

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 394**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2018** **PCT/EP2018/064102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018** **WO18219968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2018** **E 18743683 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3630946**

54 Título: **Métodos de cultivo celular**

30 Prioridad:

**31.05.2017 GB 201708655**

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

**11.09.2024**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)  
Allée de la Recherche 60  
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**BEN YAHIA, BASSEM;  
MALPHETTES, LAETITIA;  
KOCHANOWSKI, NADINE;  
RENNER, GILL;  
DURRAN, SANDRINE y  
YATES, ANDREW JEFFREY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 978 394 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 de cultivo celular

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención pertenece al campo de la fabricación de proteínas recombinantes, en particular anticuerpos. Más específicamente, se refiere a métodos de cultivo celular para expresar proteínas, con heterogeneidad reducida durante la fabricación a escala comercial, en células CHO, en los que el cultivo se complementa con determinadas cantidades de cisteína o cistina y triptófano.

**Antecedentes de la invención**

- 10 El desarrollo de proteínas recombinantes como proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos terapéuticos, requiere la producción de proteínas recombinantes a escala industrial. Para lograr esto, se pueden emplear diferentes sistemas de expresión, tanto procarióticos como eucariotas. Sin embargo, durante las últimas dos décadas, la mayoría de las proteínas terapéuticas aprobadas como terapéuticas se han fabricado a través de cultivos de células de mamíferos y dicho sistema sigue siendo el sistema de expresión preferido para producir una gran cantidad de polipéptidos recombinantes para su uso en humanos.

- 15 Sin embargo, los cultivos de células de mamíferos presentan desafíos importantes. El título de proteína recombinante producida es en general muy bajo en comparación con otros sistemas de producción eucariotas, tales como los basados en células de levadura e insectos.

- 20 Durante los últimos 30 años, se han dedicado muchos esfuerzos a establecer los parámetros básicos del cultivo celular y la expresión de polipéptidos recombinantes, centrándose gran parte de la investigación en alcanzar un crecimiento celular óptimo mediante cambios en la composición de los medios de cultivo celular (véase, p. ej., Hecklau C., et al. J. Biotech 218 (2016) 53-63; Zang Li. et al. Anal. Chem. 83 (2011) 5422-5430) y en las condiciones de funcionamiento y desarrollo de grandes biorreactores.

- 25 Si bien el rendimiento sigue siendo un aspecto muy importante del cultivo de células de mamíferos, en los últimos años la atención se ha desplazado hacia el control de la calidad del producto y la consistencia del proceso en todas las etapas de desarrollo y escala de producción. Las proteínas terapéuticas producidas por cultivos de células de mamíferos presentan niveles variables de heterogeneidad. Dicha heterogeneidad incluye, entre otros, diferentes patrones de glicosilación, diferencias resultantes de la desamidación u oxidación, diferentes variantes de carga o tamaño. La heterogeneidad de las proteínas recombinantes también puede dar lugar a diferencias en el color del producto, p. ej., entre diferentes lotes de la misma proteína fabricada con el mismo proceso de fabricación. Dicha heterogeneidad y, en particular, diferencias de color de la proteína recombinante de interés, se vuelven más evidentes cuando las proteínas terapéuticas se formulan en concentraciones elevadas. En los últimos años, ha habido una tendencia constante hacia la administración subcutánea de proteínas terapéuticas, lo que requiere formular proteínas terapéuticas en altas concentraciones. Las altas concentraciones se han asociado con mayores niveles de agregados (Purdie J., et al. Biotechnology Progress, 2016, 32, 998-1008). Las variantes de carga aumentadas, tales como el aumento de nivel de especies ácidas, pueden afectar la estabilidad de la proteína (Banks D. D., et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98, 4501-10), mientras que el color de la proteína terapéutica concentrada puede ser más intenso.

- 35 Las condiciones del cultivo celular, tales como la composición del medio (Kshirsagar R., et al. Biotechnology and Bioengineering, 109:10, 2523-2532 (2012); US 2013/0281355; WO 2013/158275) y las condiciones de crecimiento, incluidos el pH y la temperatura (US 8,765,413), han demostrado que influyen en los atributos de calidad de las proteínas terapéuticas. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de proporcionar métodos de cultivo celular mejorados para la producción de proteínas terapéuticas y, en particular, anticuerpos terapéuticos con una heterogeneidad mínima.

**Compendio de la invención**

- 45 La presente invención aborda la necesidad identificada anteriormente al reducir la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular durante la fase de producción de las proteínas recombinantes.

La invención se materializa específicamente en las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

- 50 Figura 1: Descripción del análisis computacional para medir la cantidad total de aminoácidos cisteína o cistina y triptófano añadidos a lo largo de la fase de producción realizada en un biorreactor por porcentaje en peso de la proteína recombinante producida.

Figura 2: Efecto de la cantidad total añadida de triptófano y cisteína o cistina en % en peso (g/g) del total de mAb1 producido en el valor de b\* normalizado a 40 mg/mL (a) y la variante (b) en el grupo de picos ácidos (APG), respectivamente. La concentración máxima de triptófano y cisteína o cistina no afecta al valor de b\* (c) ni al APG% (d).

Figura 3: Efecto de la cantidad total añadida de triptófano y cisteína o cistina en % en peso del peso total de mAb1 producido (g/g) en el valor de  $b^*$  normalizado a 40 mg/mL (a) y la variante (b) en el grupo de picos ácidos (APG), respectivamente y falta de correlación para la concentración máxima de cisteína o cistina (c) y triptófano (d) en el APG.

5 Figura 4: Modelo de regresión lineal múltiple de la variante en el grupo de picos ácidos (APG) del anticuerpo monoclonal recombinante mAb1 en función de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total de mAb1 producido (g/g).

Figura 5: Modelo de regresión lineal múltiple de la variante en el grupo de picos principales del anticuerpo monoclonal recombinante mAb1 en función de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total de mAb1 producido (g/g).

10 Figura 6: Modelo de regresión lineal múltiple de la variante en especies de alto peso molecular (HMWS) del anticuerpo monoclonal recombinante mAb1 en función de la cisteína o de la cantidad total de cistina añadida en % en peso del total de mAb1 recombinante producido (g/g).

15 Figura 7: Modelo de regresión lineal múltiple del valor de  $b^*$  normalizado a una variante de 40 mg/mL del anticuerpo monoclonal recombinante mAb1 en función de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total de mAb1 producido (g/g).

20 Figura 8: Gráficos de contorno del efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total de mAb1 recombinante producido (g/g) en variantes de (a) especies de alto peso molecular (HMWS) y (b) valor de  $b^*$  normalizado a 40 mg/mL (c) del grupo de picos ácidos (APG) y (d) del grupo de picos principales. El cuadrado de la línea negra discontinua corresponde a la cantidad ideal de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total de mAb1 recombinante producido (g/g) para reducir el APG, HMWS, valor de  $b^*$  normalizado a 40 mg/mL y aumentar las variantes del grupo de picos principales que corresponden a una cantidad añadida del 12,06 y 28,03 % en peso sobre el total de mAb1 (g/g) producido para la cisteína o cistina y entre el 8,84 y 32,06 % en peso sobre el total de mAb1 (g/g) producido para el triptófano.

25 Figura 9: Efecto de la cantidad total en porcentaje en peso de cisteína o cistina y triptófano añadidos sobre el volumen de cultivo celular (CSV) en el recuento integral de células viables (IVCC) normalizado al CSV. En (a) se muestra un modelo de regresión lineal múltiple del IVCC acumulado normalizado al CSV en función de la cantidad total en porcentaje en peso de cisteína o cistina y triptófano añadidos sobre el peso de CSV. En (b) se muestra el gráfico de contorno del efecto de la cantidad total en porcentaje en peso de cisteína o cistina y triptófano añadidos sobre el peso del CSV sobre el IVCC acumulado normalizado al CSV.

30 Figura 10: Efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadida en % en peso al medio de cultivo celular durante la fase de producción sobre el peso de CSV en el título final de mAb1 medido con el método de HPLC (mAb por HPLC). En (a) se muestra un modelo de regresión lineal múltiple del título final de mAb1 por HPLC en función de la cantidad total en porcentaje en peso de cisteína o cistina y triptófano añadidos sobre el peso de CSV. En (b) se muestra un gráfico de contorno del efecto de la cantidad total en porcentaje en peso de cisteína o cistina y triptófano añadidos sobre el peso de CSV sobre el título final de mAb por HPLC.

35 Figura 11: En (a) se muestra un gráfico de contorno del efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular durante la fase de producción por  $IVCC \cdot 10^{-12}$  al final de la fase de producción sobre el IVCC durante 14 días de producción. En (b) se muestra un gráfico de contorno que muestra el efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular durante la fase de producción por  $IVCC \cdot 10^{-12}$  al final de la fase de producción sobre el título final de mAb por HPLC. En (c) se muestra la descripción del análisis computacional para medir la cantidad de aminoácidos cisteína o cistina y triptófano añadidos durante la fase de producción llevada a cabo en un biorreactor por  $IVCC \cdot 10^{-12}$  al final de la fase de producción.

Figura 12: Gráfico de contorno del efecto de la concentración máxima de cisteína o cistina y triptófano alcanzada en el medio de cultivo celular durante la fase de producción sobre el IVCC normalizado al CSV.

45 Figura 13: Cantidad total de cisteína o cisteína añadida y cantidad total de cisteína o cisteína añadida por IVCC para las condiciones descritas en la Tabla 6.

