduccionales, tales como el procesamiento de aminoácidos y la glicosilación, se puede realizar utilizando una columna de polihidroxietil aspartamida que se hace funcionar en modo de exclusión por tamaños y que está acoplada con ESI-MS (Brady et al., (2008) J Am Soc Mass Spectro, 19: 502-509).

La monitorización en tiempo real del eluato de la cromatografía de intercambio iónico mediante la monitorización de una relación LS/UV normalizada para cada fracción utilizando un detector de dispersión de luz láser y una absorbancia de UV, véase la Publicación de Patente US n° US 2013-0303732.

El método de atributos múltiples utiliza una sola cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC/MS) para buscar y caracterizar datos de MS en tándem utilizando varias bases de datos y plataformas de búsqueda tales como Sequest (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA), X!Tandem (The Global Proteome Machine Organization) o Mascot (Matrix Science, Boston, MA). Las muestras pueden desnaturalizarse a pH alto o para mantener isoformas de disulfuro y proteger las variantes de succinimida, a pH bajo. La muestra se reduce entonces y se alquila, seguido de digestión con tripsina. Después, la muestra se inyecta en una MS (tal como un Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), y el análisis se realiza utilizando el software Pinpoint (Thermo Fischer Scientific). Los atributos que pueden identificarse, cuantificarse y monitorizarse incluyen isomerización, desaminación, reducción de disulfuro, contaminación de la proteína de la célula hospedante, mutaciones, malas incorporaciones, hidroxilisina, tioéter, cadenas pesadas no glicosiladas, amidación C-terminal, proteína A residual, caracterizar los glicanos y proporcionar identidad de moléculas. La precisión de la masa para cada atributo monitorizado se puede establecer en menos de 5 ppm de la masa predicha. La identificación del péptido/atributo se confirma mediante la fragmentación de MS2 y los métodos de caracterización ortogonal (HILIC-MS para la glicosilación, por ejemplo). La distribución isotópica experimental debe tener una puntuación de producto de punto mejor que 0.95 en comparación con la distribución isotópica teórica. Se establece una ventana de tiempo de retención para cada atributo, y todos los estados de carga detectables para

cada atributo se consideran para cuantificación. Se define un criterio que detectará cambios en el atributo. Por ejemplo, la desaminación se puede monitorizar determinando un valor de desaminación (péptido desaminado dividido entre la suma del péptido desaminado y el péptido original no modificado multiplicado por 100. La glicosilación se puede monitorizar comparando cada glicano específico con la suma de todos los glicanos detectables.

Proteínas

Como se usa en el presente documento, "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en todas partes, y se refieren a una molécula que comprende dos o más restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Los péptidos, polipéptidos y proteínas también incluyen modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación que da como resultado glicoproteínas, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP.

Como se usa en el presente documento, el término "glicoproteína" se refiere a péptidos y proteínas que tienen al menos una cadena lateral de oligosacárido que incluye restos de manosa. Las glicoproteínas pueden ser homólogas a la célula hospedante, o pueden ser heterólogas, es decir, extrañas, a la célula hospedante que se está utilizando, tal como, por ejemplo, una glicoproteína humana producida por una célula hospedante de ovario de hámster chino (CHO). Dichas glicoproteínas se denominan generalmente "glicoproteínas recombinantes". En ciertas realizaciones, las glicoproteínas expresadas por una célula hospedante se segregan directamente en el medio.

Las proteínas pueden ser de interés científico o comercial, incluidos los medicamentos basados en proteínas. Las proteínas incluyen, entre otras, anticuerpos y proteínas de fusión. Los péptidos, polipéptidos y proteínas pueden producirse mediante líneas celulares animales recombinantes utilizando métodos de cultivo celular, y pueden denominarse "péptido recombinante", "polipéptido recombinante", "proteína recombinante", "glicoproteína recombinante". La proteína o proteínas expresadas pueden producirse intracelularmente o segregarse en el medio de cultivo del que pueden recuperarse y/o recogerse.

Los ejemplos no limitantes de proteínas de mamífero que pueden producirse ventajosamente por los métodos de esta invención incluyen proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas o sustancialmente similares a toda o parte de una de las siguientes proteínas: factor de necrosis tumoral (TNF), ligando flt3 (documento WO 94/28391), eritropoyetina, trombopoyetina, calcitonina, IL-2, angiopoyetina-2 (Maisonpierre et al. (1997), Science 277(5322): 55-60), ligando para el receptor activador 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 colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, patente australiana nº 588819), factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre (patente US nº 6.204.363), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento y desarrollo de megacariotas, RANTES, proteína 2 similar a fibrinógeno humano (FGL2; nº de acceso NCBI NM_00682; Rüegg y Pytela (1995), Gene 160:257-62), hormona de crecimiento, insulina, insulínotropina, factores de crecimiento similares a la insulina, hormona paratiroidea, interferones que incluyen α -interferón, γ -interferón, e interferones de consenso (patentes US nºs 4.695.623 y 4.897.471), factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas similares a la sinaptotagmina (SLP 1-5), neurotrofina-3, glucagón, interleucinas, factores estimulantes de colonias, linfotóxina- β , factor inhibidor de leucemia, y oncostatina-M. Las descripciones de proteínas que se pueden producir según los métodos de la invención se pueden encontrar, por ejemplo, en Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, todos los volúmenes (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New 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 la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista de dicho receptor o cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, y/o proteínas sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas. Estos receptores y antagonistas incluyen: ambas formas de receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, denominadas p55 y p75, patente US nº 5.395.760 y patente US nº 5.610.279), receptores de interleucina-1 (IL-1) (tipos I y II; patente EP nº 0460846, patente US nº 4.968.607 y patente US nº 5.767.064), antagonistas del receptor de IL-1 (patente US nº 6.337.072), antagonistas o inhibidores de IL-1 (patentes US nºs 5.981.713, 6.096.728, y 5.075.222), receptores de IL-2, receptores de IL-4 (patente EP nº 0 367 566 y patente US nº 5.856.296), receptores de IL-15, receptores de IL-17, receptores de IL-18, receptores de Fc, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos, receptores para oncostatina-M y factor inhibidor de leucemia, receptor activador de NF-kappa B (RANK, documento WO 01/36637 y patente US nº 6.271.349), osteoprotegerina (patente US nº 6.015.938), receptores para TRAIL (incluidos los receptores 1, 2, 3 y 4 para TRAIL), y receptores que comprenden dominios de muerte, como Fas o el receptor inductor de la apoptosis (AIR).

