

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 276**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2016** **PCT/EP2016/066147**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017** **WO17012886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2016** **E 16736447 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3325610**

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

30 Prioridad:

**17.07.2015 EP 15177224**

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

**29.12.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 800 276 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para modular perfiles de producción de proteínas recombinantes

**Campo de la invención.**

5 La invención pertenece al campo del cultivo de células. En particular, la invención se refiere a métodos para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante en un medio de cultivo de células que comprende una cantidad efectiva o suplementada con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, con lo que la producción de dicha proteína aumenta en relación con el crecimiento de las células sin dicho colorante de triazina o cualquier otro inductor.

**Antecedentes de la invención.**

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

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

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

Se ha descrito el ácido butírico por su efecto como "inductor" de la producción de anticuerpos en células CHO (Kim et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 71(3): p. 184 - 193, 2000). Otros productos como los agentes tensioactivos han demostrado que mejoran la producción de proteína recombinante (p. ej. WO 2014/110440 y WO 2014/151901). Se  
30 han usado varios colorantes de triazina en biología, en su mayor parte para cromatografía de afinidad colorante-ligando o para visualizar células de colorante bajo el microscopio (p. ej. WO 2010/102114 y WO 2008/068879). Aunque el uso de un inductor puede incrementar la producción de proteínas, hay que tener en cuenta el inconveniente relacionado con la viabilidad de las células. De hecho, el uso de un inductor bien conocido, como el butirato sódico, puede ser contraproducente después de aproximadamente 5 días en cultivo, mientras que un período de producción típico es de  
35 12 a 15 días en modo de alimentación por lotes y puede ser de hasta 40-45 días en el modo de perfusión.

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

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

**Sumario de la invención.**

45 En un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que expresa dicha proteína en medio de cultivo celular, que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ .

50 En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo celular complementado con al menos una alimentación que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ .

En otro aspecto, la invención proporciona un método para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína

recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de dicha célula hospedadora en un medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina, o suplementado con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ .

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un medio de cultivo celular que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ .

En otro aspecto más, la invención proporciona el uso de un colorante de triazina en un medio de cultivo de células de mamífero para aumentar la producción de proteínas recombinantes.

## 10 Breve descripción de las figuras.

La figura 1 muestra la densidad de células viables (Guava®, figura 1A) y la viabilidad (Guava®, figura 1B) relacionadas con el tiempo (hasta el día 14), así como el título en el día 14 (Octet®, figura 1C) para las células hospedadoras que expresan anticuerpos mAb1 cultivados con diferentes concentraciones de Rojo Reactivo 120 en microplacas. Los resultados se muestran como valor promedio  $\pm$  desviación estándar. La misma leyenda para las figuras 1A y 1B.

- 15 La figura 2 muestra el análisis de calidad del anticuerpo segregado mAb1 a diferentes concentraciones de Rojo Reactivo 120 en microplaca. Los perfiles de glucosilación se analizan mediante el ensayo CGE-LIF. Gal = galactosilación; Man = manosilación; Fuc = fucosilación; Sial = sialilación; Ukn = desconocido).

- La figura 3 muestra la densidad de células viables (Guava®, figura 3A) y viabilidad (Guava®, figura 3B) relacionadas con el tiempo (hasta el día 14), así como el título al día 14 (Octet®, figura 1C) para las células hospedadoras que expresan el anticuerpo mAb1 a diferentes concentraciones de Rojo Reactivo 120 en microplacas. Los resultados se presentan como valores promedio  $\pm$  desviación estándar. La misma leyenda para las figuras 3A y 3B.

- La figura 4 muestra la densidad de células viables (ViCell®, figuras 4A y 4E), viabilidad (ViCell®, figuras 4B y 4F), el título (Biacored®, figuras 4C y 4G), la productividad específica (figuras 4D y 4H) en relación al tiempo (hasta el día 14) para las células hospedadoras que expresan el anticuerpo mAb1 (izquierda) y el anticuerpo mAb2 (derecha) cultivadas con distintas concentraciones de Rojo Reactivo 120 en Tubos Spin (valor promedio  $\pm$  desviación estándar). Una leyenda para las figuras 4A a 4D y una para las figuras 4E a 4H).

- La figura 5 muestra el perfil de glicosilación (CGE-LIF, figura 5A) así como relaciones de agregados y fragmentos (SE HPLC y electroforesis en gel capilar - SDS, figura 5B) para el anticuerpo mAb2 cuando las células hospedadoras se cultivan a diferentes concentraciones de Rojo Reactivo 120 en tubos Spin. Los resultados se presentan como valores promedio  $\pm$  desviación estándar Gal = galactosilación; Man = manosilación; Fuc = fucosilación; Sial = sialilación; Ukn = desconocido).

- La figura 6 muestra la densidad de células viables (Guava®, figura 6A) y la viabilidad (Guava®, figura 6B) en relación al tiempo (hasta el día 14), así como el título (Octet®, figura 6C) para las células hospedadoras que expresan el anticuerpo mAb1 cultivado a distintas concentraciones de Cibacron Blue 3GA en microplacas. Los resultados se muestran como valor promedio  $\pm$  desviación estándar. La misma leyenda para las figuras 6A y 6B.

La figura 7 muestra el análisis de calidad del anticuerpo mAb1 segregado a distintas concentraciones de Azul de Cibacron 3GA en microplaca. Los perfiles de glicosilación se analizan mediante el ensayo CGE-LIF.

- La figura 8 muestra la densidad de células viables (ViCell®, figuras 8A y 8E), la viabilidad (ViCell®, figuras 8B y 8F), el título (Biacore®, figuras 8C y 8G), la productividad específica (figuras 8D y 8H) en relación al tiempo (hasta el día 14) para las células hospedadoras que expresan el anticuerpo mAb1 (izquierda) y el anticuerpo mAb2 (derecha) cultivadas con distintas concentraciones de Cibacron Blue 3GA en Tubos Spin (valor promedio  $\pm$  desviación estándar). Una leyenda para las figuras 8A a 8D y una para las figuras 8E a 8H.

- La figura 9 muestra el perfil de glicosilación (CGE-LIF, figuras 9A y 9C) así como relaciones de agregados y fragmentos (SE HPLC y electroforesis en gel capilar - SDS, figuras 9B y 9D) para los anticuerpos mAb1 y mAb2 cuando las células hospedadoras se cultivan a distintas concentraciones de Azul de Cibacron 3GA en Tubos Spin. Los resultados se presentan como valor promedio  $\pm$  desviación estándar. Gal = galactosilación; Man = manosilación; Fuc = fucosilación; Sial = sialilación; Ukn = desconocido).

En las figuras 1 - 9:  $\mu\text{M}$  y  $\mu\text{M}$  significan ambos micromolar.

## Descripción detallada de la invención.

- 50 Las publicaciones y solicitudes que se discuten en el presente texto se presentan meramente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En esta solicitud no ha de considerarse nada de ella como la admisión de que la presente invención no está facultada para anticiparse a tal publicación en virtud de invención previa. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se consideran limitantes.

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

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

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

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

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

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

- 35 La expresión "cultivo alimentado por lotes" se refiere a un método de cultivo de células en el que hay un bolo o un suplemento de medios de alimentación continua para reponer los nutrientes que se consumen. Esta técnica de cultivo de células tiene el potencial de obtener altas densidades celulares del orden de más de  $10 \times 10^6$  a  $30 \times 10^6$  células/mL, dependiendo de la formulación del medio, la línea celular y otras condiciones de crecimiento celular. Una condición de cultivo bifásico puede ser creada y sostenida por diversas estrategias de alimentación y formulaciones de medios.

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

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

condición de cultivo de control.

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

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

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

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

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

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

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

El término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región marco humana y una o más CDRs de una inmunoglobulina no humana (normalmente un ratón o una rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDRs se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor" (humanización injertando CDRs no humanas en el marco humano y regiones constantes, o mediante la incorporación de dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas (quimerización). Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero, si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente aproximadamente 95% o más, idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDRs y algunos restos en la región constante de la cadena pesada si se necesita la modulación de las funciones efectoras, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Mediante anticuerpos humanizantes, la vida mitad biológica puede aumentar, y se reduce el potencial de reacciones inmunes adversas tras la administración a seres humanos.

Como se usa en la especificación y en las reivindicaciones, la expresión inmunoglobulina "completamente humana" se refiere a una inmunoglobulina que comprende tanto una región marco humana como CDRs humanas. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero, si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente aproximadamente el 95%, o más, idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina completamente humana, excepto posiblemente algunos residuos en la región constante de la cadena pesada si se necesita la modulación de las funciones efectoras o propiedades farmacocinéticas, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. En algunos casos, pueden introducirse mutaciones de aminoácidos dentro de las CDRs, las regiones marco o la región constante, para mejorar la afinidad de unión y/o reducir la inmunogenicidad y/o mejorar las propiedades bioquímicas / biofísicas del anticuerpo.