50 Figura 14: Efecto de la cisteína o el agotamiento de la cistina en el crecimiento celular y el título de mAb. El perfil de concentración de células viables (VCC) (a), los títulos de mAb (b) y las concentraciones de Cys antes de la adición del sustrato (c) se muestran en función de tres condiciones experimentales: sin agotamiento de cisteína o cistina durante toda la fase de producción [sin agotamiento - (34,35 g/L de Cys en el sustrato)] y dos condiciones con agotamiento de cisteína o de cistina todos los días a partir del día 6 hasta el final de la producción del cultivo discontinuo y con una concentración de Cys en el sustrato de 17,17 g/L y 6,87 g/L.

55 Figura 15: Efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total del anticuerpo recombinante producido en peso en (a) la variante de APG y valor de  $b^*$  normalizado a 40 mg/mL para mAb2; (b) la variante de APG para mAb3 y (c) las variantes de APG, de BPG (grupo de picos básicos) y del grupo de picos principales para mAb4.

Figura 16: El efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el peso total de mAb1, mAb2, mAb3 y mAb4 recombinante producido en el APG. En (a), la variante APG del mAb1, mAb2, mAb3 y mAb4 se representó frente a la cantidad total de cisteína o cistina añadida en % en peso sobre el total de mAb1, mAb2, mAb3 y mAb4 recombinante producido en peso. En (b), se representó un modelo de regresión lineal múltiple de la variante APG del anticuerpo monoclonal recombinante mAb1, mAb2 y mAb3 y el anticuerpo multispecífico recombinante, mAb4, en función de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total del mAb recombinante producido en peso.

Figura 17: La ecuación se desarrolló para predecir el nivel en el grupo de picos ácidos (APG) a partir de los datos de una línea celular CHO DG44 que expresa anticuerpos mAb1 (Tablas 3).

Figura 18: Comparación del nivel experimental en el grupo de picos ácidos (APG) (APG exp.) con el nivel de APG previsto (APG prev.) de una línea celular DG44 CHO que expresa anticuerpos mAb1. Los datos se generaron en el proceso de producción de perfusión utilizando tecnología de flujo tangencial alterno (ATF) en biorreactores de 2 L. La predicción de APG se basó en la ecuación de la figura 17.

### Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que al limitar la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano utilizados en el medio de cultivo celular durante la fase de producción en un proceso de fabricación de una proteína recombinante, se reduce la heterogeneidad de las proteínas recombinantes producidas. Así pues, la presente invención enseña el uso de una cantidad limitada de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular para reducir la heterogeneidad de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo expresado en el medio.

La heterogeneidad reducida es preferiblemente con respecto a:

- a. la heterogeneidad de carga, preferiblemente del grupo de picos ácidos (APG); y/o
- b. oxidación, isomerización, fragmentación de aminoácidos, glicación, desamidación, cisteinilación de otros aductos covalentes; y/o
- c. color o intensidad del color (valor de b\* normalizado a 40 mg/mL); y/o
- d. formación de especies de alto peso molecular (HMWS); y/o
- e. inestabilidad de la proteína recombinante y/o
- f. combinaciones de los mismos.

El término "heterogeneidad", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a diferencias entre moléculas individuales, p. ej., proteínas recombinantes, en una población de moléculas producidas mediante el mismo proceso de fabricación, o dentro del mismo lote de fabricación. La heterogeneidad puede resultar de modificaciones incompletas o no homogéneas de las proteínas recombinantes, p. ej., debido a modificaciones postraduccionales de la proteína expresada. Dichas modificaciones pueden ser el resultado de reacciones de desaminación y/o reacciones de oxidación y/o adición covalente de moléculas pequeñas tales como reacciones de glicación y/o reacciones de isomerización y/o reacciones de fragmentación y/u otras reacciones y también incluyen variación en los patrones de glicación. La manifestación quimiofísica de dicha heterogeneidad da lugar a diversas características en las preparaciones de proteínas recombinantes resultantes que incluyen, entre otras, perfil de variante de carga, color o intensidad de color y perfil de peso molecular.

El término "fase de producción" según la presente invención comprende esa etapa de cultivo celular durante el proceso para fabricar una proteína recombinante cuando las células expresan (es decir, producen) la(s) proteína(s) recombinante(s). La fase de producción comienza cuando aumenta el título del producto deseado y termina con la cosecha de las células o del fluido o sobrenadante del cultivo celular. Típicamente, al comienzo de la fase de producción, el cultivo celular se transfiere a un biorreactor. La cosecha es la etapa durante la cual se retira el fluido de cultivo celular del, p. ej., recipiente de producción, para que la proteína recombinante, p. ej., el anticuerpo recombinante, se recupere y purifique en etapas posteriores. El término "peso del cultivo celular inicial", cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere al peso del cultivo al inicio de la fase de producción, típicamente el peso tras la inoculación del biorreactor.

En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para producir una proteína recombinante que comprende:

- a. cultivar células huésped capaces de producir una proteína recombinante en un medio sin productos de origen animal, en el que las células huésped son células CHO;
- b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que la proteína recombinante es producida por las células, en el que, durante dicha fase de producción, el cultivo se complementa con

a. cisteína o cistina hasta una cantidad total del 10 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida; y

b. triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 35 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida,

5 y, opcionalmente, recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular, en el que se realizan uno o más experimentos iniciales para determinar la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

Como resultará evidente a partir de la descripción de la invención a continuación, el cultivo se complementa con cisteína o cistina y triptófano; dicho complemento podrá realizarse con:

1. cisteína y triptófano; o

10 2. cistina y triptófano; o

3. cisteína, cistina y triptófano.

15 Cuando se utilizan en la presente memoria, las expresiones "cantidad total de cisteína o cistina" o "cisteína o cistina hasta una cantidad total..." se refiere a a) la cantidad total de cisteína sola si no se emplea cistina en el proceso, b) la cantidad total de cistina sola si no se emplea cisteína en el proceso o c) la cantidad total de cisteína + cistina si ambos compuestos se emplean en el proceso. La cisteína y la cistina en el medio de cultivo celular están en equilibrio constante en el que dos moléculas de cisteína se oxidan en una molécula de cistina y se reducen nuevamente a dos moléculas de cisteína.

20 La cantidad total de cisteína o cistina y triptófano se puede expresar en la presente memoria como un porcentaje de la cantidad total de proteína recombinante producida. El término "porcentaje en peso", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un porcentaje de peso. "Total" se refiere a la cantidad total determinada al final de la fase de producción, es decir, la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en el transcurso de la fase de producción y la cantidad total de proteína recombinante producida en el transcurso de la fase de producción, en la que la cantidad total de proteína recombinante producida se mide al final de la fase de producción.

25 La figura 1 muestra cómo se calcula la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano por porcentaje en peso de proteína recombinante producida. La cantidad total de cisteína o cistina o triptófano añadido se calcula en función de la tasa de sustrato (o volumen de sustrato) y la concentración de cisteína o cistina o triptófano en ese sustrato y la concentración de cisteína o cistina o triptófano en el medio donde el sustrato se añade por volumen de sustrato añadido (Figura 1, A). La cantidad de proteína recombinante producida se calcula en función del volumen final del medio de cultivo celular y el título final de proteína recombinante (Figura 1, B). La relación de estos dos parámetros calculados es la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos por cantidad de proteína recombinante producida (Figura 1, C).

Las células huésped se pueden cultivar inicialmente (en la etapa a.) en un medio de cultivo celular que puede incluir o no cisteína o cistina y triptófano. Si el medio de cultivo celular ya incluye una cantidad inicial de cisteína o cistina y triptófano, entonces la cantidad total incluirá esta cantidad inicial.

35 En una realización del proceso de la invención, el cultivo se complementa con cisteína o cistina hasta una cantidad total del 12,06 % en peso al 28,03 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 12 % en peso al 28 % en peso, p. ej., del 12 % en peso al 25 % en peso, tal como del 12 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

40 En otra realización del proceso de la invención, en el que el cultivo se complementa con triptófano hasta una cantidad total del 8,84 % en peso al 32,06 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 8 % en peso al 30 % en peso, p. ej., del 8 % en peso al 25 % en peso, tal como del 8 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

45 De forma alternativa, la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano se puede expresar como la cantidad total añadida durante el proceso con respecto al recuento integral de células viables al final de la fase de producción. En una realización, la cantidad total de cisteína y cistina aportada durante el proceso es de 2,9 a 12 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,9 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), p. ej., de 5,6 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción. En otra realización, la cantidad total de triptófano aportada durante el proceso es de 2,5 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,5 a 3,5 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción.

50 Debe entenderse que el experto en la materia sabría cómo medir la cantidad de cisteína o cistina y triptófano añadidos y presentes en un cultivo celular en una fase específica, tal como la fase de producción. Por ejemplo, esto se puede hacer como se describe en los ejemplos de la presente memoria. De forma parecida, el experto en la materia sabría cómo medir la cantidad total de proteína recombinante producida por un cultivo celular y, en consecuencia, aplicaría las enseñanzas de la presente invención para lograr el efecto técnico deseado. Por ejemplo, esto se puede hacer

como se describe en los ejemplos de la presente memoria, tal como usando un modelo de analizador de ForteBio Octet (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA) o cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) de proteína A con muestras de sobrenadante del cultivo celular que se almacenaron a -80 °C antes del análisis.