Otras proteínas que pueden producirse usando la invención incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de los antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD) o sus ligandos o

proteínas sustancialmente similares a cualquiera de estos. Dichos antígenos se describen en Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996). Se describen proteínas CD similares en talleres posteriores. Los ejemplos de tales antígenos incluyen CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, y ligandos de ellos (ligando de CD27, ligando de CD30, etc.). Varios de los antígenos CD son miembros de la familia de receptores TNF, que también incluye 41BB y OX40. Los ligandos son a menudo miembros de la familia TNF, al igual que el ligando de 41BB y el ligando de OX40.

Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden producir usando la invención. Los ejemplos incluyen proteínas que comprenden la totalidad o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o una proteína sustancialmente similar a una de estas: miembros de la familia del dominio desintegrina y metaloproteína, incluyendo la enzima convertidora TNF-alfa, varias cinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-I, globinas, un antagonista de IL-2, antitripsina alfa-1, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente, y muchas otras enzimas y sus ligandos.

El término "anticuerpo" incluye la referencia a inmunoglobulinas glicosiladas y no glicosiladas de cualquier isotipo o subclase o a una región de unión a antígeno del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, a menos que se especifique lo contrario, incluyendo humano, humanizado, quimérico, multi-específico, monoclonal, policlonal, y oligómeros o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. También se incluyen proteínas que tienen un fragmento o región de unión a antígeno tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, Fd, dAb, maxicuerpos, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de región determinante de la complementariedad (CDR), scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión de antígeno específico a un polipéptido diana. El término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, aquellos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula hospedante transfectada para expresar el anticuerpo.

Los 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 mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD32, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, subunidad p35 de IL-12, IL-13, IL-21, IL-23, subunidad p19 de IL-23, subunidad p40 compartida de IL-12/IL-23, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, receptor de IL-17, subunidades del receptor de IL-18, FGL2, PDGF- β y sus análogos (véanse las patentes US n^{os} 5.272.064 y 5.149.792), B7RP-1, B7RP-2, VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, c-fms, receptor de EGF (véase la patente US n^o 6.235.883), receptor de CGRP, receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), FGF21, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, EGFRvIII, estimulador de linfocitos 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), ST2, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, LCG (que es un producto génico que se expresa en asociación con cáncer de pulmón), HER-2, HER-3, una glicoproteína asociada a tumores TAG-72, el antígeno SK-1, epítomos asociados a tumores que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes con cáncer de colon y/o pancreático, epítomos o proteínas asociados a cáncer expresados en células de cáncer de mama, colon, células escamosas, próstata, páncreas, 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, TSLP, IFN γ , receptores 1, 2, 3 y 4 de TRAIL, RANK, ligando de RANK, TNF- α , la molécula de adhesión VAP-1, la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), la molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), angiopoyetina 1 (Ang1), angiopoyetina 2 (Ang2), adhesina leucointegrina, glicoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, rNAPc2 (que es un inhibidor del factor de tejido del factor VIIa), MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA), alfafetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), CTLA-4 (que es un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos), muerte celular programada 1 (PD-1), ligando de muerte celular programada 1 (PDL-1), ligando de muerte celular programada 2 (PDL-2), gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), dominio de inmunoglobulina de células T y dominio 3 de mucina (TIM3), receptor de Fc- γ 1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, esclerostina, L-selectina, virus sincitial respiratorio, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B (VHB), *Streptococcus mutans*, y *Staphylococcus aureus*. Los ejemplos específicos de anticuerpos conocidos que pueden producirse usando los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, adalimumab, alirocunab, bevacizumab, infliximab, abcximab, alemtuzumab, bapineuzumab, basiliximab, belimumab, briakinumab, brodalumab, canakinumab, certolizumab pegol, cetuximab, conatumumab, denosumab, dupilumab, eculizumab, gemtuzumab guselkumab, ozogamicina, golimumab, ibritumomab, ixekizumab, ipilimumab, tiuxetan, labetuzumab, lebrikizumab, mapatumumab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, muromonab-CD3, nivolumab, natalizumab, nimotuzumab, ofatumumab, omalizumab, oregovomab, palivizumab, panitumumab, pemtumomab, pertuzumab, pembrolizumab, ranibizumab, rituximab, romosozumab, rovelizumab, rilotumumab, tildrakizumab, tocilizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, tremelimumab, ustekinumab, vedolizumab, zalutumumab, y zanolimumab.

La invención también se puede usar para producir proteínas de fusión recombinantes que comprenden, por ejemplo, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que

comprenden una de las proteínas mencionadas anteriormente más un dominio de multimerización, tales como una cremallera de leucina, una espiral enrollada, una porción Fc de una inmunoglobulina, o una proteína sustancialmente similar, se pueden producir utilizando los métodos de invención. Véanse, por ejemplo, documento WO94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Håkansson et al. (1999), Structure 7:255-64. Se incluyen específicamente entre tales proteínas de fusión recombinantes proteínas en las que una porción de un receptor se fusiona con una porción Fc de un anticuerpo tal como etanercept (una p75 TNFR:Fc) y belatacept (CTLA4:Fc). Las proteínas y polipéptidos quiméricos, así como fragmentos o porciones, o mutantes, variantes o análogos de cualquiera de las proteínas y polipéptidos mencionados anteriormente también se incluyen entre las proteínas, polipéptidos y péptidos adecuados que pueden producirse mediante los métodos de la presente invención. Esto incluye trebananib, un peptidocuerpo neutralizante de angiopoyetina (Ang) 1 y 2. También se incluyen los acopladores de células T bi-específicos (BiTEs) que ejercen una acción selectiva y dirigen al sistema inmunitario humano a actuar contra las células tumorales. Específicamente incluidos entre tales BiTEs están aquellos que seleccionan CD19, tal como blinatumomab. Otras moléculas incluyen aflibercept.