La expresión "anticuerpos recombinantes" significa anticuerpos producidos mediante técnicas recombinantes. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden ser rediseñados

para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y van desde el cambio de solamente un aminoácido, o unos pocos aminoácidos, hasta el rediseño completo de, por ejemplo, el dominio variable o la región constante. En general, se realizarán cambios en la región constante para mejorar, reducir o alterar características, como la fijación del complemento (por ejemplo, citotoxicidad dependiente del complemento, CDC), la interacción con los receptores Fc y otras funciones efectoras (por ejemplo, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, ADCC), propiedades farmacocinéticas (p. ej. unión al receptor Fc neonatal; FcRn). Se realizarán cambios en el dominio variable para mejorar las características de unión al antígeno. Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en otras diversas formas que incluyen, por ejemplo, cadena simple o Fv, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multispecíficos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de anticuerpo" se refiere a un fragmento de una cadena o anticuerpo intacto o de longitud completa, normalmente la región de unión o variable. Dichas porciones o fragmentos deben mantener al menos una actividad de la cadena/anticuerpo intacta, es decir, hay "porciones funcionales" o "fragmentos funcionales". Si mantienen al menos una actividad, preferiblemente mantienen la propiedad de unión con la diana. Los ejemplos de porciones de anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) incluyen, pero no se limitan a ellos, "Fv de cadena sencilla", "anticuerpos de cadena sencilla", "Fv" o "scFv". Estos términos se refieren a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios variables de ambas cadenas, pesada y ligera, pero carecen de las regiones constantes, todo dentro de una sola cadena de polipéptidos. Generalmente, un anticuerpo de cadena sencilla comprende además un conector de polipéptido entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. En realizaciones específicas, los anticuerpos de cadena sencilla pueden también ser biespecíficos y/o humanizados.

Un "fragmento Fab" se compone de una cadena ligera y los dominios variable y CH1 de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab'" que contiene una cadena ligera y una cadena pesada y contiene más de la región constante, entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas, se denomina molécula F(ab')<sub>2</sub>. Un "F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.

Habiendo definido algunos términos importantes, es ahora posible centrar la atención en realizaciones particulares de la presente invención.

Los ejemplos de anticuerpos conocidos que se pueden producir de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a ellos, adalimumab, alemtuzumab, belimumab, bevacizumab, canakinumab, certolizumab, pegol, cetuximab, denosumab, eculizumab, golimumab, infliximab, natalizumab, ofatumumab, ofatumumab, ofatumumab, ofatumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, siltuximab, tocilizumab, trastuzumab, ustekinumab o vedolizomab.

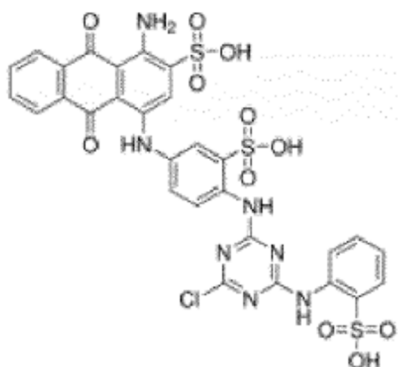
Se entiende que el término "sujeto" incluye (pero sin limitarse a los mismos) mamíferos tales como seres humanos, perros, vacas, caballos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos o ratas. Más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Las expresiones "agente inductor", "inductor" o "potenciador de la productividad" se refieren a un compuesto que permite un aumento de la producción de proteína cuando se agrega a cultivos celulares. Por ejemplo, uno de los inductores conocidos para la producción de *E. coli* es IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) y los inductores para la producción de CHO son, entre otros, butirato sódico, doxiciclina o dexametasona.

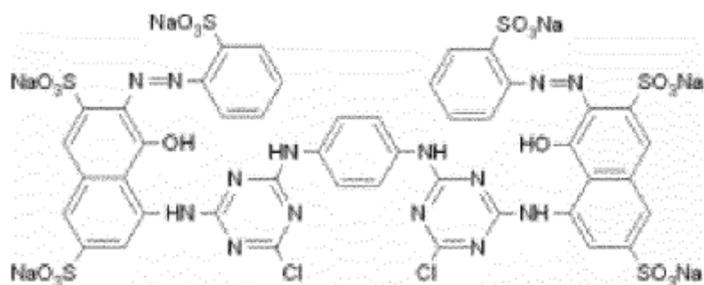
La presente invención proporciona métodos y composiciones para aumentar la producción de una proteína recombinante mientras se mantiene una alta densidad celular y se evita una disminución sustancial de la viabilidad celular a lo largo de un período de producción. La presente invención se basa en la optimización de las condiciones de cultivo de células para la fabricación de proteínas, como la producción de anticuerpos o fragmentos de unión a un antígeno, lo que tiene como resultado una mayor producción de una proteína recombinante mientras se mantiene una alta densidad celular y se evita una disminución sustancial de la viabilidad celular durante un período de producción.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que, en condiciones de cultivo de células que contienen o suplementan con un colorante de triazina, la producción de una proteína recombinante puede incrementarse (es decir, aumentan el título y/o la productividad específica), la densidad celular también aumenta o al menos se mantiene, y se evita una disminución sustancial o significativa de la viabilidad celular durante un período de producción. Por lo tanto, durante el ciclo de producción del cultivo de células, cuando es deseable aumentar el título de la proteína recombinante que se produce, el cultivo de células puede complementarse con un colorante de triazina tal como Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10. Alternativamente el medio de cultivo de células ya puede comprender dicho colorante de triazina.

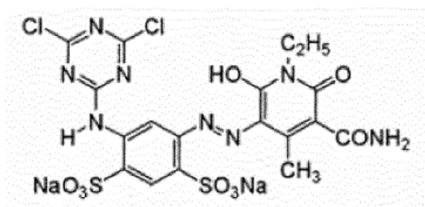
Azul de Cibacron 3GA:



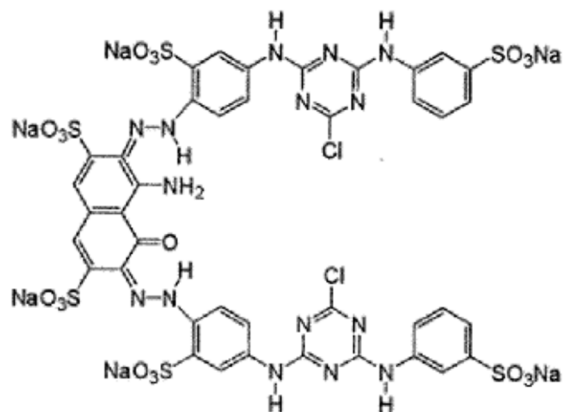
Rojo Reactivo 120:



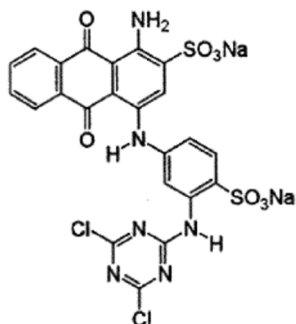
Amarillo Reactivo 86:



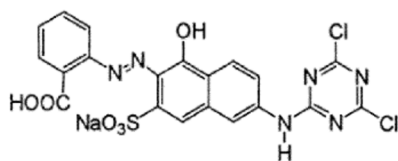
Verde Reactivo 19:



Azul Reactivo 4:



Marrón Reactivo 10:



5 En un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo de células que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementada con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo de 1  $\mu\text{M}$  a 90  $\mu\text{M}$ . El colorante de triazina se elige preferiblemente entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10. En otras realizaciones preferidas, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

15 Alternativamente, la invención proporciona un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo de células complementado con al menos una alimentación que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ . El colorante de triazina se elige preferiblemente entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10. En algunas realizaciones preferidas, el colorante de triazina es Azul de Cibacron 3GA o Rojo Reactivo 120. En algunas realizaciones preferidas, las células hospedadoras de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO).

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar dicha célula hospedadora en un medio de cultivo de células que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ . El colorante de triazina se selecciona preferiblemente entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10. En algunas realizaciones preferidas, el colorante de triazina es Azul de Cibacron 3GA o Rojo Reactivo 120. En otras realizaciones preferidas, la célula hospedadora de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

35 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un medio de cultivo de células de mamífero que comprende una cantidad efectiva de colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo entre 1  $\mu\text{M}$  y 90  $\mu\text{M}$ . El colorante de triazina se selecciona preferiblemente entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10. En algunas realizaciones preferidas, el colorante de triazina es Azul de Cibacron 3GA o Rojo Reactivo 120.

40 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un colorante de triazina en un medio de cultivo de células de mamífero para aumentar la producción de proteínas recombinantes. El colorante de triazina se selecciona preferiblemente entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10. En algunas realizaciones preferidas, el colorante de triazina es Azul de Cibacron 3GA o Rojo Reactivo 120.

En el contexto de la invención en su conjunto, una cantidad efectiva de colorante de triazina, tal como Azul de Cibacron

3GA o Rojo Reactivo 120, es la cantidad de un colorante de triazina presente en un medio de cultivo de células al comienzo del cultivo o que se agrega a un cultivo de células (o un medio de cultivo de células), como suplemento o como alimentación, que aumentará la expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras, y posiblemente también aumentará la densidad celular en una cantidad detectable en comparación con las células cultivadas sin colorante de triazina o cualquier otro inductor. El colorante de triazina, tal como Azul de Cibacron 3GA o Rojo Reactivo 120, está presente preferiblemente en un medio de cultivo de células al comienzo del cultivo o agregado a un cultivo de células (o un medio de cultivo de células), como suplemento o como alimentación, a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  a 90  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, la concentración de colorante de triazina puede ser de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 35  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 85  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$  (concentración de colorante de triazina una vez en el medio de cultivo en el sistema de cultivo). Por ejemplo, pero no a título de limitación, ajustando la concentración de un colorante de triazina puede modularse la producción de proteína recombinante segregada (es decir, aumentada).