Para diseñar un proceso según la invención, en el que las cantidades de cisteína o cistina y triptófano por cantidad total prevista de proteína recombinante producida se mantienen dentro de determinados intervalos, puede ser necesario realizar uno o más experimentos iniciales para determinar los niveles aproximados de proteína recombinante producida por células huésped concretas en condiciones de cultivo concretas. Una vez que se conoce el nivel total aproximado de proteína recombinante producida, se puede diseñar un proceso según la invención en el que la cantidad de cisteína o cistina y triptófano por cantidad total prevista de proteína recombinante producida se mantiene dentro de los intervalos especificados.

Se pueden emplear diversas estrategias para alcanzar la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular durante la fase de producción. En una realización, la cantidad total se puede alcanzar al añadir cisteína o cistina y triptófano justo al comienzo de la fase de producción, por ejemplo, solo una vez, o ya incluidos en el medio de cultivo celular de producción. En otra realización, la cantidad total puede alcanzarse mediante la suma de adiciones, por ejemplo, adición diaria o adición continua, durante la fase de producción. En otra realización más, la cantidad total se puede alcanzar mediante una combinación de la concentración inicial de cisteína/cisteína y triptófano en el fluido de cultivo celular al inicio de la fase de producción, y por medio de adiciones.

Por consiguiente, en una realización del proceso de la invención, la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular se alcanza al añadir cisteína o cistina y triptófano al medio de cultivo celular:

- a. al comienzo de la fase de producción,
- b. una o múltiples veces en cualquier momento durante la fase de producción,
- c. mediante adición continua durante la fase de producción, o
- d. en cualquier combinación de a., b. y c.

En una realización preferida, la cisteína o cistina y triptófano se añaden al comienzo de la fase de producción y se añaden mediante bolos todos los días durante la fase de producción.

Preferiblemente, la fase de producción dura por lo menos 7 días, más preferiblemente más de 7 días, tal como 10 días, más preferiblemente 14 o más días.

En una realización preferida, la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,9 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción.

Además, en una realización preferida, la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,6 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción.

En una realización, se añade cisteína o cistina diariamente al medio de cultivo celular, y el día 6 la cisteína o cistina en el medio de cultivo celular aumenta hasta una concentración máxima de 0,3 g/L, y del día 7 al 14 la cisteína o cistina en el medio de cultivo celular aumenta hasta una concentración máxima de 0,9 g/L.

En algunas realizaciones, las cantidades de cisteína o cistina y triptófano no solo están dentro de los intervalos especificados cuando se calculan durante toda la fase de producción al final de la fase de producción, sino también en cualquier momento durante partes de la fase de producción o incluso en cualquier momento durante toda la fase de producción. Por lo tanto, en una realización, en cualquier momento durante la segunda mitad de la fase de producción (p. ej., del día 7 al 14 de una fase de producción de 14 días):

- la cantidad de cisteína o cistina en el cultivo es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
- la cantidad de triptófano en el cultivo es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.

En otra realización, en cualquier momento durante la fase de producción:

- la cantidad de cisteína o cistina en el cultivo es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
- la cantidad de triptófano en el cultivo es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.

Cuando se aporta cisteína o cistina a las células mediante la adición diaria, la cisteína o cistina puede agotarse en el cultivo antes de que se aporte la adición diaria siguiente. En una realización, la cisteína o cistina se agota en el cultivo antes de añadir cisteína o cistina al día siguiente, p. ej., al reducir la adición de cisteína o cistina a un nivel entre 5,6 y 7 g/[10<sup>12</sup> células]. En una segunda realización, el triptófano se agota en el cultivo durante el cultivo celular durante la última etapa de producción, es decir, cuando las células ya alcanzaron la densidad celular viable máxima, p. ej., al comenzar el agotamiento el día 8 o más tarde en una fase de producción de 14 días.

Sin quedar vinculado a ninguna teoría, se cree que, a pesar de que la cisteína o la cistina se agotan, las células en la fase de producción no permanecen privadas de cisteína o cistina, sino que se supone que poseen un mecanismo interno destinado a almacenar la cisteína o la cistina que se pone a disposición en el medio de cultivo celular, mediante la adición, como un metabolito inactivo, que puede convertirse en cisteína o cistina una vez que se produce el agotamiento.

En la presente memoria también se describe un proceso para producir una proteína recombinante que comprende:

a. cultivar células huésped capaces de producir una proteína recombinante en un medio;

b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que las células producen la proteína recombinante y el medio de cultivo celular se complementa con cisteína o cistina y triptófano, en el que

- la cantidad total de cisteína o cistina aportada durante el proceso es de 2,9 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), p. ej., de 5,6 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción, y
- la cantidad total de triptófano aportada durante el proceso es de 2,5 a 3,5 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción,

c. y, opcionalmente, recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular.

En una realización de esta divulgación, el medio de cultivo celular se complementa con cisteína o cistina hasta una cantidad total del 12 % en peso al 28 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 12 % en peso al 25 % en peso, p. ej., del 12 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

En otra realización de esta divulgación, el medio de cultivo celular se complementa con triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 8 % en peso al 25 % en peso, p. ej., del 8 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

En otra realización de esta divulgación, la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular se alcanza al añadir cisteína o cistina y triptófano al medio de cultivo celular:

- a. al comienzo de la fase de producción,
- b. una o múltiples veces en cualquier momento durante la fase de producción,
- c. mediante adición continua durante la fase de producción, o
- d. en cualquier combinación de a., b. y c.

En otra realización de esta divulgación, el proceso es un proceso discontinuo, tal como un proceso de cultivo discontinuo. En otra realización de este proceso, la cisteína o cistina y triptófano se aportan mediante la adición diaria durante la fase de producción.

En otra realización de esta divulgación, la cisteína o cistina se agota en el medio de cultivo celular antes de que se añada cisteína o cistina al día siguiente, p. ej., al reducir la adición de cisteína o cistina a un nivel entre 5,6 y 7 g/[10<sup>12</sup> células].

En otra realización de esta divulgación, durante la etapa tardía de producción, es decir, cuando las células ya han alcanzado la densidad celular viable máxima, el triptófano se agota en el medio de cultivo celular antes de que se añada triptófano al día siguiente.

En otra realización de esta divulgación, la concentración de cisteína o cistina en el cultivo celular no sobrepasa los 0,9 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de cisteína o cistina en el cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción.

En otra realización de esta divulgación, la concentración de triptófano en el cultivo celular no sobrepasa los 0,6 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de triptófano en el cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción.

En otra realización de este proceso, la fase de producción se realiza durante por lo menos 7 días, preferiblemente por lo menos 14 días.

En una realización de esta divulgación, en cualquier momento durante la segunda mitad de la fase de producción:

- 5 a. la cantidad de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
- b. la cantidad de triptófano en el medio de cultivo celular es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.

En otra realización de este proceso, en cualquier momento durante la fase de producción:

- 10 a. la cantidad de cisteína o cistina es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
- b. la cantidad de triptófano es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.

En otra realización del procedimiento según la invención, la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

- 15 En otra realización del proceso según la invención, la fase de producción se lleva a cabo en un biorreactor, preferiblemente con un volumen igual o superior a 50 L, igual o superior a 100 L, igual o superior a 500 L, igual o superior a 1.000 L, igual o superior a 2.000 L, igual o superior a 5.000 L, igual o superior a 10.000 L o igual o superior a 20.000 L.

- 20 En una realización de este proceso, el proceso comprende la etapa de recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular y una etapa adicional de purificar la proteína recombinante. En una realización adicional de este proceso, la purificación comprende cromatografía de proteína A. En una realización adicional de este proceso, el proceso comprende una etapa adicional de formulación de la proteína recombinante purificada.

En una divulgación adicional relacionada con este proceso, la proteína recombinante se formula en una formulación líquida que comprende uno o más aminoácidos y un tensioactivo.

En una divulgación adicional relacionada con este proceso, la formulación comprende histidina y prolina.

- 25 En todavía otra divulgación relacionada con este proceso, la formulación comprende histidina en una concentración de 5 mM a 100 mM, p. ej., una concentración de 10 mM a 50 mM, y/o prolina en una concentración de 100 mM a 500 mM, a un pH entre 5 y 7,4, tal como entre 5 y 6,5, p. ej., entre 5 y 6, tal como entre 5,5 y 6.

En todavía otra divulgación relacionada con este proceso, la formulación comprende histidina en una concentración de 30 mM y prolina en una concentración de 250 mM, a un pH entre 5,2 y 6,0, tal como aproximadamente 5,6.

- 30 En una descripción adicional relacionada con este proceso, el tensioactivo es polisorbato 80, preferiblemente en una concentración del 0,001 % al 0,1 % (p/v), p. ej., del 0,005 % al 0,1 %, tal como del 0,01 % al 0,1 %, p. ej., del 0,01 % al 0,05 %, tal como el 0,03%.

- 35 En todavía otra divulgación relacionada con este proceso, la proteína recombinante es un anticuerpo y el anticuerpo se formula a una concentración de 10 mg/mL a 250 mg/mL, p. ej., de 20 mg/mL a 250 mg/mL, tal como de 50 mg/mL a 250 mg/mL, p. ej., de 120 mg/mL a 160 mg/mL, tal como aproximadamente 140 mg/mL.

En otra divulgación relacionada con este proceso, el proceso reduce la heterogeneidad de las proteínas recombinantes producidas, en el que dicha reducción de heterogeneidad comprende reducir:

- a. la heterogeneidad de carga, preferiblemente del grupo de picos ácidos (APG); y/o
- 40 b. oxidación, isomerización, fragmentación de aminoácidos, glicación, desamidación, cisteinilación de otros aductos covalentes; y/o
- c. color o intensidad del color, p. ej., entre diferentes lotes de la proteína recombinante; y/o
- d. especies de alto peso molecular (HMWS); y/o
- e. inestabilidad de la proteína recombinante.