Si bien la terminología utilizada en esta solicitud es estándar en la técnica, las definiciones de ciertos términos se proporcionan en este documento para garantizar la claridad y la definición del significado de las reivindicaciones. Las unidades, prefijos y símbolos pueden denotarse en su forma aceptada del SI. Los intervalos numéricos que se mencionan en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo, e incluyen y apoyan cada número entero dentro del intervalo definido. Los métodos y técnicas descritos en este documento generalmente se realizan según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel et al., 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).

Ejemplos

Cultivo celular

El día 0, las células CHO que expresan un anticuerpo anti-TNF α recombinante se inocularon en biorreactores de 3 l (Applikon, Foster City, CA) a $9,0 \times 10^6$ células viables/ml en un volumen de trabajo de 1500 ml de un medio base químicamente definido y libre de suero. Los cultivos se mantuvieron a 36°C, OD a 30 mmHg, agitación a 400 RPM. Los cultivos celulares se iniciaron en modo discontinuo, y la perfusión se inició el día 3 usando un sistema de filtración de flujo tangencial alterno ATF-2™ (Refine Technologies, Hanover, NJ) equipado con un cartucho de fibra hueca NFWC GE RTP de 30 kDa (GE Healthcare, Pittsburg, PA)). El medio era un medio de perfusión químicamente definido libre de suero que incluía sulfato de manganeso monohidratado y sulfato cúprico pentahidratado y pH como se describe en la Tabla 1. El experimento se realizó por duplicado.

Tabla 1

pH	Mn ²⁺ (nM)	Cu ²⁺ (ppb)
6,85	50	10
6,85	50	100
6,85	1000	10
6,85	1000	100
7,0	50	10
7,0	50	100
7,0	1000	10
7,0	1000	100

La tasa de perfusión aumentó gradualmente de 0,3 a 1,0 volumen de trabajo/día durante el experimento del cultivo celular. El día, la temperatura se cambió a 31°C, y el cultivo se cosechó el día 17. La glucosa se mantuvo entre 4-8 g/l.

Se tomaron muestras diariamente para evaluar el cultivo. El pH y la presión parcial de CO₂ (pCO₂) y O₂ (pO₂) se midieron usando un analizador de gases en sangre Rapid Lab 1260 (Siemens, Malvern, PA); la concentración de glucosa y lactato se midió utilizando un NovaFLEX (Nova Biomedical, Waltham, MA). La osmolalidad se determinó por el osmómetro modelo 2020 (Advanced Instruments, Norwood, MA). La temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, y la agitación se controlaron utilizando controladores Applikon ADI1010.

Los días 7, 10, 13, 15 y 17, se extrajeron muestras de 50 ml del cultivo de los biorreactores para el análisis de calidad del producto. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente (Beckman Coulter, Indianápolis, IN), y el sobrenadante se filtró a través de un filtro superior de tubo de 0,2 µm (Corning, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). El sobrenadante libre de células se congeló entonces a -20°C hasta que se descongeló, y la proteína A se purificó antes del análisis de calidad del producto. Al finalizar la producción de 17 días, el cultivo restante se retiró de los biorreactores. Las células se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C, y el medio de cultivo acondicionado se filtró estéril usando un filtro de cartucho de polietersulfona (PES) de 0,2 µm en botellas Nalgene (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), después se purificó por proteína, y los eluatos neutralizados se ensayaron como se describió anteriormente.

La densidad de células viables y la viabilidad celular se determinaron por Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). La densidad de células viables integrada (IVCD) se calculó como una densidad de células viables acumulativa a lo largo de toda la producción. El título se midió utilizando POROS® Protein A (Life Technologies, Grand Island, NY). El título se determinó en el sobrenadante, y entonces se ajustó al volumen que ocupaban las células de manera que fuera representativo de lo que realmente estaba presente en un volumen dado de fluido de cultivo celular. Como el volumen celular empaquetado se expresó como un porcentaje del volumen total, los títulos ajustados por PCV siempre fueron más bajos que el título en el sobrenadante.

Se analizaron diferentes especies de N-glicano por cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC), y se presentan como un porcentaje del área de pico total de los glicanos combinados. Las muestras que contienen anticuerpos se recogieron y purificaron mediante proteína A. Las muestras purificadas se trataron con PNGasa-F y se incubaron a 37°C durante 2 horas para liberar los glicanos unidos a N. Los glicanos liberados enzimáticamente se marcaron con ácido 2-aminobenzoico (2-AA) a 80°C durante 75 minutos. Después, se eliminó el exceso de marcador de 2-AA con un cartucho Glycoclean S. Las muestras se evaporaron durante la noche, y el pelete seco resultante se reconstituyó con agua para su posterior análisis mediante HILIC, utilizando UPLC (Waters Corporation, Milford, MA). Los glicanos se inyectaron y se unieron a la columna en condiciones orgánicas altas y se eluyeron con un gradiente creciente de un amortiguador acuoso de formiato de amonio. Se usó la detección de fluorescencia para monitorizar la elución de glicano y se calculó el porcentaje relativo de las especies de glicano principales y secundarias. Los niveles de β-gal incluyen A1G1F, A2G1F, A2G2F, y las formas afucosiladas análogas. Las formas afucosiladas incluyen A1G0, A2G0, A1G1, A2G1 y A2G2. También se determinaron Manosa 5 y Manosa 7.