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

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

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

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

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

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

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

aproximadamente 29 °C a aproximadamente 37 °C. Los cultivos de células de mamífero se pueden mantener en la fase de producción durante días o incluso semanas antes de la recolección.

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

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

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se ha de entender que la invención incluye todas esas variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. La invención incluye también todas las etapas, características, composiciones y compuestos citados o indicados en la presente memoria, individualmente o colectivamente, y cualquiera o todas las combinaciones de dos o más de dichas etapas o características. La presente descripción se ha de considerar por tanto como ilustrada y no restrictiva en todos los aspectos, estando indicado el alcance de la invención por las reivindicaciones anexas, y se entiende que todos los cambios que entran dentro del significado y rango de equivalencia abarcan la misma.

La descripción precedente se entenderá mejor con referencia a los ejemplos que siguen. Sin embargo, tales ejemplos ejemplifican métodos para llevar a la práctica la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

### Ejemplos.

#### 30 Materiales y métodos.

##### I. Células, expansión celular y crecimiento celular.

##### 1) Células.

Los ensayos se realizaron con 2 líneas de células CHO:

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

##### 40 2) Expansión celular.

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

##### 3) Inoculación.

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

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

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

## II. Métodos analíticos.

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

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

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

## Resultados y discusiones.

### Ejemplo 1: Rojo Reactivo 120.

- 10 La actividad del Rojo Reactivo 120 se ensayó en células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb1 y en tubos Spin en células hospedadoras que expresan anticuerpos mAb1 o mAb2.

- 15 Las células hospedadoras que expresan mAb1 se cultivaron primero en presencia de aproximadamente 0,4  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 17  $\mu\text{M}$  de Rojo Reactivo 120 en microplacas. La densidad celular, la viabilidad celular y el título se midieron durante el cultivo (figuras 1A-1C). A estas concentraciones, el Rojo Reactivo 120 incrementó de manera significativa la densidad y el título de células viables, mientras que la viabilidad de las células se vio reducida (ligeramente). Concretamente, a 17,3  $\mu\text{M}$  la densidad de células viables aumentó en un factor de 1,5 el día 7 y el título aumentó en un factor de 1,3 el día 14. La viabilidad fue similar a la del control hasta el día 10, y disminuyó ligeramente en comparación con el control al fin del proceso de producción.

- 20 También es interesante mencionar que el Rojo Reactivo 120 no tiene ninguna influencia sobre la glicosilación del anticuerpo mAb1 a las concentraciones ensayadas (figura 2). Este es un aspecto importante ya que por ejemplo el Rojo Reactivo 120 puede añadirse al medio de cultivo al final del proceso de cultivo con el fin de aumentar el crecimiento y el título de las células, sin modificar la calidad de la proteína recombinante segregada.

A la concentración de aproximadamente 17  $\mu\text{M}$ , la densidad celular y el título estaban al máximo y el límite de toxicidad del Rojo Reactivo 120 no parecía haberse alcanzado. Esto sugiere que el aumento de la concentración de Rojo Reactivo 120 puede usarse para obtener incluso mejores resultados.

- 25 De acuerdo con otros ensayos en microplacas en células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb1 con Rojo Reactivo 120 a concentraciones que se encuentran en el intervalo de aproximadamente 83  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 833  $\mu\text{M}$ , se encontró que tanto la densidad de células viables como la viabilidad celular disminuyeron de forma significativa, mientras que el título se mostró superior o igual al que se obtuvo con las células de control (figura 3A-3C). Con estas concentraciones, el título máximo se obtuvo con la concentración de Rojo Reactivo 120 de 83  $\mu\text{M}$ , que es 1,2 veces mayor que el que se obtuvo con las células de control. Por encima de 83  $\mu\text{M}$  de concentración, el Rojo Reactivo 120 se vuelve tóxico, el título disminuyó y la calidad de la proteína recombinante se vio afectada. Esto sugiere que la concentración de Rojo Reactivo 120 no debe ser superior a aproximadamente 83  $\mu\text{M}$ .

- 35 Para confirmar los resultados obtenidos con células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb1 en microplacas y confirmar la reproducibilidad de estos resultados con otras células hospedadoras que expresan un anticuerpo diferente (mAb2), se añadió Rojo Reactivo 120 en medio de cultivo en Tubos Spin a concentraciones de aproximadamente 4,3 y/o aproximadamente 8,5  $\mu\text{M}$ . Los resultados de los ensayos obtenidos en el cultivo o en el compuesto se presentan en la figura 4 (figuras 4A-4D para mAb1 y 4E-4H para mAb2). Los datos confirmaron los resultados previos obtenidos con las células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb1 en microplacas. Concretamente, la densidad de las células viables (véanse por ejemplo los días 5-9) y la viabilidad celular está solo ligeramente afectada después del día 10 en comparación con el control. También el título aumentó en el factor 1,2 a una concentración de 8,6  $\mu\text{M}$  de Rojo Reactivo 120. Resultados similares se observan para mAb2: el Rojo Reactivo 120 permitió el aumento del título y la productividad específica de las células hospedadoras que expresan los anticuerpos mAb2. La viabilidad se mantuvo, en comparación con el control, hasta el final del cultivo. El perfil de glicosilación de los anticuerpos mAb1 y mAb2 no varió (véase la figura 5A, datos mostrados para mAb2 solamente). Es interesante señalar que el porcentaje de fragmentos y agregados disminuyó ligeramente (véase también la figura 5B, datos mostrados para mAb2 solamente).

### Ejemplo 2: Azul de Cibacron 3GA.

Como el Rojo Reactivo 120, el Azul de Cibacron 3GA tuvo un interesante efecto sobre el título. Además de los ensayos en microplacas en las células hospedadoras que expresan mAb1, se evaluó la eficacia del Azul de Cibacron 3GA en las células hospedadoras que expresan anticuerpos mAb1 o mAb2 en Tubos Spin.

- 50 Las células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb1 se cultivaron en microplacas con diferentes concentraciones de Azul de Cibacron 3GA (0,4  $\mu\text{M}$  - 416,7  $\mu\text{M}$ ) en el medio de cultivo. La densidad celular, la viabilidad de las células y el título se presentan en las figuras 6A-6C. Hasta concentraciones que están en el intervalo de 25  $\mu\text{M}$  y 41,7  $\mu\text{M}$ , la densidad de células viables, la densidad de células viables y el título aumentaron significativamente. Concretamente, la cantidad de proteína recombinante segregada alcanzó 1,5 veces en comparación con el control a concentración de

aproximadamente 8,3 a aproximadamente 41,7  $\mu\text{M}$ . A una concentración de aproximadamente 83  $\mu\text{M}$  el título aumentó aún de forma significativa. Sin embargo, si se añadía Azul de Cibacron 3GA al medio de cultivo en concentraciones mucho más elevadas, tales como aproximadamente 167  $\mu\text{M}$  o aproximadamente 417  $\mu\text{M}$ , la viabilidad celular descendía y se observaba el efecto sobre el título. La calidad de la proteína recombinante segregada no se vio afectada (ningún efecto profundo sobre el perfil de glicosilación). Así pues, el Azul de Cibacron 3GA pudo aumentar el título en el factor de 1,5 sin modificar significativamente el perfil de glicosilación de la proteína recombinante segregada (véase la figura 7).

La eficacia del Azul de Cibacron 3GA se evaluó también en las células hospedadoras que expresan anticuerpos mAb1 o mAb2 en tubos Spin. La concentración elegida de Azul de Cibacron 3GA fue 8,5  $\mu\text{M}$  porque permitía un importante incremento de título y anticuerpo de mAb1 en microplacas. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 8 (figuras 8A-8D para mAb1 y 8E-8H para mAb2). Para las células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb1 la densidad máxima de las células viables aumentó los días 6-9. La productividad específica se vio también incrementada de una manera significativa. La combinación de estos dos factores permitió incrementar el título al final del cultivo con un factor de 1,25. Por otra parte, los resultados observados revelaron una disminución de la viabilidad a partir del día 7, en comparación con el control. Esta disminución es aún aceptable. El Azul de Cibacron 3GA fue también probado a concentraciones similares en las células hospedadoras que expresan anticuerpo mAb2. Como se observa para las células hospedadoras que expresan mAb1 la productividad de los anticuerpos mAb2 aumentó y el título se multiplicó por 1,2 al final del cultivo celular. La calidad de los anticuerpos ensayados mAb1 y mAb2 no se ve afectada en presencia de Azul de Cibacron 3GA (véanse las figuras 9A y 9C). Es interesante señalar que el porcentaje de fragmentos y agregados disminuyó ligeramente (véanse las figuras 9B y 9D).

Conclusión general:

Los colorantes de triazina tales como Rojo Reactivo 120 y Azul de Cibacron 3GA son por tanto compuestos muy prometedores para aumentar la cantidad de la proteína recombinante producida, sin modificar el perfil de glicosilación de la proteína o tener un impacto negativo sobre la viabilidad celular. Por tanto, los colorantes de triazina podrían usarse como inductores, sin el inconveniente de la viabilidad celular observado con butirato sódico en la bibliografía.