- 45 En un aspecto independiente adicional, la invención se refiere a un método para reducir la heterogeneidad de la población de proteínas recombinantes en un lote producido en fase de producción mediante células huésped recombinantes, en el que las células huésped son células CHO, que comprende:



a. cultivar células huésped capaces de producir una proteína recombinante en un medio sin productos de origen animal,

b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que la proteína recombinante es producida por las células, en el que, durante dicha fase de producción, el cultivo se complementa con

- 5
  - cisteína o cistina hasta una cantidad total del 10 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida; y
  - triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 35 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida

10 y, opcionalmente, recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular, en el que se realizan uno o más experimentos iniciales para determinar la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

En una realización del método, el cultivo se complementa con cisteína o cistina hasta una cantidad total del 12 % en peso al 28 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 12 % en peso al 25 % en peso, p. ej., del 12 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

15 En otra realización del método, el cultivo se complementa con triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 8 % en peso al 25 % en peso, p. ej., del 8 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

20 En otra realización del método, la cantidad total de cisteína o cistina aportada durante el proceso es de 2,9 a 12 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,9 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), p. ej., de 5,6 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción.

En otra realización del método, la cantidad total de triptófano aportada durante el proceso es de 2,5 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,5 a 3,5 g/(10<sup>12</sup> células/L), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción.

25 En otra realización del método, la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular se alcanza al añadir cisteína o cistina y triptófano al medio de cultivo celular:

- a. al comienzo de la fase de producción,
- b. una o múltiples veces en cualquier momento durante la fase de producción,
- c. mediante adición continua durante la fase de producción, o

30 d. en cualquier combinación de a., b. y c.

En otra realización del método, el proceso es un proceso discontinuo, tal como un proceso de cultivo discontinuo.

En otra realización del método, se aportan cisteína o cistina y triptófano mediante la adición diaria durante la fase de producción.

35 En otra realización del método, la cisteína o cistina se agota en el medio de cultivo celular antes de que se añada cisteína o cistina al día siguiente, p. ej., al reducir la adición de cisteína o cistina a un nivel entre 5,6 y 7 g/[10<sup>12</sup> células].

En otra realización del método, durante la etapa tardía de producción, es decir, cuando las células ya han alcanzado la densidad celular viable máxima, el triptófano se agota en el medio de cultivo celular antes de que se añada triptófano al día siguiente.

40 En otra realización del método, la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,9 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en cualquier momento durante la fase de producción.

En otra realización del método, la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,6 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción.

45 En otra realización del método, la fase de producción se realiza durante por lo menos 7 días, preferiblemente por lo menos 14 días.

En otra realización del método, en cualquier momento durante la segunda mitad de la fase de producción:

- la cantidad de cisteína o cistina en el cultivo es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
  - la cantidad de triptófano en el cultivo es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.
- 5 En otra realización del método, en cualquier momento durante la fase de producción:
- la cantidad de cisteína o cistina en el cultivo es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
  - la cantidad de triptófano en el cultivo es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.
- 10 En otra realización del método, la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- En otra realización del método, la fase de producción se lleva a cabo en un biorreactor, preferiblemente con un volumen igual o superior a 50 L, igual o superior a 100 L, igual o superior a 500 L, igual o superior a 1.000 L, igual o superior a 2.000 L, igual o superior a 5.000 L, igual o superior a 10.000 L o igual o superior a 20.000 L.
- 15 En una realización de este método, el método comprende la etapa de recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular y una etapa adicional de purificar la proteína recombinante.
- En una realización adicional de este método, la purificación comprende cromatografía de proteína A.
- En una realización adicional de este método, el método comprende una etapa adicional de formular la proteína recombinante purificada.
- 20 En otra realización del método, el método reduce la heterogeneidad de las proteínas recombinantes producidas, en el que dicha reducción de la heterogeneidad comprende reducir:
- a. la heterogeneidad de carga, preferiblemente del grupo de picos ácidos (APG); y/o
  - b. oxidación, isomerización, fragmentación de aminoácidos, glicación, desamidación, cisteinilación de otros aductos covalentes; y/o
- 25 c. color o intensidad del color, p. ej., entre diferentes lotes de la proteína recombinante; y/o
- d. especies de alto peso molecular (HMWS); y/o
- e. inestabilidad de la proteína recombinante.
- En la presente memoria también se describe una preparación de proteína recombinante que se puede obtener o se obtiene mediante el proceso según la invención. En una realización, la preparación es una preparación a granel. En otras realizaciones, p. ej., cuando el proceso comprende etapas adicionales de formulación del producto de proteína, la preparación que se obtiene es una preparación de proteína formulada, p. ej., una preparación adecuada para la administración a un paciente.
- 30 Las proteínas recombinantes, preferiblemente los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos en dicha preparación así obtenida presentan una heterogeneidad reducida con respecto a las mismas proteínas recombinantes obtenidas con el mismo proceso, pero donde la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano durante la fase de producción no es limitada como se describe en la presente invención. En la presente memoria también se divulga una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, en el que la composición es una composición de formulación líquida con uno o más aminoácidos y un tensioactivo.
- 35 En una divulgación adicional, la composición farmacéutica comprende histidina y/o prolina.
- 40 En una descripción adicional, la composición farmacéutica comprende histidina y/o prolina. En una divulgación adicional, la composición farmacéutica comprende histidina en una concentración de 5 mM a 100 mM, p. ej., una concentración de 10 mM a 50 mM, y/o prolina en una concentración de 100 mM a 500 mM, a un pH entre 5 y 7,4, tal como entre 5 y 6,5, p. ej., entre 5 y 6, tal como entre 5,5 y 6.
- 45 En una divulgación adicional, la composición farmacéutica comprende histidina en una concentración de 30 mM y prolina en una concentración de 250 mM, a un pH entre 5,2 y 6,0, tal como aproximadamente 5,6.
- En una divulgación adicional relacionada con la composición farmacéutica, el tensioactivo es polisorbato 80, preferiblemente en una concentración del 0,001 % al 0,1 % (p/v), p. ej., del 0,005 % al 0,1 %, tal como del 0,01 % al 0,1 %, p. ej., del 0,01 % al 0,05 %, tal como el 0,03%.

En una divulgación adicional relacionada con la composición farmacéutica, el anticuerpo se formula a una concentración de 10 mg/ml a 250 mg/ml, p. ej., de 20 mg/ml a 250 mg/ml, tal como de 50 mg/ml a 250 mg/ml, p. ej., de 120 mg/ml a 160 mg/ml, tal como aproximadamente 140 mg/ml.

En una divulgación adicional relacionada con la composición farmacéutica, el anticuerpo es

- 5 1) un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que
  - a. comprende el CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 1; el CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 2; el CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 3; el CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 4; el CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 5 y el CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 6; o
  - 10 b. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8; o
  - c. comprende una región variable ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 8;
  - 15 d. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 11; o
  - e. comprende una región variable ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido a la secuencia definida en SEQ ID NO: 11; o
  - 20
- 2) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 10; o
- 25 3) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 10.

#### Células huésped y condiciones de cultivo

- 30 La proteína recombinante, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo se producen preferiblemente cultivando células de ovario de hámster chino (CHO).

El término "cultivo celular" o variaciones gramaticales del mismo incluye, entre otros, una pluralidad de células huésped, preferiblemente células huésped de mamífero, manipuladas y/o genomanipuladas adecuadamente para expresar (es decir, producir) una o más proteínas recombinantes que se mantienen o se cultivan en un medio de cultivo celular durante un período de tiempo concreto, p. ej., la fase de producción.

- 35 Las células de mamífero, y en particular las células CHO, pueden cultivarse en cualquier medio que permita su crecimiento y expresión de la proteína recombinante, preferiblemente el medio es un medio sin productos de origen animal tales como suero animal y peptona. Existen diferentes medios de cultivo celular disponibles para el experto en la técnica, comprendiendo cada medio diferentes combinaciones de vitaminas, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, iones, tampones, nucleósidos, glucosa o una fuente de energía equivalente, presentes en
- 40 concentraciones apropiadas que permitan el crecimiento celular y la producción de proteínas. Los medios adecuados se han descrito, p. ej., en los documentos WO98/08934 y US2006/0148074 (ambos se incorporan en la presente memoria en su totalidad). Otros medios adecuados disponibles comercialmente que podrían utilizarse en la presente invención o modificarse para cumplir los requisitos de la cisteína/cisteína y el triptófano incluyen el medio AmpliCHO CD, el medio Dynamis<sup>MT</sup>, el sistema de cultivo discontinuo de CHO EX-CELL<sup>®</sup> Advanced<sup>MT</sup>, el medio CD FortiCHO<sup>MT</sup>, el medio CP OptiCHO<sup>MT</sup>, el medio mínimo esencial (MEM), el medio de cultivo de CHO BalanCD<sup>®</sup> A, el medio ActiPro<sup>MT</sup>, el DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) y el medio RPMI-1640.
- 45

El cultivo celular puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado, tal como un matraz agitador o un biorreactor, que puede funcionar o no en modo de cultivo discontinuo dependiendo de la escala de producción requerida.