Este experimento fue diseñado para definir los efectos de cada factor principal (cobre, manganeso y pH) y las interacciones bidireccionales. El experimento fue un diseño factorial completo de tres factores, dos niveles (2³) para definir los efectos principales y las interacciones bidireccionales, y no incluyó puntos centrales. El estudio tenía la intención de entregar valores de potencia de aproximadamente 0,8 utilizando una relación señal/ruido de 1,25. Los perfiles se generaron utilizando el software estadístico JMP y Prediction Profiler (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Resultados

La concentración de cobre y manganeso en el medio de perfusión no afectó el rendimiento o la productividad del cultivo celular. Si bien el pH no impactó el crecimiento celular o la productividad, el pH 6,85 redujo la viabilidad final en aproximadamente 10% (p < 0,001), Figs. 1-4.

Glicanos ricos en manosa

El pH fue el único factor que tuvo un efecto significativo en los altos niveles de manosa. A medida que el pH aumentó, también lo hizo el nivel de enriquecimiento de manosa, véase la Tabla 2.

β-galactosilación

La adición de manganeso mejoró la β-galactosilación. Cuanto mayor es la concentración de manganeso, mayor es el porcentaje de β-galactosilación. El pH también tuvo un efecto estadísticamente significativo en la β-galactosilación. El aumento del pH aumentó la β-galactosilación, pero en menor medida que en comparación con el aumento cuando se añadió manganeso, véase la Fig. 5. El efecto del cobre sobre la β-galactosilación fue insignificante.

Afucosilación

El cobre, el manganeso y el pH tuvieron un impacto estadísticamente significativo en los niveles de afucosilación. Cuanto mayor es la concentración de cobre y manganeso y cuanto mayor es el pH, mayor es el nivel de afucosilación, véase la Fig. 6.

Todos los glicanos clave se vieron significativamente afectados por el pH. La β -galactosilación se vio significativamente afectada por el aumento de la concentración de manganeso. El aumento del nivel de manganeso a su nivel más alto dio como resultado un aumento de la β -galactosilación en aproximadamente 14% sobre la línea base, el nivel más bajo de cobre y manganeso ensayado al mismo pH, según lo determinado por el modelado estadístico. La afucosilación se vio significativamente afectada al aumentar las concentraciones de cobre y manganeso. El aumento de los niveles de cobre y manganeso mejoró el nivel de afucosilación en aproximadamente 1,3% con respecto al valor de la línea base. Si bien la adición de altas concentraciones de cobre y manganeso no tuvo impacto en el rendimiento del cultivo celular, sí tuvo un impacto en la calidad del producto. Véanse las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Resultados de la cosecha del día 17

Mn ²⁺ (nM)	Cu ²⁺ (ppb)	pH	Afucosilación (%)	Enriquecimiento de manosa (%)	β -galactosilación (%)
50	10	6,85	4,24	2,69	16,14
50	10	7,00	5,19	3,55	18,71
50	100	6,85	4,83	2,54	16,09
50	100	7,00	5,93	3,32	21,90
1000	10	6,85	4,94	2,63	30,79
1000	10	7,00	6,26	3,21	35,14
1000	100	6,85	5,46	2,53	29,31
1000	100	7,00	6,59	3,36	32,93

Tabla 3. Sumario del ajuste del modelo (R^2) y la significancia estadística de los términos que forman parte del modelo (valores p).

Parámetro	R^2 ajustado	Mayor pH	Mayor Mn ²⁺	Mayor Cu ²⁺
		Valores de P	Valores de P	Valores de P
β -Galactosilación	0,95	0,0028	<0,0001	--
Afucosilación	0,92	<0,0001	<0,0001	0,0028
Enriquecimiento de manosa	0,93	<0,0001	--	--
La designación de "mayor" se refiere a una situación en la que el pH, u otros factores son más altos, y después los diferentes tipos de glicosilación aumentan.				

La glicosilación puede afectar la eficacia terapéutica de los fármacos proteicos recombinantes. Es bien sabido que las variaciones en la glicosilación de Fc pueden afectar las funciones efectoras mediadas por Fc. La afucosilación y los glicanos con alto contenido de manosa pueden mejorar la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Para uso en un ensayo de ADCC, el material de anticuerpo anti-TNF α recombinante afucosilado y fucosilado se produjo por separado utilizando un procedimiento discontinuo alimentado. El anticuerpo afucosilado se obtuvo con la ayuda de un inhibidor de fucosiltransferasa añadido. El anticuerpo recombinante resultante estaba alrededor de 85% afucosilado. El material de anticuerpo afucosilado se mezcló luego con material de anticuerpo completamente fucosilado para producir niveles específicos de afucosilación en la mezcla de anticuerpos final. El material de anticuerpo se usó entonces para medir el nivel de actividad de ADCC a varios niveles de afucosilación para determinar la sensibilidad de la respuesta de ADCC.

La actividad ADCC de la mezcla de anticuerpos se evaluó en un ensayo basado en células usando como células diana células CHO M7 que expresaban de forma estable una forma de TNF α transmembránico resistente a la enzima convertidora de TNF α (TACE). Las células NK92-M1, transfectadas de manera estable con CD16 humano (Fc γ RIIIa-158V) se usaron como células efectoras. Brevemente, las células diana se opsonizaron con concentraciones crecientes (0,143 ng/ml a 40 ng/ml) de anticuerpo antes de la incubación conjunta con las células efectoras NK92-M1/CD16. Tras la lisis de células diana mediada por ADCC, la enzima intracelular adenilato cinasa

se liberó en el medio de cultivo celular. La cantidad de adenilato cinasa liberada se midió usando el kit de bioensayo ToxiLight™ (Lonza, Allendale, NJ). SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) se usó para realizar un análisis de datos de 4 parámetros y un ajuste de curva de modelo restringido a los datos de respuesta frente a la dosis. La actividad de la muestra de ensayo se determinó comparando la respuesta de la muestra de ensayo con la respuesta obtenida para el estándar de referencia, y se dio a conocer como porcentaje de citotoxicidad relativa.

Para uso en un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), se obtuvo material β -galactosilado de una fracción enriquecida cromatográficamente del anticuerpo anti-TNF α recombinante. El anticuerpo enriquecido se usó para preparar disoluciones con niveles específicos de β -galactosilación. Después, el nivel de actividad de CDC se midió a varios niveles de β -galactosilación para establecer la sensibilidad de la respuesta de CDC.