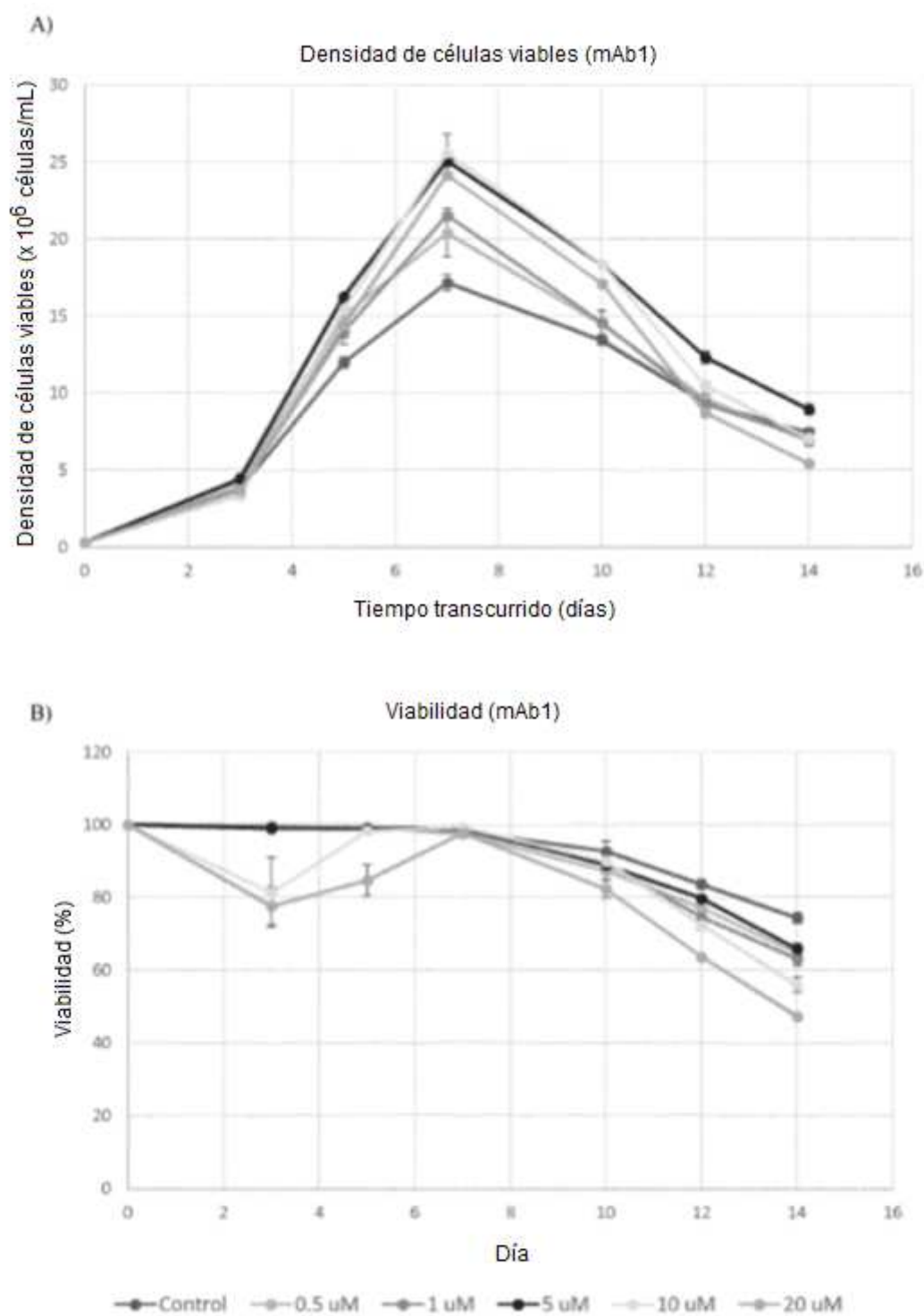
Un experto en la técnica comprenderá a partir de los resultados de los ejemplos 1 y 2 que puede usar un colorante de triazina para modular el perfil de producción de cualquier anticuerpo y cualquier proteína, sea cual sea la línea celular que se use para la producción. La concentración óptima de colorante de triazina a añadir en el medio de cultivo de las células deberá determinarse caso por caso. Esta determinación puede hacerse sin involucrar ninguna experiencia inventiva, basándose en las enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica también comprenderán que pueden usar un colorante de triazina en cualquier método para producir una proteína tal como un anticuerpo, incluso si no tiene como objetivo alcanzar un perfil de producción particular, sino simplemente aumentar la productividad celular y obtener ciclos de producción más eficientes, mientras se mantiene una viabilidad celular aceptable durante un tiempo más prolongado.

## Referencias.

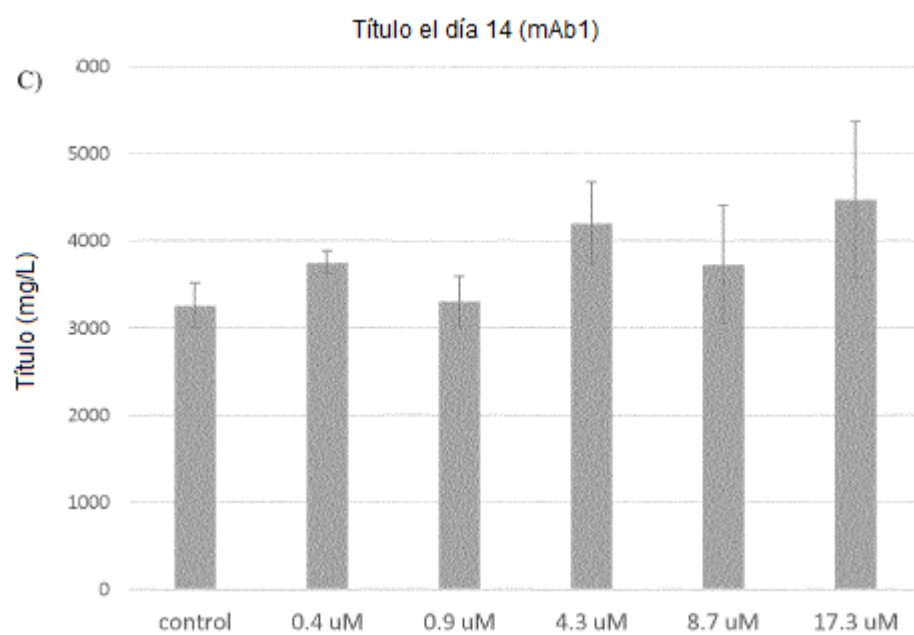
- 1) Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, Sadettin Ozturk, Wei-Shou Hu, ed., CRC Press (2005)
- 2) Kim et al., 2004, Biotechnol. Prog., 20:1788-1796
- 3) Voisard et al., 2003, Biotechnol. Bioeng. 82:751-765
- 4) Ausubel et al., 1988 and updates, Current Protocols in Molecular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

## REIVINDICACIONES

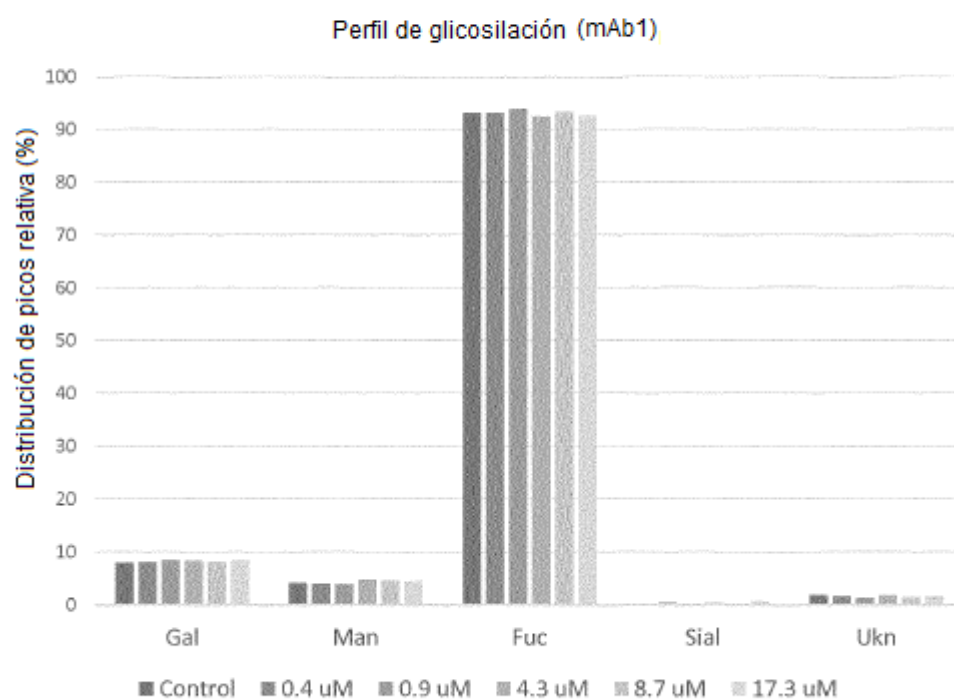
1. Un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo de células que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo de 1  $\mu$ m a 90  $\mu$ M.  
5
2. Un método para aumentar la producción de una proteína recombinante, comprendiendo dicho método cultivar una célula hospedadora que expresa dicha proteína en un medio de cultivo de células complementado con al menos una alimentación que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo de 1  $\mu$ m a 90  $\mu$ M.  
10
3. Un método para cultivar una célula hospedadora que expresa una proteína recombinante, comprendiendo dicho método el cultivo de dicha célula hospedadora en un medio de cultivo de células que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de colorante de triazina, en donde la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo de 1  $\mu$ m a 90  $\mu$ M.  
15
4. El método según las reivindicaciones 1 o 3, en donde dicho colorante de triazina se selecciona entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho colorante de triazina es Azul de Cibacron 3GA o Rojo Reactivo 120.  
20
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células hospedadoras de mamífero son células de ovario de hámster chino (CHO).
7. Una composición que comprende un medio de cultivo de células de mamífero que comprende una cantidad efectiva de un colorante de triazina o suplementado con una cantidad efectiva de un colorante de triazina, en donde la cantidad efectiva de colorante de triazina se encuentra en el intervalo de 1  $\mu$ m a 90  $\mu$ M.  
25
8. La composición según la reivindicación 7, en donde dicho colorante de triazina se selecciona entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, en donde la proteína recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un anticuerpo humano o una porción de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado o una porción de unión al antígeno del mismo, un anticuerpo quimérico o una porción de unión al antígeno del mismo, una proteína de fusión recombinante, un factor de crecimiento, una hormona o una citocina.  
30  
35
10. Uso de un colorante de triazina en un medio de cultivo de células de mamífero para aumentar la producción de proteínas recombinantes.
11. Uso de un colorante de triazina como inductor de la expresión de proteínas en un cultivo de células de mamífero.
12. El uso según las reivindicaciones 10 o 11, en donde dicho colorante de triazina se selecciona entre el grupo que comprende Azul de Cibacron 3GA, Rojo Reactivo 120, Amarillo Reactivo 86, Verde Reactivo 19, Azul Reactivo 4, Marrón Reactivo 10.  
40