- 50 Estos biorreactores pueden ser reactores de tanque agitador o de elevación con aire. Se encuentran disponibles diversos biorreactores a gran escala con una capacidad de más de 1.000 L a 50.000 L, preferiblemente entre 5.000 L y 20.000 L, o hasta 10.000 L. De forma alternativa, también se pueden utilizar biorreactores de menor escala, tal como entre 2 L y 100 L utilizados para fabricar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En una realización preferida de la presente invención, independientemente de dónde se lleve a cabo cualquier fase anterior (es decir, una fase de expansión), la fase de producción se lleva a cabo en un biorreactor o cualquier otro recipiente de cultivo en suspensión tal como un matraz agitador o un matraz centrifugador. La fase de producción funciona preferiblemente en un modo de cultivo discontinuo, pero se puede utilizar como alternativa de cualquier otro modo, tal como discontinuo, de perfusión o quimiostato. En los casos de perfusión o quimiostato, las proporciones de las cantidades totales de cisteína o cisteína y triptófano utilizadas se calculan según el caudal de perfusión frente a la tasa de eliminación de proteína recombinante producida en el recipiente de producción.

La proteína recombinante, p. ej., un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, de la misma se encuentra típicamente en el sobrenadante de un cultivo de células de mamífero, típicamente un cultivo de células CHO. Para las células huésped CHO, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se secreta en el sobrenadante y dicho sobrenadante puede recogerse mediante métodos conocidos en la técnica, típicamente mediante centrifugación.

Proteínas recombinantes que se pueden producir con el proceso de la invención

El proceso de la invención se puede utilizar para producir cualquier tipo de polipéptido o proteína recombinante, incluidos, p. ej., péptidos o proteínas más grandes que tengan una estructura terciaria significativa, así como, p. ej., glicoproteínas y proteínas multiméricas. Sin embargo, preferiblemente, la proteína recombinante producida en el proceso según la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se utiliza en la presente memoria incluye, p. ej., anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, así como anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos, tal como biespecíficos.

"Anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen anticuerpos de cualquier especie, en particular de especies de mamíferos, que típicamente tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, anticuerpos humanos de cualquier isotipo, que incluyen IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgGE e IgM y variantes modificadas de los mismos, anticuerpos de primates no humanos, p. ej., de chimpancé, babuino, mono rhesus o cynomolgus, anticuerpos de roedor, p. ej., de ratón, rata o conejo; anticuerpos de cabra o de caballo, y derivados los mismos, o de especies de aves tales como anticuerpos de pollo o de especies de peces tales como anticuerpos de tiburón. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" también se refiere a anticuerpos "quiméricos" en los que una primera porción de por lo menos una secuencia de anticuerpos de cadena pesada y/o ligera es de una primera especie y una segunda porción de la secuencia de anticuerpos de cadena pesada y/o ligera es de una segunda especie. Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (p. ej., mono del Viejo Mundo, tal como babuino, rhesus o mono cynomolgus) y secuencias de región constante humana. Los anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia derivada de anticuerpos no humanos. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable o región determinante de la complementariedad (CDR) de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, pollo o primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y actividad deseadas. En la mayoría de los casos, los residuos del anticuerpo humano (receptor) fuera de la CDR; es decir, en la región marco (FR), se sustituyen adicionalmente por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar aún más el rendimiento de los anticuerpos. La humanización reduce la inmunogenicidad de los anticuerpos no humanos en humanos, lo cual facilita la aplicación de anticuerpos al tratamiento de enfermedades humanas. Los anticuerpos humanizados y varias tecnologías diferentes para generarlos son bien conocidos en la técnica. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" también se refiere a anticuerpos humanos, que pueden generarse como alternativa a la humanización. Por ejemplo, resulta posible producir animales transgénicos (p. ej., ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de anticuerpos murinos endógenos. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos con especificidad contra un antígeno concreto tras la inmunización del animal transgénico que porta los genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana con dicho antígeno. Se conocen en la técnica tecnologías para producir dichos animales transgénicos y tecnologías para aislar y producir anticuerpos humanos a partir de dichos animales transgénicos. De forma alternativa, en el animal transgénico; por ejemplo, ratón, solo los genes de inmunoglobulina que codifican las regiones variables del anticuerpo de ratón se sustituyen con las correspondientes secuencias de genes de inmunoglobulina variable humana. Los genes de inmunoglobulina de la línea germinal del ratón que codifican las regiones constantes del anticuerpo permanecen sin cambios. De esta manera, las funciones efectoras del anticuerpo en el sistema inmunitario del ratón transgénico y, en consecuencia, el desarrollo de las células B permanecen fundamentalmente sin cambios, lo que puede dar lugar a una respuesta de anticuerpos mejorada tras el desafío antigénico in vivo. Una vez que los genes que codifican un anticuerpo de interés particular se han aislado de dichos animales transgénicos, los genes que codifican las regiones constantes se pueden sustituir con genes de regiones constantes humanas para obtener un anticuerpo completamente humano. El término "anticuerpo" o "anticuerpos", como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a un anticuerpo aglicosilado.

El término "fragmento de unión al antígeno del mismo" o variaciones gramaticales del mismo como se utiliza en la presente memoria se refiere a un fragmento de anticuerpo. Un fragmento de un anticuerpo comprende por lo menos un dominio de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera como se conoce en la técnica y se une a uno o más antígenos. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos según la invención incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y los fragmentos Fv y scFv; así como diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio (dAbs), tales como sdAbs, VHH o anticuerpos de camélido (p. ej., de camellos o llamas tales como Nanobodies<sup>MT</sup>) y fragmentos VNAR, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, tetraespecíficos o multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos o anticuerpos, que incluyen, entre otros, constructos Fab-Fv o Fab-Fv-Fv. Los fragmentos de anticuerpos como se definen anteriormente son conocidos en la técnica.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo producido mediante los métodos según la invención es (Tabla 1):

1) un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que

a. comprende el CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:1; el CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:2; el CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:3; el CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:4; el CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:5 y el CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:6; o

b. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8; o

c. comprende una región variable ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 8;

d. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 11; o

e. comprende una región variable ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido a la secuencia definida en SEQ ID NO: 11; o

2) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 10; o

3) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 10.

A lo largo de esta memoria descriptiva, las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") se definen según la definición de Kabat. La definición de Kabat es un estándar para numerar los residuos en un anticuerpo y típicamente se utiliza para identificar regiones CDR (Kabat et al., (1991), 5ª edición, n.º publicación del NIH 91-3242).

Tabla 1

Región e identificador SEQ ID	Secuencia de aminoácidos
CDR-H1 SEQ ID NO:1	GFTFSNYGMV
CDR-H2 SEQ ID NO:2	YIDSDGDNTYYRDSVKG
CDR-H3 SEQ ID NO:3	GIVRPFLY
CDR-L1 SEQ ID NO:4	KSSQSLVGASGKTYLY

# ES 2 978 394 T3

Región e identificador SEQ ID	Secuencia de aminoácidos					
CDR-L2 SEQ ID NO:5	LVSTLDS					
CDR-L3 SEQ ID NO:6	LQGTHFPHT					
Región variable ligera SEQ ID NO:7	DIQMTQSPSS LFQKPGKAPK SSLQPEDFAT	LSASVGDRVT RLIYLVSTLD YYCLQGTHFP	ITCKSSQSLV SGIPSRFSGS HTFGQGKLE	GASGKTYLYW GSGTEFTLTI IK		
Región variable pesada SEQ ID NO:8	EVPLVESGGG IDSDGDNTYY VRPFLYWQQG	LVQPGGSLRL RDSVKGRFTI TLVTVS	SCAVSGFTFS SRDNAKSSLY	NYGMVWVRQA LQMNSLRAED	PGKGLEWVA TAVYYCTTG	
Cadena ligera SEQ ID NO:9	DIQMTQSPSS LFQKPGKAPK SSLQPEDFAT FIFPPSDEQL SGNSQESVTE VTHQGLSSPV	LSASVGDRVT RLIYLVSTLD YYCLQGTHFP KSGTASVCL QDSKDSTYSL TKSFNRGEC	ITCKSSQSLV SGIPSRFSGS HTFGQGKLE LNNFYBREAK SSTLTLSKAD	GASGKTYLYW GSGTEFTLTI IKRTVAAPSV VQWKVDNALQ YEKHKVYACE		
Cadena pesada SEQ ID NO:10	EVPLVESGGG PGKGLEWVAY LQMNSLRAED KGPSVFPLAP GALTSGVHTF NVDHKPSNTK PPKPKDTLMI VHNAKTKPRE SNKGLPSSIE SLTCLVKGFY FFLYSRLTVD	LVQPGGSLRL IDSDGDNTYY TAVYYCTTGI CSRSTSESTA PAVLQSSGLY VDKRVESKYG SRTPEVTCVV EQFNSTYRVV KTISKAKGQP PSDIAVEWES KSRWQEGNVF	SCAVSGFTFS RDSVKGRFTI VRPFLYWQQG ALGCLVKDYF SLSSVTVPS PPCPPCPAPE VDVSQEDPEV SVLTVLHQDW REPQVYTLPP NGQPENNYKT SCSVMHEALH	NYGMVWVRQA SRDNAKSSLY TLVTVSSAST PEPVTVSWNS SSLGKTYTC FLGGPSVFLF QFNWYVDGVE LNGKEYKCKV SQEEMTKNQV TPPVLDSGGS NHYTQKSLSL	SLGK	
Cadena pesada de Fab SEQ ID NO:11	EVPLVESGGG IDSDGDNTYY VRPFLYWQQG PEPVTVSWNS NVNHKPSNTK	LVQPGGSLRL RDSVKGRFTI TLVTVSSAST GALTSVHTF VDKKVEPKSC	SCAVSGFTFS SRDNAKSSLY KGPSVFPLAP PAVLQSSGLY	NYGMVWVRQA LQMNSLRAED SSKSTSGGTA SLSSVTVPS	PGKGLEWVA TAVYYCTTG ALGCLVKDY SSLGTQTYI	

La proteína recombinante o el anticuerpo preferido o fragmento de unión al antígeno del mismo puede producirse típicamente mediante células huésped que contienen un vector que codifica la secuencia de nucleótidos de la proteína o del anticuerpo.