El grado de actividad de CDC provocado por el anticuerpo se evaluó en un ensayo basado en células funcionales. Las células CHO M7 se incubaron previamente con calceína-AM 20 μ M (Sigma, St. Louis, MO). La calceína-AM entró en las células y fue escindida por esterases inespecíficas para volverse fluorescente y quedar atrapada dentro de las membranas celulares intactas. Las células diana cargadas de calceína se incubaron con diferentes concentraciones de dosis del anticuerpo (1,563 ng/ml a 200 ng/ml), seguido de la adición de complemento (concentración final del 2,5%) para una segunda incubación.

Después de la incubación del complemento, se retiró el sobrenadante, y se midió la fluorescencia usando un lector de microplacas (EnVision, Perkin Elmer, Waltham, MA). La intensidad de fluorescencia fue directamente proporcional a la cantidad de lisis celular. Se utilizó SoftMax® Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para realizar un análisis de datos de 4 parámetros y un ajuste de curva de modelo restringido para los datos de respuesta frente a la dosis. La actividad de la muestra de ensayo se determinó comparando la respuesta de la muestra de ensayo con la respuesta obtenida para el estándar de referencia, y se dio a conocer como porcentaje de citotoxicidad relativa.

El aumento del nivel de afucosilación en tan solo un 2% tuvo un impacto práctico en la actividad de ADCC (Fig. 7). La actividad de CDC también se vio claramente afectada al aumentar el nivel de β -galactosilación, aunque la respuesta fue mucho menos sensible (Fig. 8).

Las funciones efectoras de ADCC y CDC pueden ser factores críticos para la actividad clínica de las proteínas terapéuticas, y el logro de los valores diana deseados para glicanos específicos puede ser clave para alcanzar los puntos finales clínicos deseados. Pequeños cambios en la afucosilación pueden tener un gran impacto en la actividad ADCC de una glicoproteína. Al alterar el cobre y el manganeso, es posible controlar los niveles de glicanos responsables de estas funciones efectoras y dirigir la calidad del producto.

REIVINDICACIONES

1. Un método para manipular el contenido de glicano fucosilado en una proteína recombinante, que comprende
inocular un biorreactor con células hospedantes de mamífero que expresan la proteína recombinante, cultivar las
células hospedantes de mamífero en un medio de cultivo celular químicamente definido libre de suero; en el que el
medio de cultivo celular incluye de 10 a 100 ppb de cobre y de 50 a 1000 nM de manganeso, a pH 7,0,
cosechar la proteína recombinante producida por la célula hospedante,
en el que el nivel de glicanos afucosilados en la proteína recombinante aumenta en comparación con el nivel de
glicano afucosilado obtenido en el mismo medio de cultivo celular a un pH más bajo.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además un aumento en el nivel de β -galactosilación en la
proteína recombinante.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la concentración de cobre es 100 ppb.
4. El método según la reivindicación 1, en el que la concentración de manganeso es 1000 nM.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el contenido de glicano fucosilado se controla para aumentar el
nivel de glicanos afucosilados y de glicanos beta-galactosilados sin afectar el rendimiento del cultivo celular.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además un cambio de temperatura, en el que el cambio de
temperatura es
 - a) de 36°C-31°C, o
 - b) ocurre en la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción, o
 - c) ocurre durante la fase de producción.
7. El método según la reivindicación 1, en el que la célula hospedante de mamífero que expresa la proteína
recombinante se cultiva en un cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo por perfusión, o
combinaciones de los mismos.
8. El método según la reivindicación 7, en el que el cultivo es un cultivo por perfusión.
9. El método según la reivindicación 8, en el que la perfusión
 - a) comprende perfusión continua, o
 - b) es constante, o
 - c) se realiza a una velocidad menor o igual a 1,0 volúmenes de trabajo por día, o
 - d) se logra mediante flujo tangencial alterno.
10. El método según la reivindicación 1, en el que el biorreactor tiene una capacidad de
 - a) al menos 500 l, o
 - b) 500 l a 2000 l, o
 - c) 1000 l a 2000 l.
11. El método según la reivindicación 1, en el que el biorreactor se inocula con al menos $0,5 \times 10^6$ células/ml.
12. El método según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo celular definido químicamente libre de suero es
un medio de cultivo celular por perfusión.
13. El método según la reivindicación 1, en el que las células hospedantes son células de ovario de hámster chino
(CHO).
14. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante es
 - a) una glicoproteína, o
 - b) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo
quimérico, una proteína de fusión recombinante, o una citocina.

15. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína recombinante producida por la célula hospedante se purifica y formula en una formulación farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