**Figura 1**



**Figura 1 (continuación)**



**Figura 2**

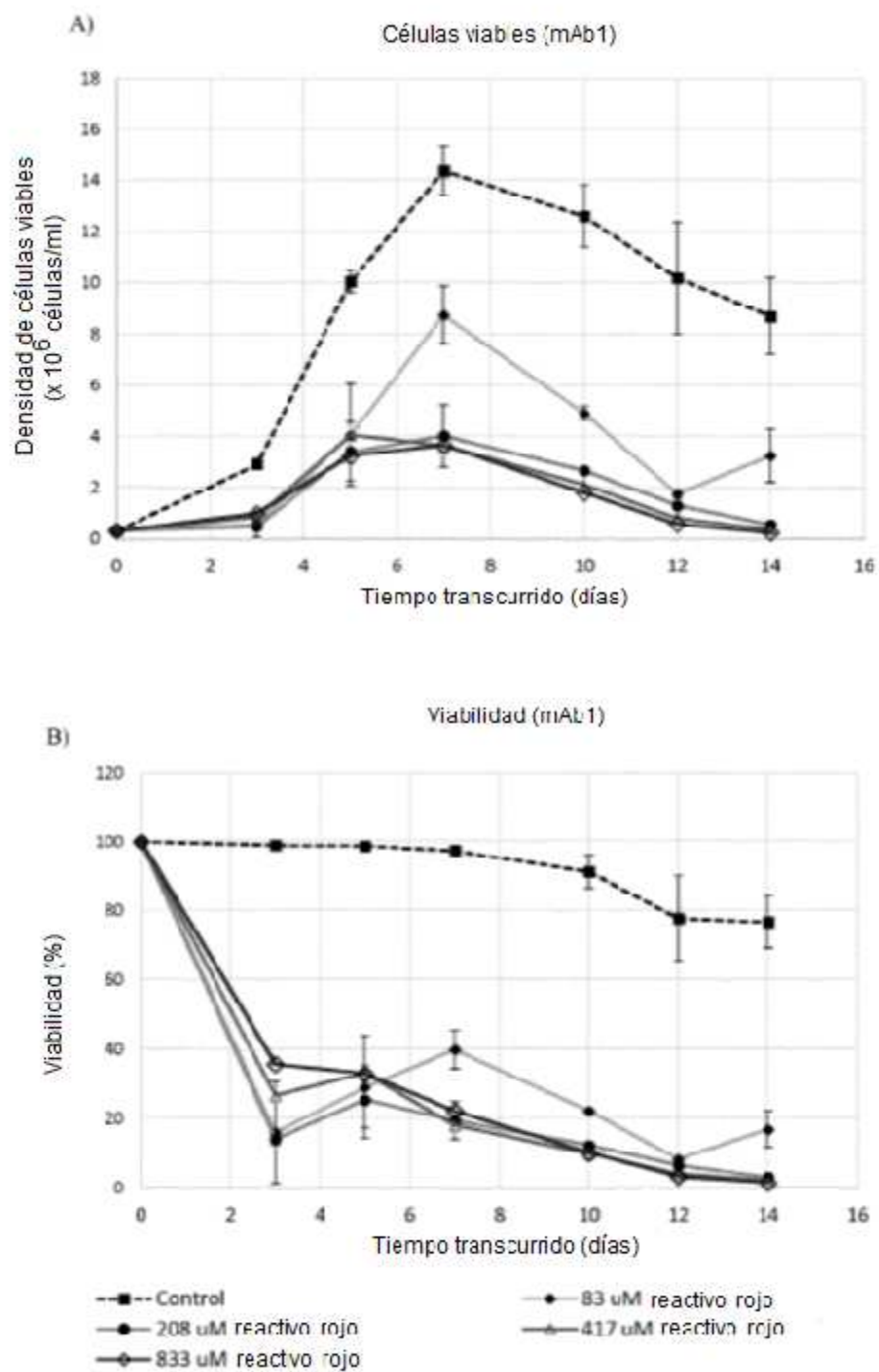
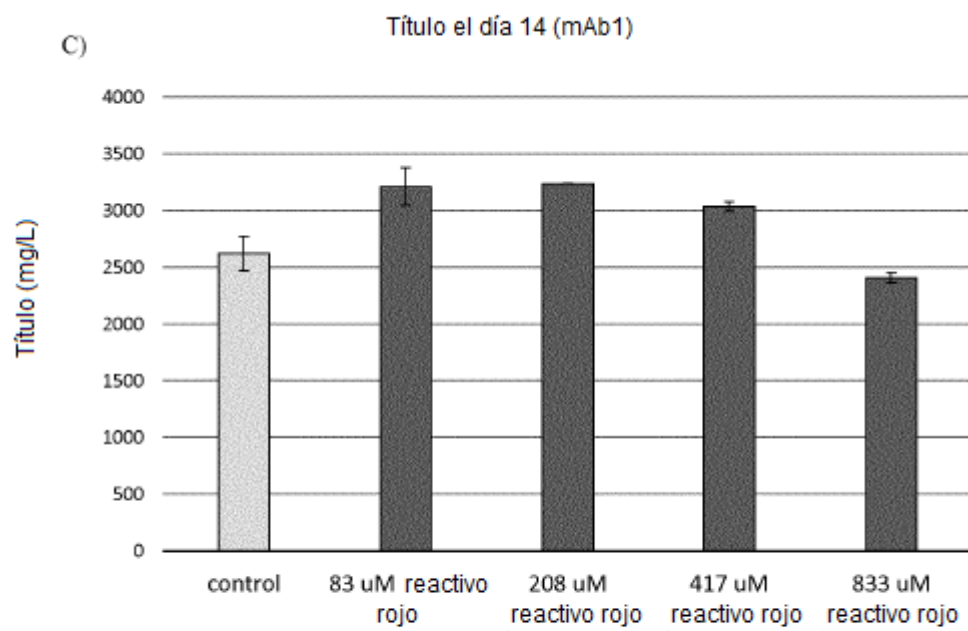