- 5 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden comprender solo una proteína de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario usar una secuencia codificante de la proteína de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar las células. Para la producción de productos que comprenden cadenas pesadas y ligeras, las células pueden transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica una proteína de cadena ligera y un segundo vector que codifica una proteína de cadena pesada. De forma alternativa, se puede utilizar un único vector, incluyendo el vector secuencias que codifican proteínas de cadena ligera y de cadena pesada.
- 10 En una realización preferida, la invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo o un fragmento de proteína de unión al antígeno del mismo que comprende:
- a. cultivar células CHO capaces de producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en un medio;
  - b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es producido por las células, en el que, durante dicha fase de producción, el cultivo se complementa con cisteína o cistina hasta una cantidad total del 10 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo del mismo producido
  - c. y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del medio de cultivo celular,
- 15 en el que la cantidad total de cisteína o cistina aportada durante el proceso es de 2,9 a 12 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,9 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), p. ej., de 5,6 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción, y
- 20 en el que la cisteína o cistina se aporta mediante la adición diaria durante la fase de producción, y en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,9 g/L en cualquier momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción, y
- 25 en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo preferiblemente:
- 1) comprende el CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:1; el CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:2; el CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:3; el CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:4; el CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:5 y el CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:6; o
  - 2) comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8.
- En una realización preferida adicional, la invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende:
- a. cultivar células CHO capaces de producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en un medio;
  - b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es producido por las células, en el que, durante dicha fase de producción, el medio de cultivo celular se complementa con
    - cisteína o cistina hasta una cantidad total del 10 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo producido; y
    - triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 35 % en peso de la cantidad total prevista de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo producido,
  - c. y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del medio de cultivo celular,
- 35 en el que la cantidad total de cisteína o cistina aportada durante el proceso es de 2,9 a 12 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,9 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), p. ej., de 5,6 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción, y
- 40 en el que la cantidad total de triptófano aportada durante el proceso es de 2,5 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,5 a 3,5 g/(10<sup>12</sup> células/L), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción, y
- 45 en el que la cisteína o cistina y triptófano se aportan mediante la adición diaria durante la fase de producción, y

en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,9 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en cualquier momento durante la fase de producción, y

- 5 en el que la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,6 g/L de medio en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en ningún momento durante la fase de producción, y

en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo preferiblemente:

- 10 1) comprende el CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:1; el CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:2; el CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:3; el CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:4; el CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:5 y el CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:6; o

2) comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8.

- 15 La invención se describirá a continuación con más detalle a modo de ejemplos con referencias a realizaciones que se ilustran en los dibujos adjuntos.

## Ejemplos

### Abreviaturas

mAb: anticuerpo monoclonal; MFCS: sistema de control de multif fermentación; Cys: cisteína o cistina;

Trp: triptófano

## 20 Materiales y métodos

### Línea celular, cultivo celular y procedimiento experimental

- 25 Se utilizó una línea celular CHO-DG44. Las células se cultivaron en medios de inoculación sin componentes de origen animal químicamente definidos que contenían cistina (0,05 g/L) y triptófano (0,2 g/L) en condiciones de funcionamiento estándar (pH 7, temperatura 36,8 °C) en un biorreactor de vidrio con tanque agitador de 2 L con torres de suministro (C-DCUII, Sartorius Stedim Biotech) controladas por un sistema de control de multif fermentación (Sartorius Stedim Biotech). Se utilizaron cuatro líneas celulares de producción diferentes, cada una de las cuales produjo un anticuerpo monoclonal (mAb) denominado mAb1, mAb2, mAb3 y mAb4, respectivamente. mAb1 es un anticuerpo anti-FcRn que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 10.

- 30 La producción se llevó a cabo en modo de experimento por cultivo discontinuo durante 14 días. Durante esta fase, los anticuerpos monoclonales se secretan al medio. Se extrajeron muestras diarias para determinar la densidad celular viable (VCD), la viabilidad, el pH fuera de línea, la pCO<sub>2</sub>, la osmolalidad, la concentración de glucosa-lactato, la concentración de aminoácidos y la concentración de mAb (almacenadas a -80 °C). Se añadió antiespumante manualmente según demanda todos los días para controlar la acumulación de espuma. 72 horas después de la inoculación, se inició la adición continua de nutrientes con una tasa predeterminada. El medio de adición continua de nutrientes no comprende cisteína/cistina ni triptófano. En este momento, se añadió cisteína/cistina y triptófano diariamente durante 10 días como un bolo que tenía la cantidad que se describe en los ejemplos siguientes. La cantidad de cisteína/cistina y triptófano descrita en los ejemplos es la cantidad total de la adición de bolo que comienza 72 horas después de la inoculación teniendo en cuenta la cantidad inicial de estos aminoácidos ya presentes en el medio de inoculación. Se añadió un bolo de glucosa al cultivo cuando la concentración de glucosa cayó por debajo de 6 g/L (a partir del día 6 en adelante) y las concentraciones de glucosa se midieron diariamente. Se tomaron muestras para el análisis de aminoácidos antes de la adición del sustrato. Las concentraciones después de la adición del sustrato se calcularon en función de la composición del sustrato y se midió la concentración de nutrientes antes de añadir el sustrato.

## 45 Métodos analíticos

Las células se contaron utilizando un dispositivo de recuento de células automatizado VI-CELL® XR (Beckman-Coulter, Inc., Brea, CA) que funcionaba por la exclusión del azul tripán.

Los niveles de glucosa y lactato en el medio de cultivo se determinaron utilizando un analizador automatizado NOVA 400 BioProfile (Nova Biomedical, Waltham, MA).

- 50 Se utilizó un osmómetro de punto de congelación modelo 2020 (Advanced Instruments, Inc., Norwood, MA) para la determinación de la osmolalidad. Las mediciones de gas y pH fuera de línea se realizaron con un analizador de gases en sangre modelo BioProfile pHox® (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA).



Las concentraciones de metabolitos se determinaron diariamente utilizando un sistema CedexBioHT (Roche).

El análisis del título del producto se realizó con un analizador modelo ForteBio Octet (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA) o cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) de proteína A con muestras de sobrenadante del cultivo celular que se almacenaron a -80 °C antes del análisis.

- 5 Los aminoácidos se analizaron mediante UPLC de fase inversa (método AccQ-Tag Ultra de Waters) después de la ultrafiltración utilizando filtros centrífugos Amicon Ultra de 0,5 mL (Merck Millipore, Billerica, MA).

Se empleó la purificación de la proteína A (sistema AKTA Xpress) para purificar el mAb en las muestras de sobrenadante del cultivo celular. El porcentaje relativo de la isoforma principal, ácida (APG para el grupo de picos ácidos) y básica (BPG para el grupo de picos básicos) del mAb purificado se determinó mediante electroforesis capilar con obtención de imágenes (ProteinSimple iCE3). El nivel de las especies de alto peso molecular (HMWS), monómero y especies de bajo peso molecular (LMWS) del mAb purificado se determinaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-UPLC).

15 La intensidad del color de las formulaciones de mAb1 y mAb2 concentrados se midió en los eluidos de proteína A concentrados usando un espectrofotómetro por transmisión (UltrascanPro) y se comparó con la escala de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE). Los resultados numéricos se normalizaron a la concentración de 40 mg/mL.

La espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS) se realizó en mAb1 purificado. Se llevó a cabo un mapeo de péptidos para identificar modificaciones postraduccionales en los anticuerpos. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS JMP 11.

#### Ejemplo 1

- 20 Se inocularon biorreactores de dos litros con células CHO que produjeron mAb1 con una densidad de siembra de  $0,35 \times 10^6$  células/ml. Se ensayaron ocho condiciones experimentales en un proceso de cultivo discontinuo como se describe en la sección Materiales y métodos, con diversas concentraciones máximas de cisteína o cistina y triptófano alcanzadas durante todo el cultivo celular y diversas cantidades totales de porcentaje en peso de cisteína o cistina (Cys) y triptófano (Trp) sobre el peso total de mAb1 producido (Tabla 2a). El primer objetivo fue evaluar el efecto de la cisteína o la cistina y el triptófano sobre la heterogeneidad del mAb1 recombinante. El segundo objetivo fue identificar si el efecto fue debido a la alta concentración de cisteína o cistina y/o triptófano, alcanzada durante el cultivo celular y/o debido a la cantidad total añadida en % en peso sobre el peso total de mAb producido.

Tabla 2a

ID del biorreactor	Concentración máx. de Cys	Cantidad total en % en peso de Cys/mAb1 (g/g)	Concentración máx. de Trp	Cantidad total en % en peso de Trp/mAb1 (g/g)
1	0,05 g/L	17,51	0,20 g/L	11,79
2	0,05 g/L	13,35	0,20 g/L	10,34
3	0,30 g/L	15,72	0,30 g/L	10,58
4	0,05 g/L	18,94	0,20 g/L	11,27
5	0,12 g/L	16,18	0,20 g/L	9,87
6	0,05 g/L	13,30	0,20 g/L	8,96
7	0,05 g/L	20,79	0,20 g/L	12,37
8	0,05 g/L	20,840612	0,20 g/L	8,5684363

- 30 Las variantes de carga de proteína recombinante y la intensidad del color se midieron como se describe en la sección de materiales y métodos. Los datos se analizaron mediante análisis estadístico Anova unidireccional a partir de un ajuste lineal y los valores de  $p < 0,05$  se consideraron aceptables.