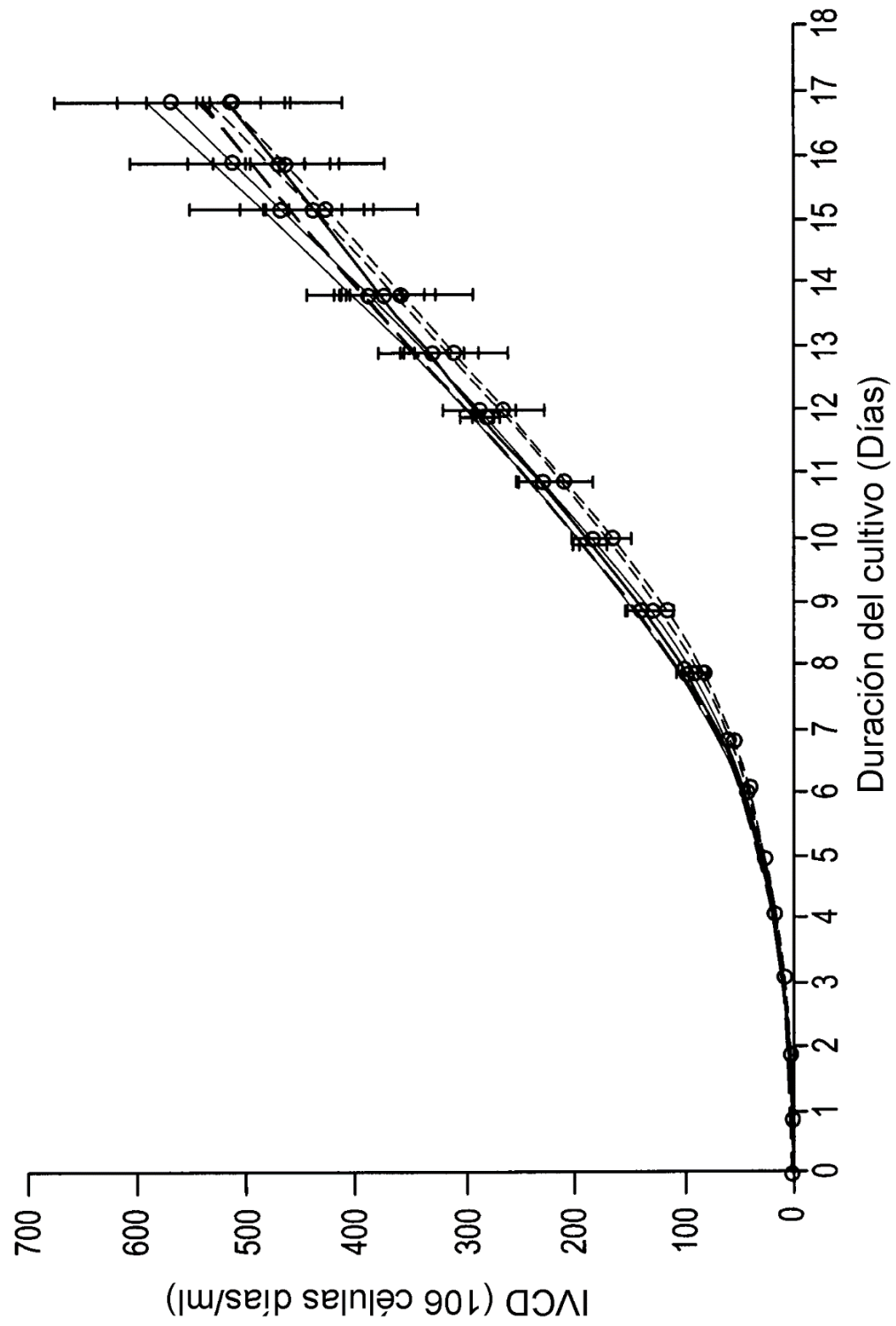


FIG. 2

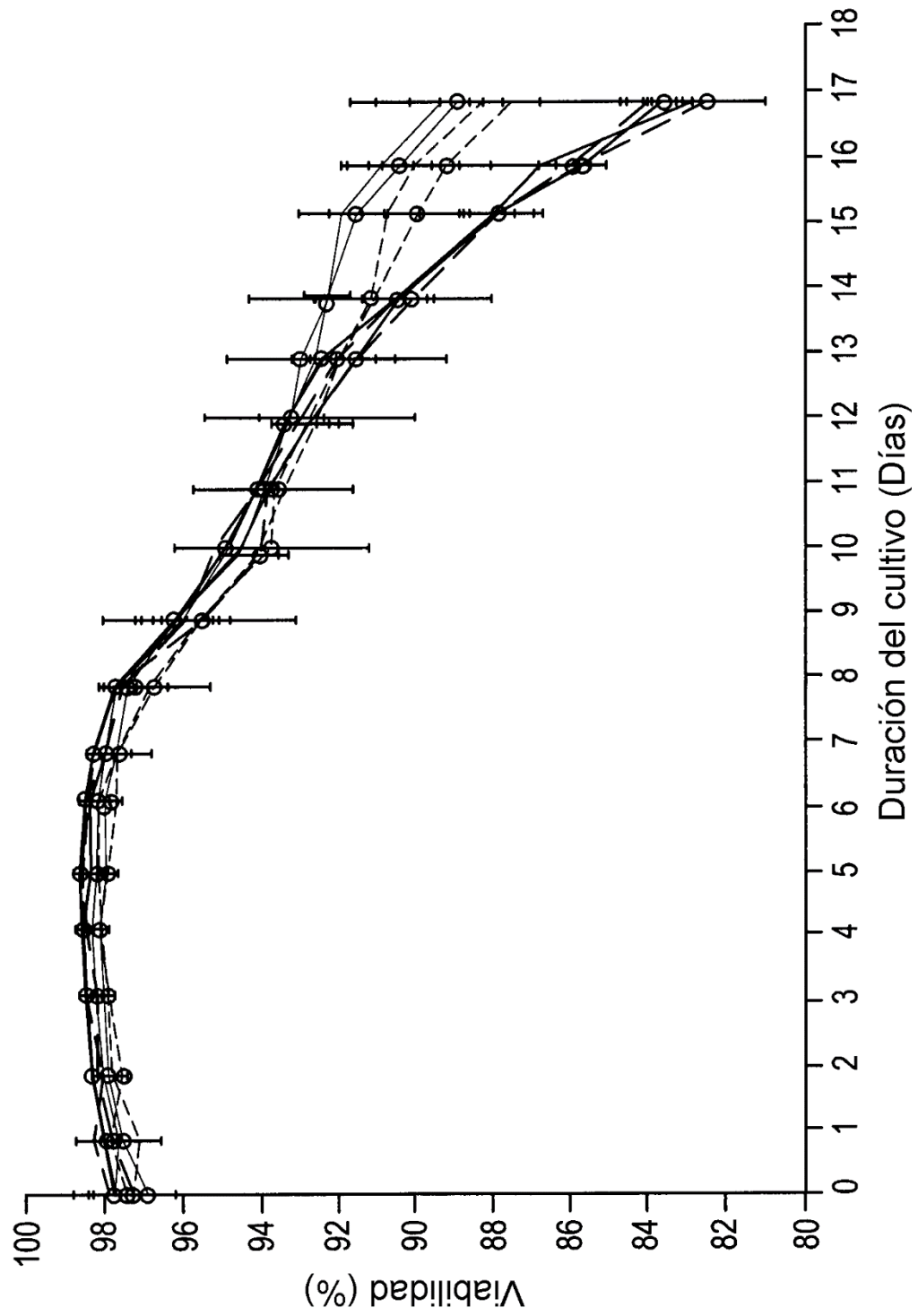


FIG. 3

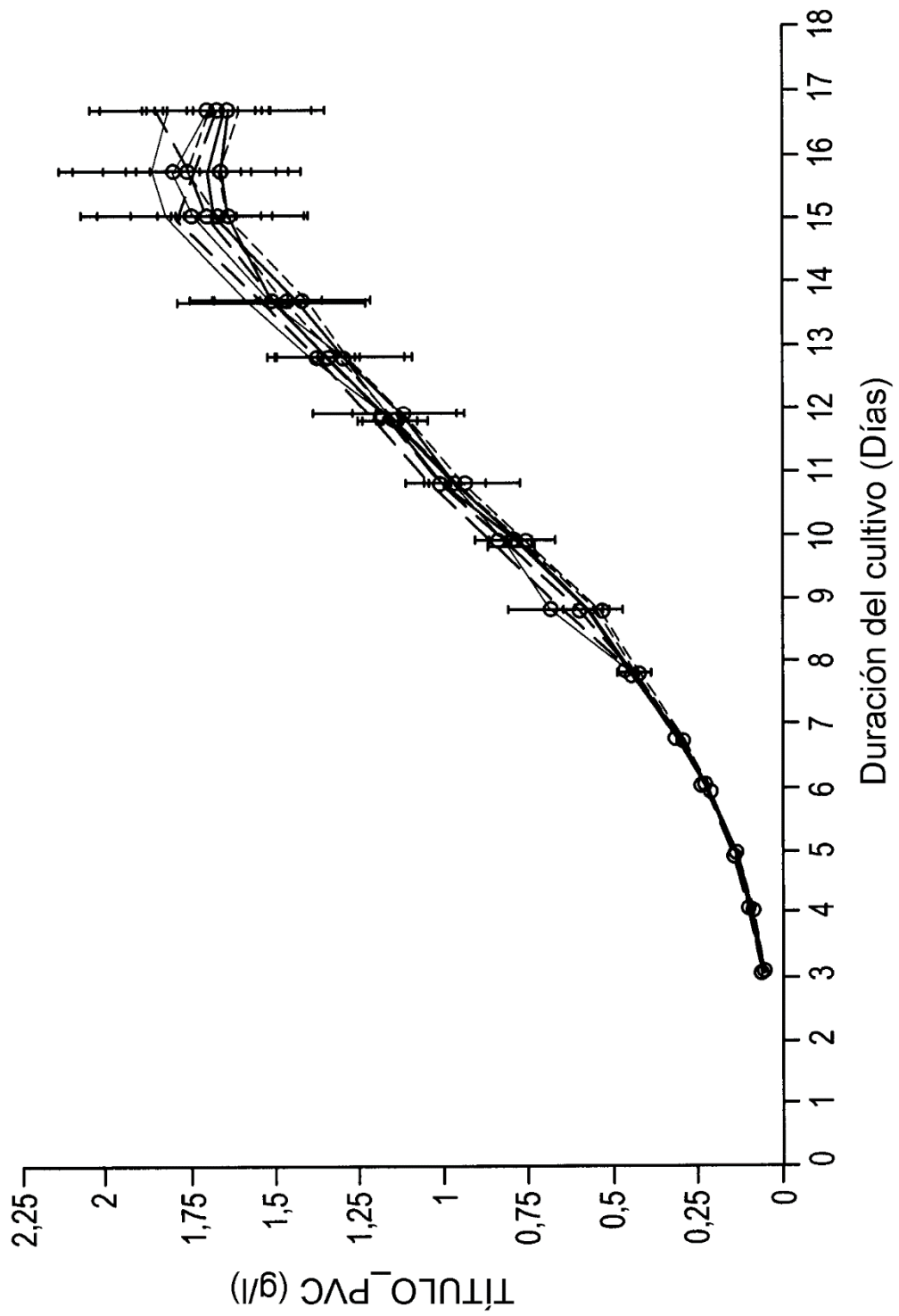