Figura 3



**Figura 3 (continuación)**

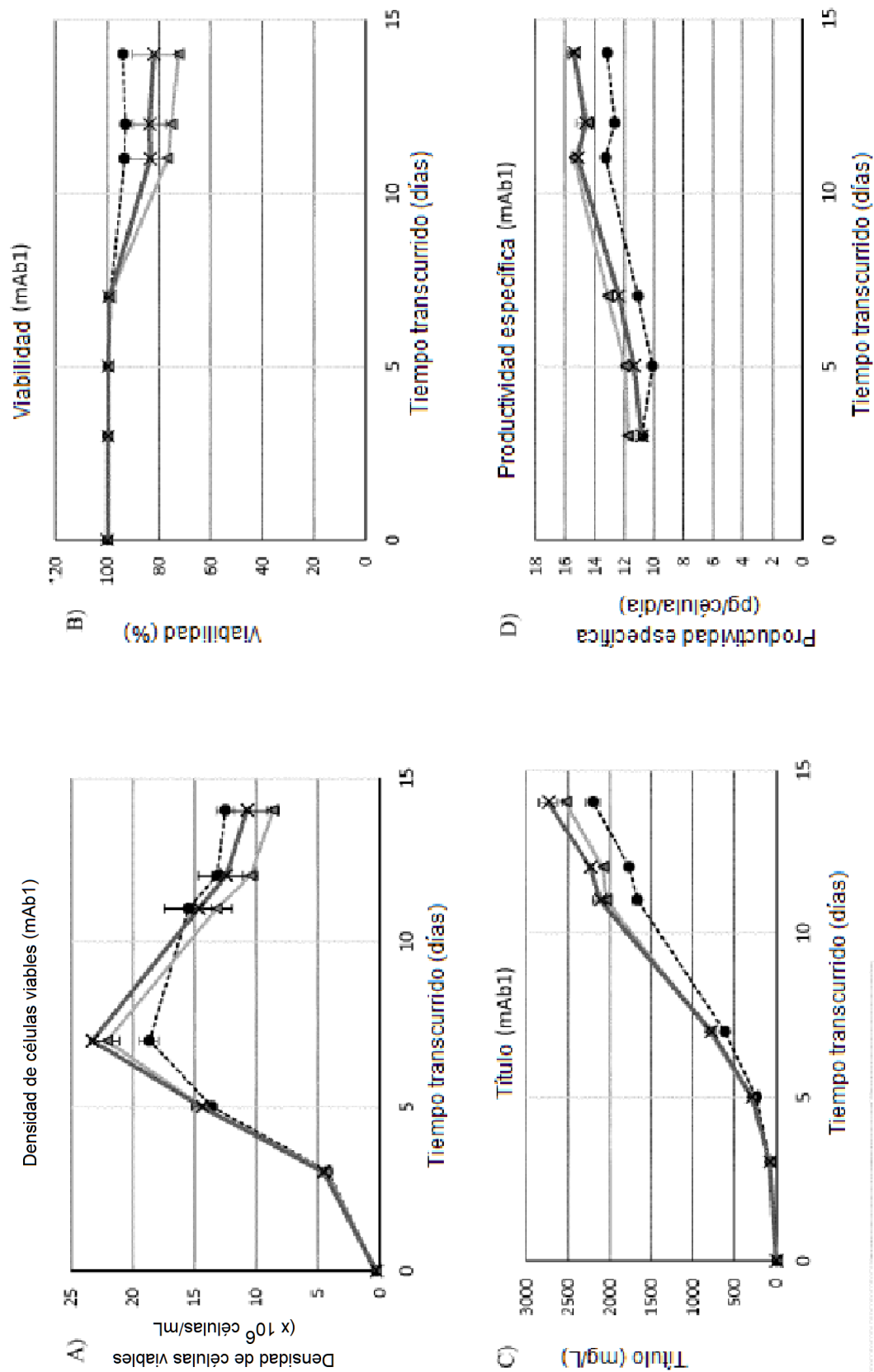


Figura 4

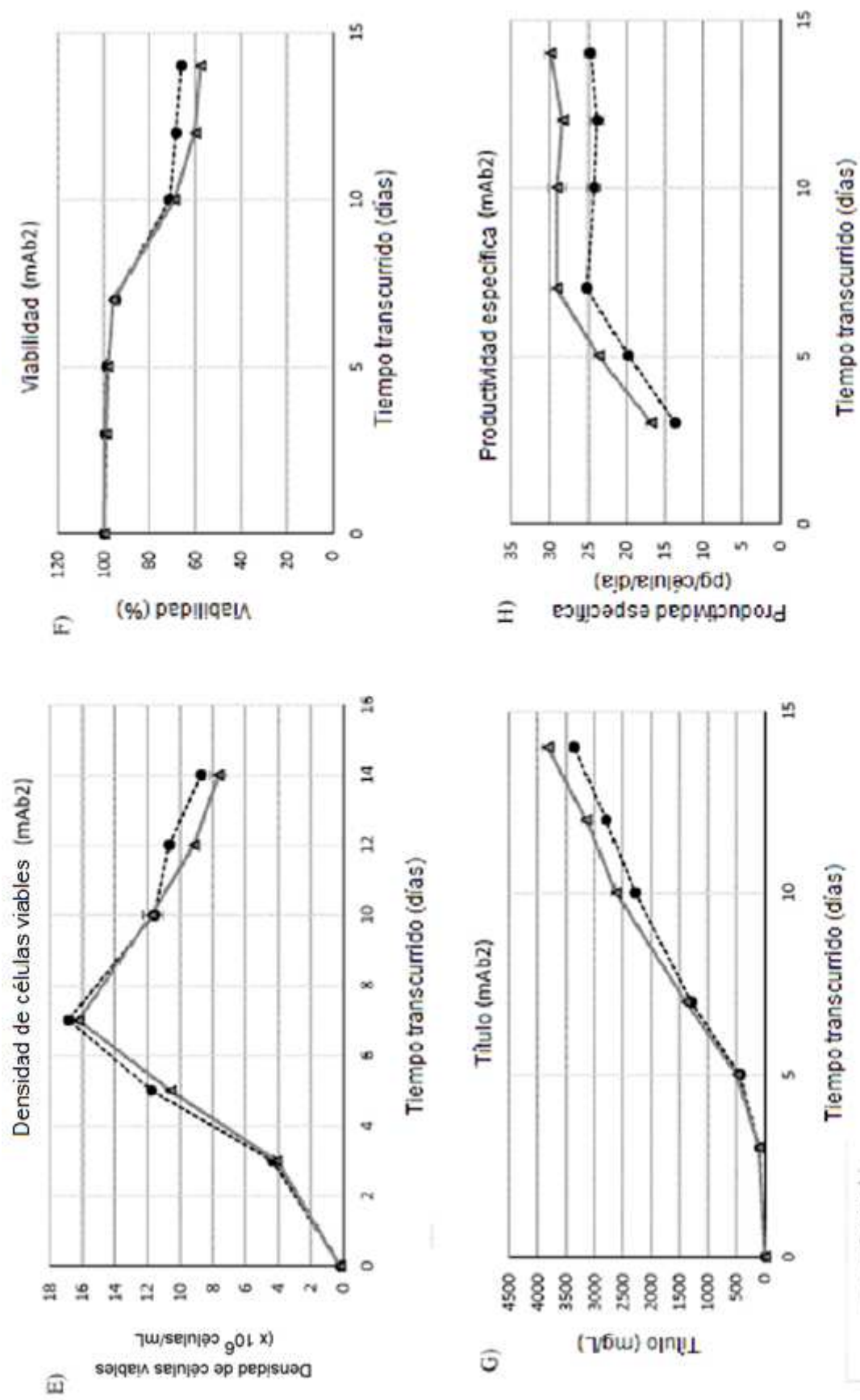
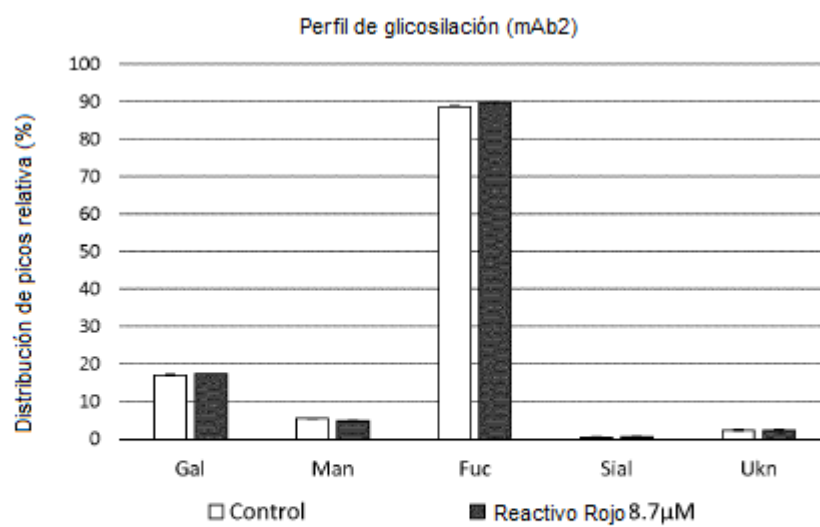
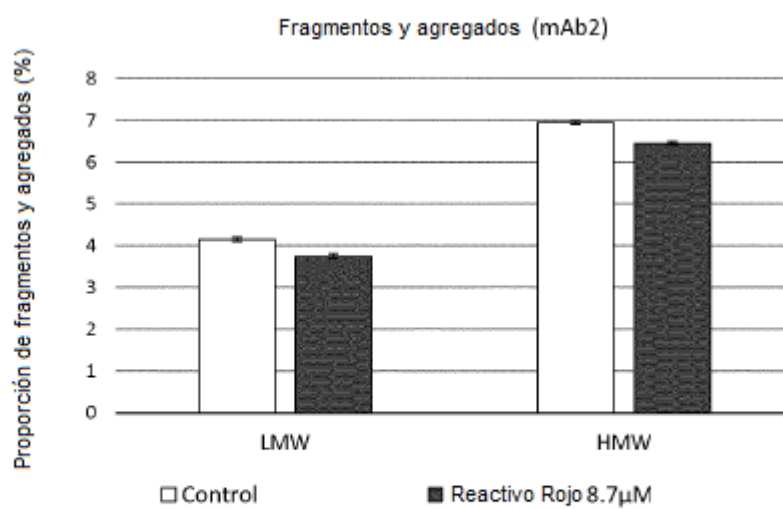


Figura 4 (continuación)

A)



B)