Como se muestra en la figura 2b, hubo una correlación entre una variante de carga del grupo de picos ácidos aumentada en mAb1 (% de APG) y un aumento de la cantidad total de cisteína o cistina añadida por el porcentaje en peso total de mAb1 (g/g) producido.

Con respecto a la intensidad del color de mAb1, hubo una correlación entre una mayor intensidad de color de mAb1 (valor de b\* normalizado a 40 mg/mL) y una mayor cantidad total de triptófano añadido por porcentaje en peso total de mAb1 (g/g) producido (Figura 2a).

Sin embargo, cuando se analizaron los datos con respecto a la concentración máxima de triptófano o cisteína o cistina, no hubo efecto en el color o el APG (Figuras 2c y 2d).

Para confirmar que es la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano por peso total de mAb1 producido lo que afecta a la heterogeneidad de mAb1 y no la concentración máxima de cisteína o cistina y/o triptófano, alcanzada durante toda la fase de producción en un entorno de cultivo discontinuo, se ensayaron 8 condiciones experimentales con diversas adiciones de bolos de cisteína o cistina y triptófano el día 3 para alcanzar una alta concentración de los 2 aminoácidos (Tabla 2b). Para tener la misma cantidad de cisteína o cistina y triptófano añadida en % en peso (g/g) sobre el peso total de mAb1 producido, se adaptó la estrategia de adición de sustrato. Como se muestra en las condiciones del cultivo discontinuo, existe una correlación entre una variante de la carga del grupo de picos ácidos en mAb1 (% de APG)

y un aumento de la cantidad total de cisteína o cistina añadida por porcentaje en peso del total de mAb1 (g/g) producido (Figura 3b) y entre un aumento de la intensidad del color de mAb1 (valor de b\* normalizado a 40 mg/mL) y un aumento de la cantidad total de triptófano añadida por porcentaje en peso del total de mAb1 (g/g) producido (Figura 3a). Sin embargo, no hubo correlación con la variante de carga del APG y la concentración máxima (g/L) de cisteína o cistina y triptófano (Figuras 3c y 3d, respectivamente). Estos resultados confirman que la cantidad total de cisteína y triptófano añadida durante el cultivo celular por porcentaje en peso (g/g) del peso total de mAb1 producido afecta a la variante de carga del APG y a la intensidad del color. La concentración máxima de cisteína o cistina y triptófano no afecta a la variante de carga del APG ni a la intensidad del color.

Tabla 2b

ID del biorreactor	Concentración máxima de Cys (g/L)	Concentración máxima de Trp (g/L)	Cantidad total en % en peso de Cys/mAb1 (g/g)	Cantidad total en % en peso de Trp/mAb1 (g/g)
9	0,06	0,20	13,85	9,34
10	0,06	0,60	17,31	11,71
11	0,90	0,60	16,00	10,79
12	0,48	0,38	13,60	9,17
13	0,90	0,38	13,12	8,88
14	0,90	0,20	13,10	8,84
15	0,06	0,20	14,66	9,88
16	0,48	0,38	13,85	9,37

## Conclusiones

La cantidad total añadida de Cys y Trp en porcentaje en peso del total de mAb1 recombinante (g/g) producido tiene un efecto en la variante de carga del mAb1 y la intensidad del color. Por el contrario, la concentración máxima de cisteína o cistina y triptófano en el medio de cultivo celular no afecta a la calidad del mAb1.

## Ejemplo 2

Para investigar más a fondo el efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el total de mAb producido (g/g), durante un cultivo celular, se prepararon 48 condiciones experimentales (Tabla 3) en biorreactores de 2 L, como se describe en la sección de Métodos. Se analizaron la variante de carga del mAb1, los agregados (HMWS), la intensidad de color, el título y el crecimiento de células viables.

# ES 2 978 394 T3

Tabla 3

ID del biorreactor	Cantidad total en % de Cys/mAb1 (g/g)	Cantidad total en % de Trp/mAb1 (g/g)
17	10,39	26,31
18	10,46	26,50
19	10,00	5,06
20	14,08	71,33
21	47,60	4,82
22	45,43	4,60
23	25,31	12,82
24	25,51	12,92
25	25,03	12,68
26	41,45	42,00
27	40,71	41,24
28	27,20	13,78
29	24,31	12,31
30	70,80	17,93
31	69,81	17,68
32	85,88	4,35
33	236,11	119,60
34	11,75	14,88
35	14,02	14,21
36	10,24	15,56
37	10,31	26,10
38	18,35	15,49
39	32,60	5,50
40	10,21	5,17
41	22,62	6,87
42	51,03	5,17
43	14,81	7,50
44	21,61	10,95
45	13,79	6,99
46	32,08	14,63
47	23,85	12,40
48	23,02	10,50
49	21,37	9,75
50	23,90	10,65
51	23,82	12,10
52	31,33	15,85
53	25,53	16,10
54	24,22	10,41
55	14,66	7,42
56	21,63	10,60
57	13,05	6,60
58	16,31	8,28
59	15,08	7,62

ID del biorreactor	Cantidad total en % de Cys/mAb1 (g/g)	Cantidad total en % de Trp/mAb1 (g/g)
60	12,82	6,48
61	12,36	6,27
62	12,35	6,24
63	13,81	6,98
64	13,05	6,62

Como se muestra en la figura 4, la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos durante una fase de producción en porcentaje en peso sobre el total de mAb1 (g/g) producido afecta al grupo de variantes de carga ácida (% de APG). Hay un efecto de saturación de alrededor del 50 % en peso sobre la cantidad total de cisteína o cistina añadida durante la fase de producción de 14 días por mAb1 total (g/g) producido. El efecto de la cisteína o la cistina y el triptófano es acumulativo sin interacción. Disminuir el porcentaje en peso de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos durante una fase de producción de 14 días sobre el total de mAb1 (g/g) producido disminuye el porcentaje del pico ácido en el mAb1 producido.

La figura 5 muestra el efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano (añadidos a lo largo de 14 días de cultivo celular) en porcentaje en peso sobre el peso total de mAb1 producido en el grupo de picos principales. Como se observa en el % de APG, el efecto de la cisteína o la cistina y el triptófano es acumulativo sin interacción. Disminuir el porcentaje en peso de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos durante una fase de producción de 14 días sobre el peso total de mAb1 producido aumenta el porcentaje del pico principal en el mAb recombinante producido.

La figura 6 muestra el efecto de la cantidad total de cisteína o cistina añadida a lo largo de una fase de producción de 14 días en porcentaje en peso sobre el total de mAb1 (g/g) producido en especies de alto peso molecular (HMWS). Hay un efecto de saturación de alrededor del 50 % de la cantidad total de cisteína o cistina añadida en % en peso durante una fase de producción de 14 días sobre el total de mAb1 (g/g) producido. Disminuir la cantidad total de cisteína o cistina reduce el porcentaje de HMWS en el mAb recombinante producido. No se observa ningún efecto en HMWS relativo a la cantidad total de Trp añadido.

Los resultados que se muestran en la figura 7 ilustran el efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso a lo largo de una fase de producción de 14 días sobre el total de mAb1 (g/g) producido en la intensidad del color (valor de b normalizado a 40 mg/mL) del mAb1 recombinante. Disminuir la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos durante la fase de producción de 14 días reduce la intensidad del color del mAb1 recombinante producido. Existe un efecto de interacción entre la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante una fase de producción de 14 días sobre el porcentaje en peso del total de mAb1 (g/g) producido.

La figura 8 muestra gráficos de contorno que ilustran los intervalos óptimos del porcentaje de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso a lo largo de una fase de producción de 14 días sobre el total de mAb-1 (g/g) producido para lograr los valores más bajos de APG, HMWS, intensidad del color y los valores más altos para el grupo de picos principales; la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos entre el 12,06 y el 28,03 % en peso sobre el total de mAb-1 (g/g) producido para la cisteína o cistina y entre el 8,84 y el 32,06 % en peso sobre el total de mAb1 (g/g) producido para el triptófano.

El recuento integral acumulado de células viables (IVCC) a lo largo de una fase de producción de 14 días se calculó y normalizó mediante el volumen de cultivo celular (CSV). Los resultados mostrados en la figura 9 muestran un efecto del porcentaje de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular por peso inicial de CSV en el IVCC. Existen intervalos óptimos de porcentaje del peso total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular por peso inicial de CSV que están entre el 0,08 % y el 0,24 % para la cisteína o cistina y entre el 0,07 % y el 0,15 % para el triptófano. No se observó ningún efecto sinérgico, solo acumulativo (Figuras 9a y 9b).

Las figuras 10a y 10b muestran el efecto del porcentaje de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular por peso inicial de CSV en el título de mAb1. Existe un intervalo óptimo de porcentaje de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular por peso de CSV que está entre el 0,08 % y el 0,24 % para la cisteína o cistina y entre el 0,07 % y el 0,15 % por porcentaje en peso de triptófano de peso de CSV. No hay efecto de interacción.

Los gráficos de contorno mostrados en las figuras 11a y 11b muestran los intervalos óptimos de cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos al medio de cultivo celular por IVCC\*10<sup>-12</sup> al final de la fase de producción, que están entre 2,9 y 12 g para Cys y entre 2,5 y 7 g para Trp.