FIG. 4

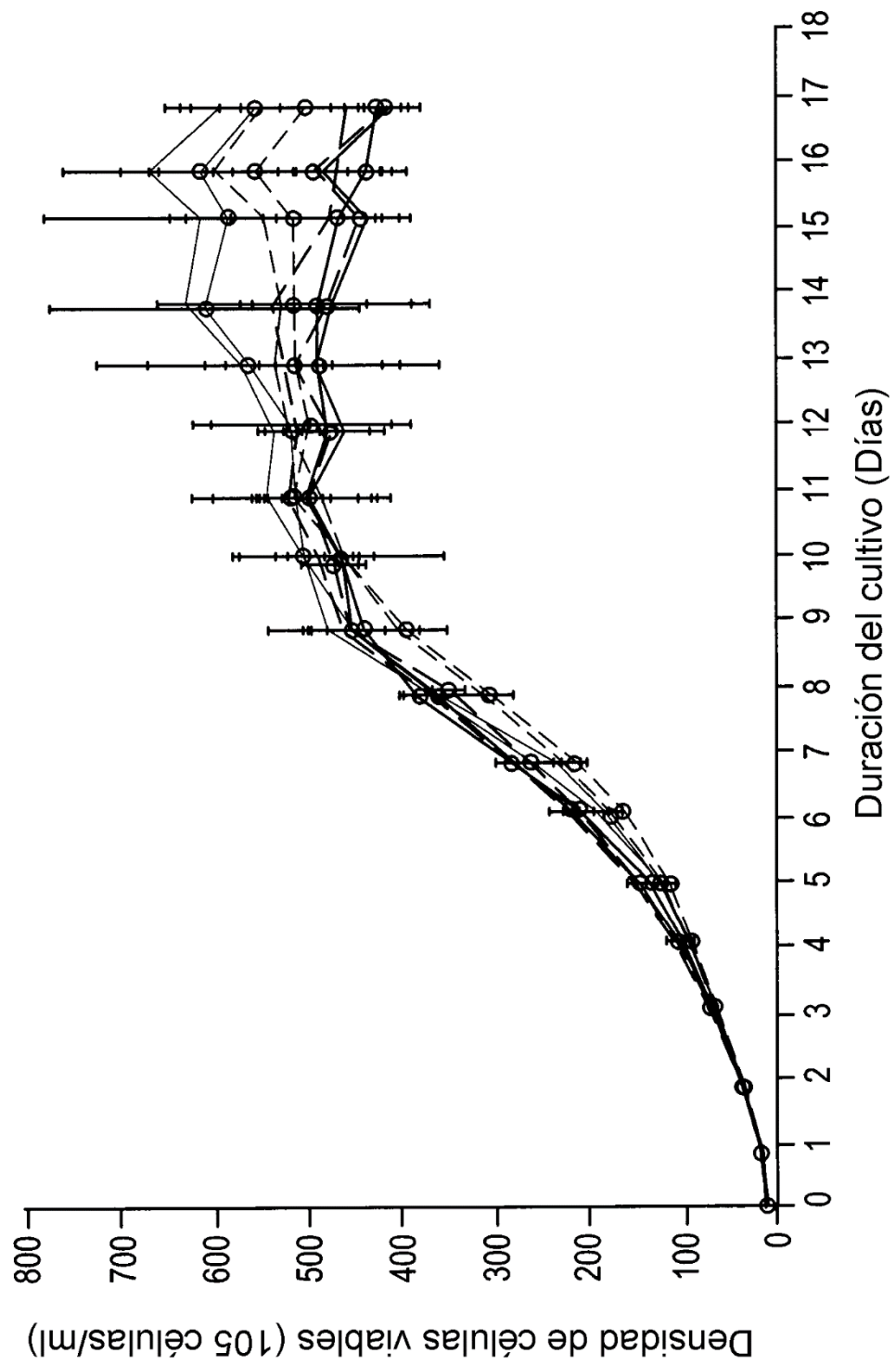


FIG. 5

Generador de perfiles de predicción para beta-galactosilación