**Figura 5**

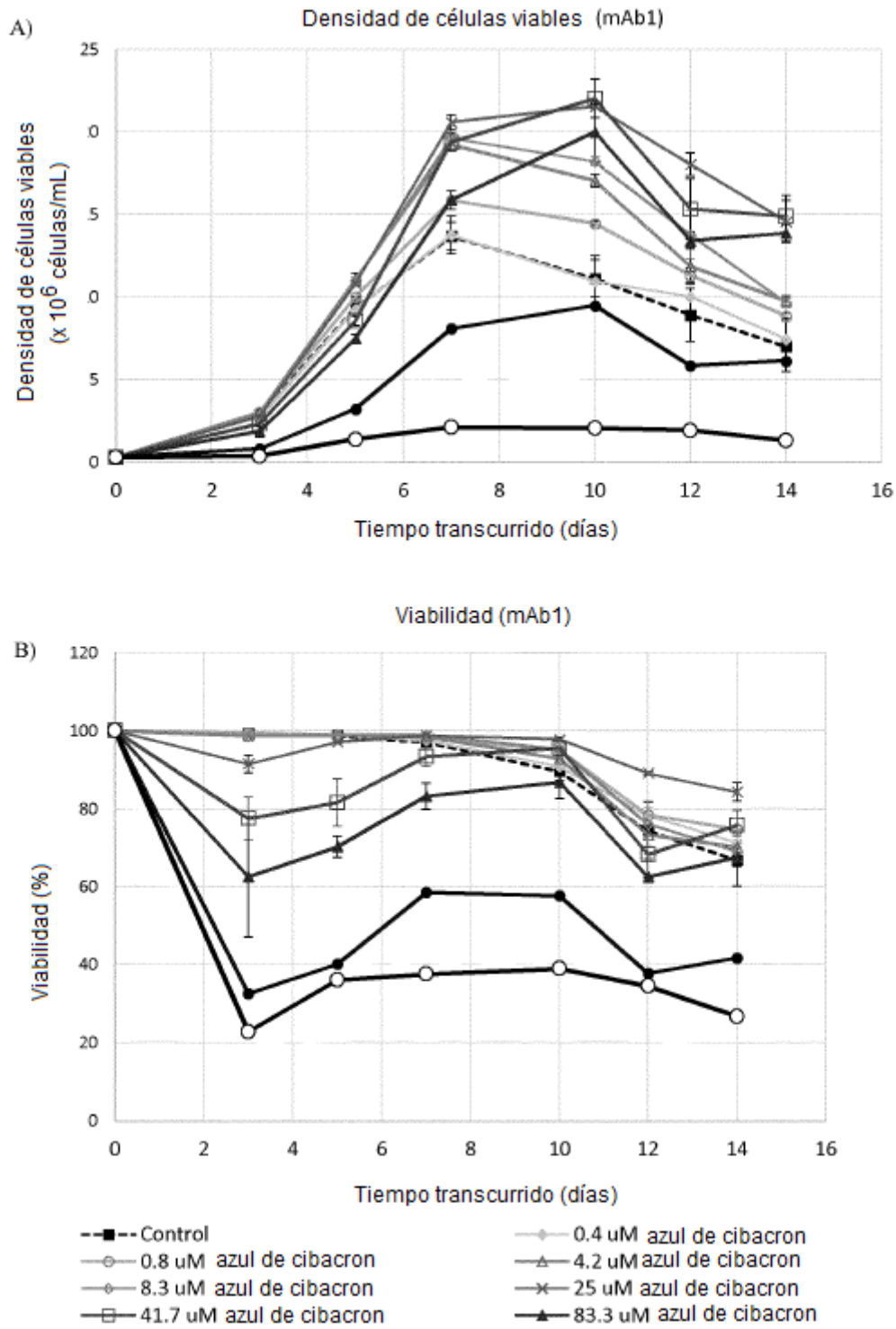
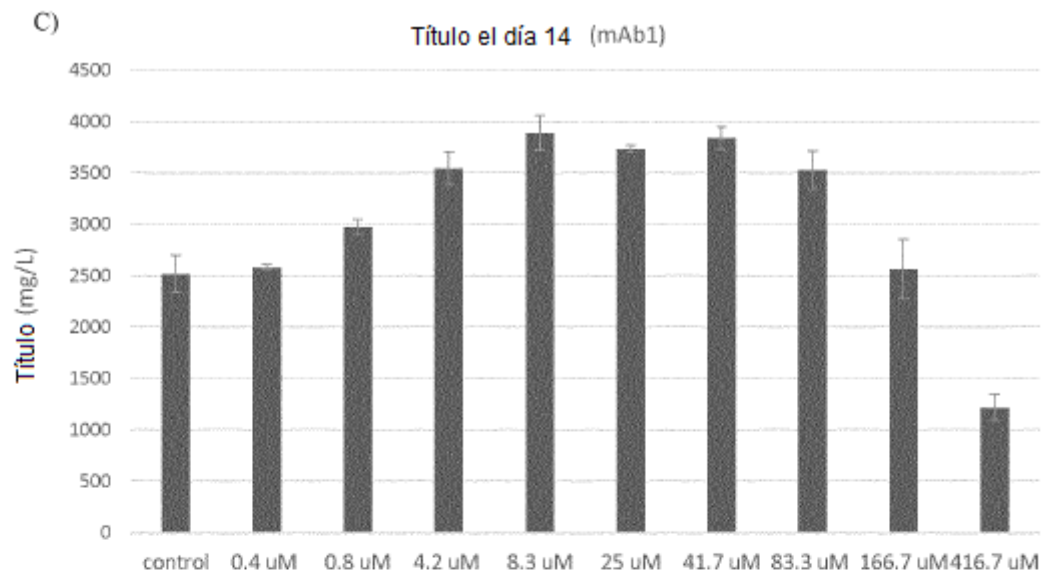
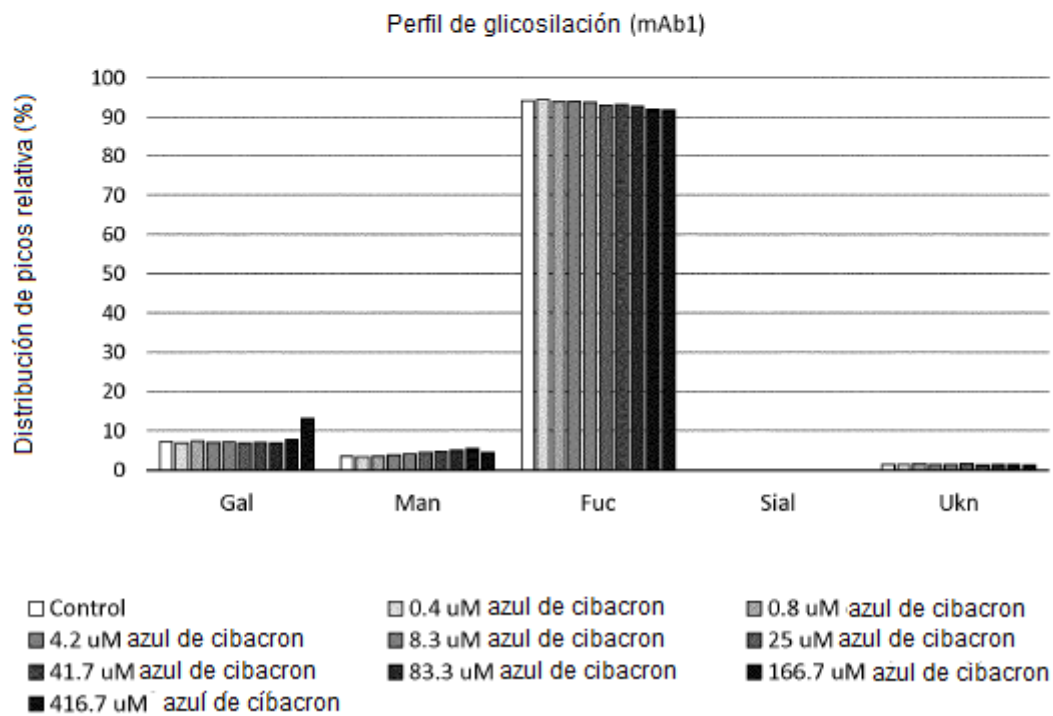