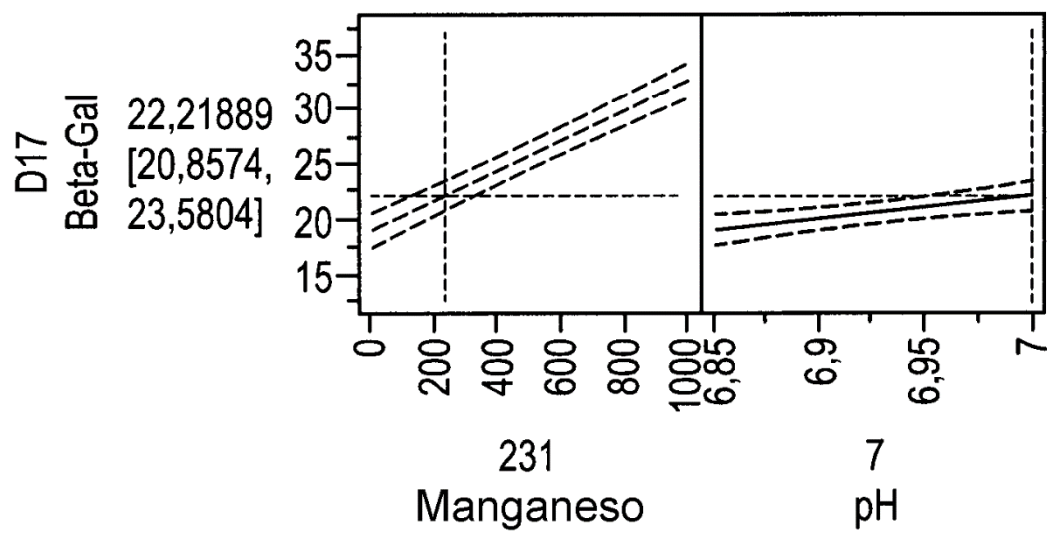


FIG. 6

Generador de perfiles de predicción para afucosilación

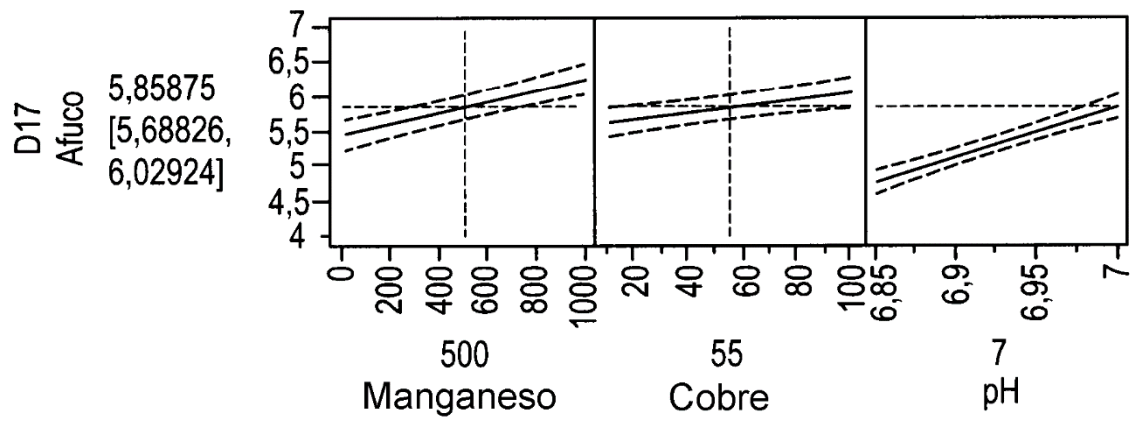


FIG. 7