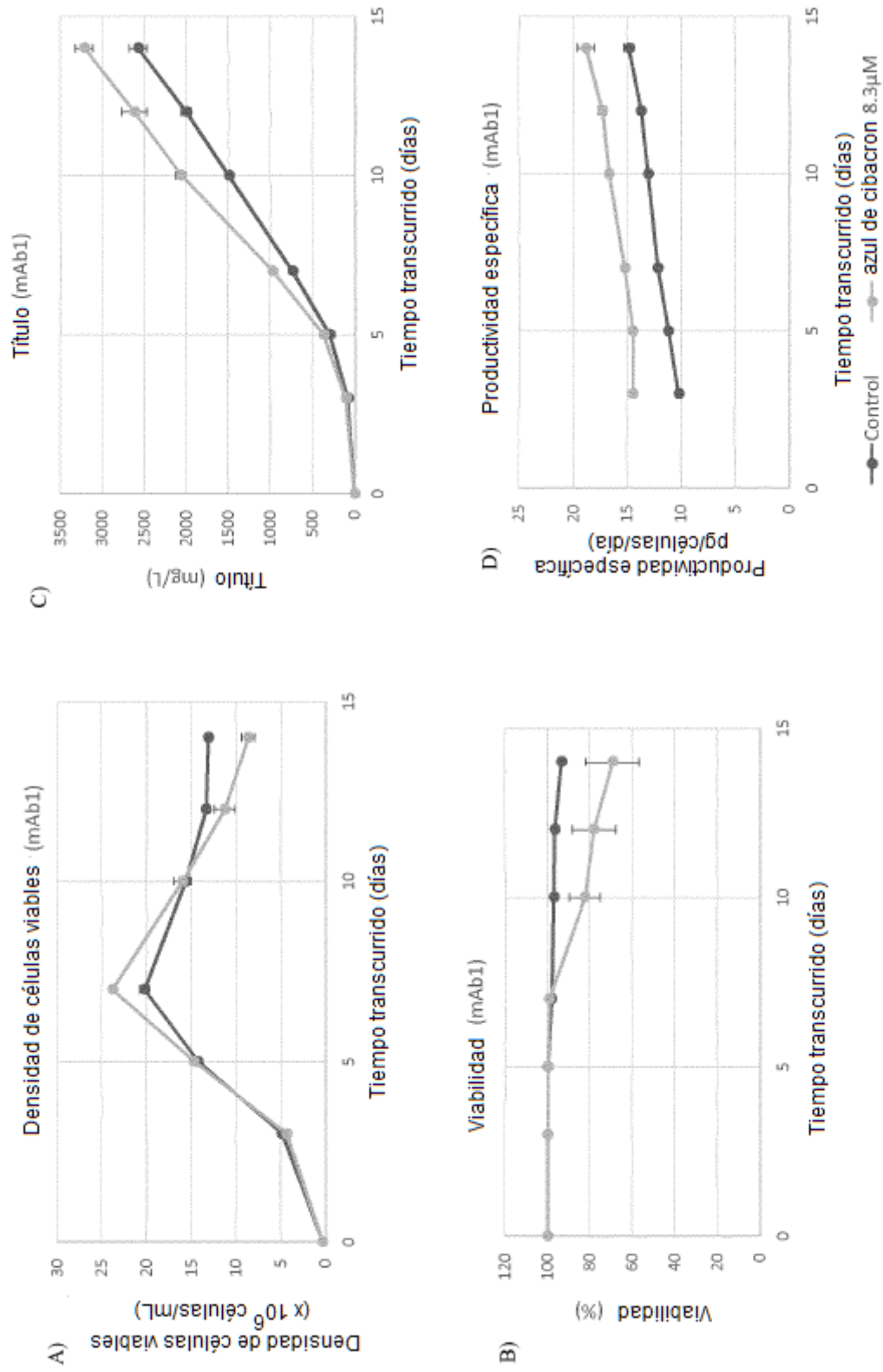
Figura 6



**Figura 6 (continuación)**



**Figura 7**



**Figura 8**

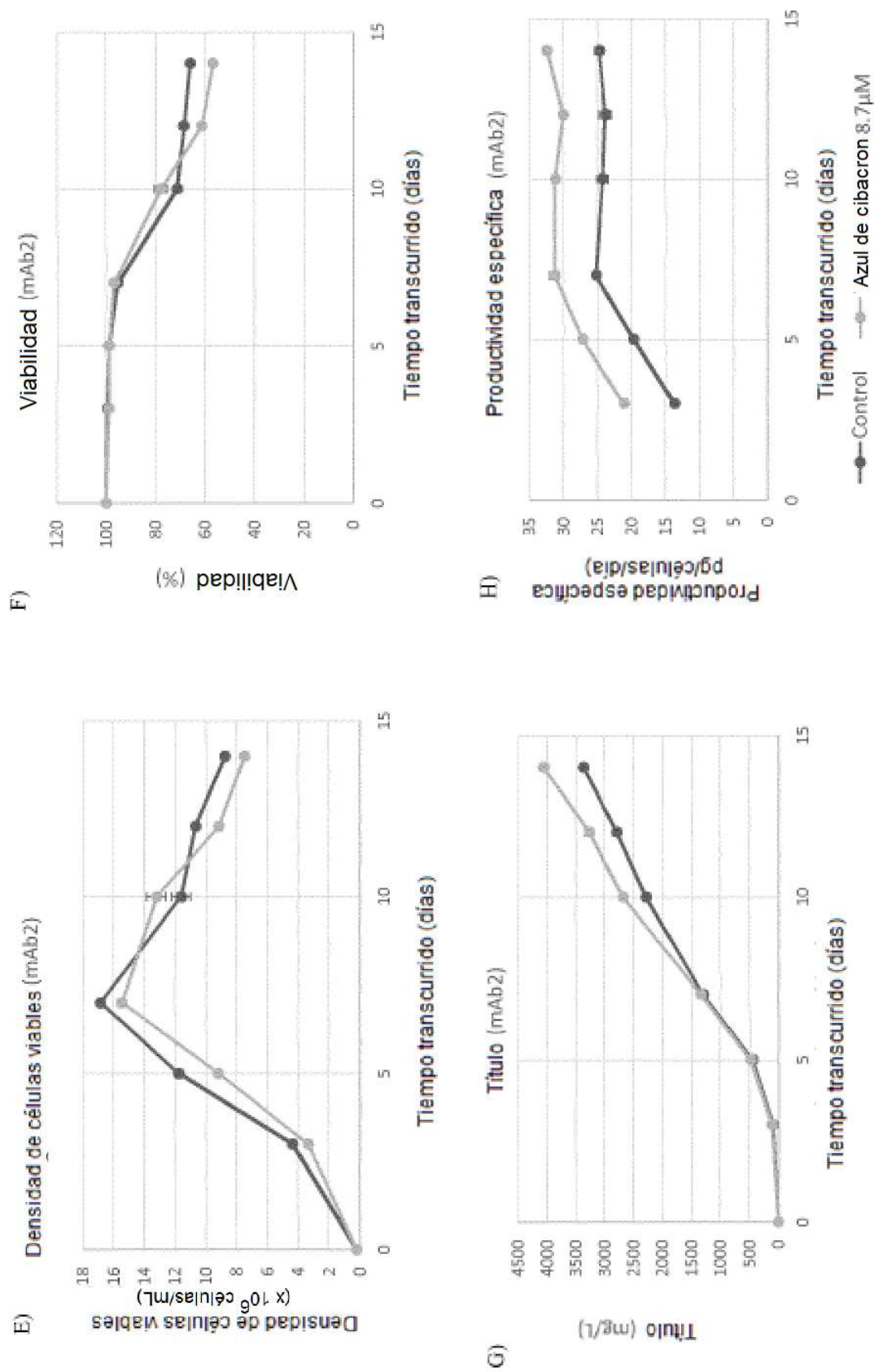
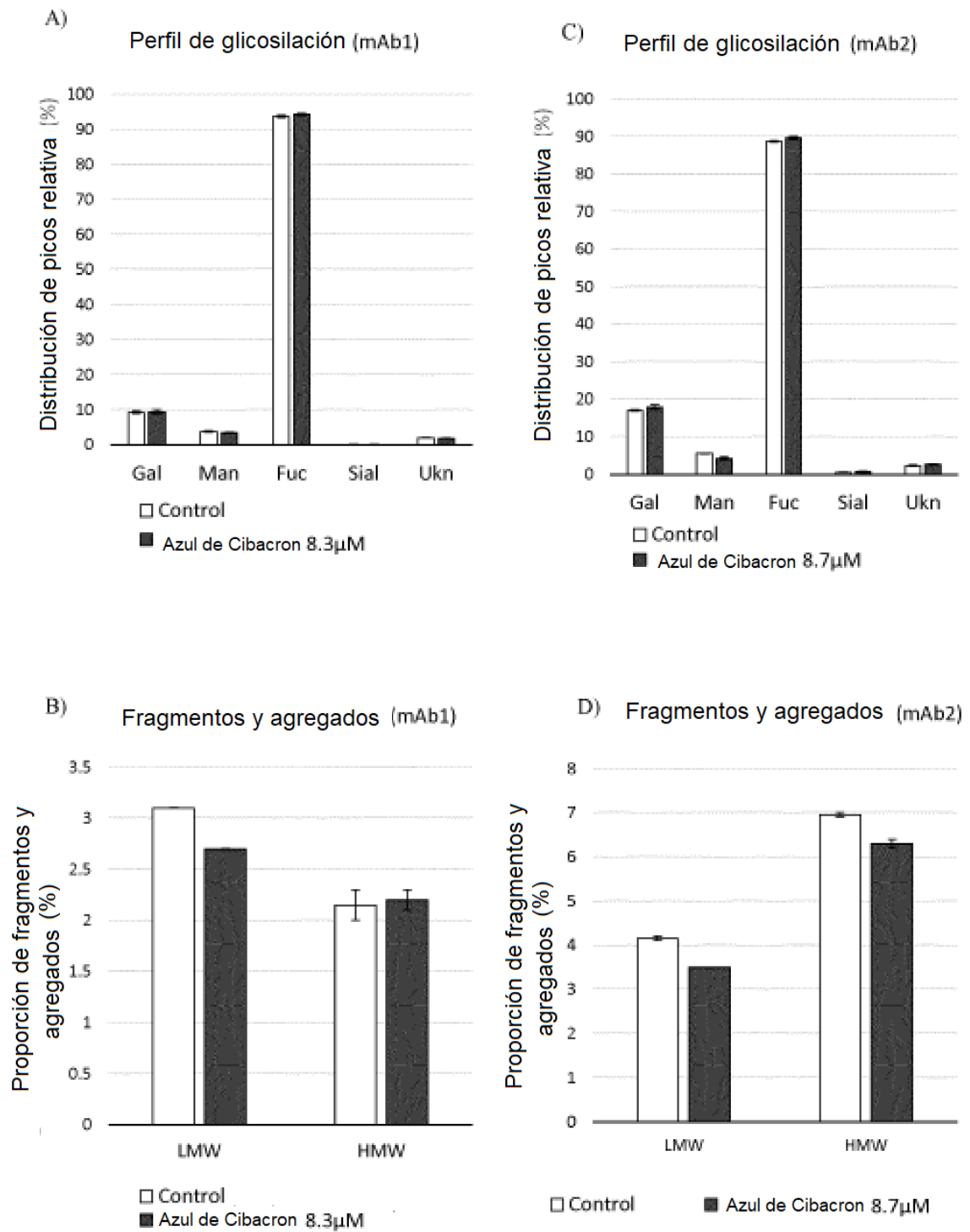


Figura 8 (continuación)



**Figura 9**