## Ejemplo 3

El anticuerpo monoclonal recombinante se caracterizó para 3 condiciones experimentales de cultivo discontinuo como se describe en el material y los métodos con diversas cantidades totales de cisteína o cistina y triptófano añadidas en % en peso sobre el total de mAb1 recombinante producido (Tabla 4).

5

Tabla 4

ID del biorreactor	Cantidad total % de Cys/mAb1 (g/g)	Cantidad total % de Trp/mAb1 (g/g)
65	11,72	7,21
66	22,16	11,89
67	94,20	46,72

10

15

20

El análisis de espectroscopía de masas indicó un cambio de masa del pico más intenso observado en el espectro de masas en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes y para el mAb1 glicosilado como resultado del aumento de la concentración de cisteína o cistina y triptófano. Estas observaciones llevan a la conclusión de que las modificaciones no están relacionadas con alteraciones de los patrones de glicosilación. El análisis de la cadena ligera, la cadena pesada y el semímero (una cadena pesada más una cadena ligera) del espectro de masas después de la deconvolución manual sugiere que se produce una posible glicación del mAb1 con una cantidad total elevada de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso a lo largo de una fase de producción de 14 días sobre el peso total de mAb producido. Posiblemente se puedan observar más aductos, es decir, adiciones de moléculas pequeñas en el mAb1. La aducción de cisteína en la cadena ligera aumenta cuando la cantidad total añadida de cisteína o cistina y triptófano también aumenta. La Tabla 5 muestra el resumen de las características del mAb1, obtenidas por Peptide Mapping, para las tres condiciones experimentales ensayadas. Los resultados muestran que aumentar la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante una fase de producción de 14 días sobre el peso total de mAb producido da lugar a un aumento de la oxidación de la metionina en la posición de la treonina 19 de la cadena pesada y la desamidación en la posición de la treonina 33 de la cadena pesada. Además, las variantes de % de APG y % de BPG del mAb1 aumentan drásticamente con el aumento de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante una fase de producción de 14 días sobre el peso total de mAb producido, mientras que el pico principal aumenta con la disminución de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante una fase de producción de 14 días sobre el peso total de mAb producido.

25

Tabla 5

Características de mAb1	ID del biorreactor		
	65	66	67
Oxidación de la metionina HC T019	10,60 %	15,20 %	19,70 %
Desamidación HC T023	2,60 %	2,10 %	2,20 %
Desamidación HC T033	4,80 %	6,60 %	7,00 %
APG (%)	39,30 %	49,10 %	82,90 %
BPG (%)	6,10 %	7,30 %	2,40 %
Principal (%)	54,70 %	43,70 %	14,80 %

## Ejemplo 4

30

Para identificar concentraciones inhibitoras de cisteína o cistina y triptófano en el crecimiento de una línea celular CHO DG44 que expresa mAb1, se ensayaron diversas adiciones en bolos de cisteína o cistina y triptófano el día 3 con el objetivo de alcanzar una alta concentración de esos aminoácidos (Tabla 2b). Para tener la misma cantidad de cisteína o cistina y triptófano añadida de porcentaje en peso sobre el peso total de mAb1 producido, se adaptó la estrategia de adición de sustrato. La figura 12 muestra que una alta concentración de cisteína o cistina y triptófano

desde 0,3 g/L hasta 0,9 g/L y 0,6 g/L, respectivamente, reduce significativamente el crecimiento celular (IVCC acumulativo a lo largo de una fase de producción de 14 días normalizada por el CSV).

#### Ejemplo 5

- 5 Se planteó la hipótesis de que el agotamiento de cisteína o cistina puede tener un efecto en el crecimiento y la productividad de una línea celular CHO que expresa mAb1. Se analizaron nueve condiciones experimentales en biorreactores de 2 L (Tabla 6a): tres condiciones de control sin agotamiento de cisteína o cistina durante todo el proceso de la fase de producción, dos condiciones experimentales con agotamiento diario comenzando el día 6 y continuando hasta el final del proceso de producción de cultivo discontinuo con una concentración de cisteína o cistina en el sustrato de 6.87 g/L y cuatro condiciones experimentales con agotamiento de cisteína o cistina el día 6 y con una concentración de cisteína o cistina en el sustrato de 17.17 g/L. El agotamiento es cíclico debido a la adición diaria de cisteína o cistina. La estrategia de adición de sustrato se describe en la Tabla 6b. La cantidad total de cisteína o cisteína añadida y la cantidad total de cisteína o cisteína añadida por IVCC se muestran en la figura 13. La concentración de Cys antes de la adición de sustrato se muestra en la figura 14c. Como se muestra en la figura 14a, el agotamiento de cisteína o cistina el día 6 no afecta al crecimiento celular si la concentración de cisteína o cistina en el sustrato es de alrededor de 17,17 g/L. Sin quedar vinculado a ninguna teoría, se cree que la cisteína o los metabolitos relacionados con la cistina se acumulan y almacenan dentro de las células y están disponibles cuando la cisteína o la cistina se agotan. Sin embargo, la productividad de la línea celular de mAb1 se ve afectada por el agotamiento de cisteína o cisteína (Figura 14b).

Tabla 6a

ID del biorreactor	Concentración de Cys en el sustrato añadido (g/L)	Cantidad total de Cys añadido por IVCC el día 14 (g/10 <sup>12</sup> células)
68	34,35	12,24
69	34,35	13,10
70	34,35	9,51
71	6,87	4,32
72	6,87	4,29
73	17,17	4,69
74	17,17	5,07
75	17,17	4,59
76	17,17	4,24

20

Tabla 6b

Día del cultivo	Cantidad de sustrato añadido (% de CSV / 24 horas)
0	0
1	0
2	0
3	0,2
4	0,28
5	0,36
6	0,36
7	0,68
8	0,68
9	0,84
10	0,84
11 %	0,72
12	0,72
13	0
14	0

## Ejemplo 6

El efecto de la reducción de la heterogeneidad causada por el control de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante una fase de producción sobre el total de mAb recombinante no es exclusivo del mAb1; se ensayaron experimentos sobre la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos con otras tres líneas celulares CHO que también producen anticuerpos recombinantes (Tabla 7). Como se muestra en la figura 15a, un aumento de la variante de carga del APG y la intensidad del color se correlacionan con un aumento de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el mAb2 total. Se obtuvieron resultados parecidos al analizar la variante de carga del APG para mAb3 (15b). Finalmente, un aumento de las variantes de carga del APG y BPG y una disminución en el pico principal se correlacionaron con un aumento de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el mAb4 total (15c). Estos resultados confirman los resultados obtenidos para mAb1.

Tabla 7

Biorreactor ID	mAb	Cantidad total en % de Cys/mAb (g/g)	Cantidad total en % de Trp/mAb (g/g)
77	mAb2	24,02	14,89
78	mAb2	53,01	29,09
79	mAb2	33,35	21,81
80	mAb2	58,67	32,26
81	mAb3	15,97	17,25
82	mAb3	10,92	16,26
83	mAb4	81,15	57,12
84	mAb4	170,18	62,51
85	mAb4	151,22	55,55
86	mAb4	85,45	60,14

## Ejemplo 7

El efecto de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante los 14 días de producción sobre el peso total de mAb recombinante producido se analizó en base a los datos de los cuatro anticuerpos monoclonales diferentes ensayados en la presente memoria (Tablas 3 y 7). Como se muestra en la figura 16 (a y b), el aumento de la variante de carga del APG se correlaciona con un aumento de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el peso total del anticuerpo recombinante producido para los cuatro anticuerpos analizados. Los resultados confirman que la relación entre la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el peso total del anticuerpo recombinante producido y la heterogeneidad de un anticuerpo no se limita a un anticuerpo específico, sino que se aplica a cualquier anticuerpo.

## Ejemplo 8

## Formulaciones farmacéuticas líquidas

Las formulaciones farmacéuticas del anticuerpo monoclonal mAb1 se fabricaron en modo de cultivo discontinuo a gran escala, es decir, en un biorreactor de acero inoxidable de 2000 litros, en las condiciones de funcionamiento estándar descritas en el material y los métodos con diversas cantidades totales de cisteína o cistina y triptófano añadidas según se especifica en la Tabla. 9. El tampón de la muestra de anticuerpo se sustituyó por un tampón de diafiltración (His 33 mM y Pro 250 mM, pH 5,6) por lo menos 7 veces (7 diavolumenes) seguido de ultrafiltración usando una membrana con un peso molecular de corte (MWCO) de 30 kDa.

Se añadió polisorbato 80 a la concentración requerida (0,03 % p/v sobre la base de la concentración final) una vez que se alcanzó la concentración del anticuerpo (140 mg/ml +/- 14 mg/ml). La concentración del anticuerpo se midió usando UV A280.

La Tabla 8 muestra el aspecto de las variantes de carga del mAb1 formulado. En dos producciones definidas como "mayor adición de Cys" en las Tablas 8 y 9 con mayor cantidad total de cisteína o cistina añadida en % en peso sobre el total de mAb1 recombinante producido que las otras tres producciones se definen como "menor adición de Cys" en las tablas 8 y 9. El aumento de la variante de carga del APG se correlaciona con un aumento de la cantidad total de cisteína o cistina añadida en % en peso sobre el total de mAb1 recombinante producido.

Tabla 8

	Adición de Cys más alta	Adición de Cys más alta	Adición de Cys más baja (Ejecución n.º 1)	Adición de Cys más baja (ejecución n.º 2)	Adición de Cys más baja (ejecución n.º 3)
iCE % de APG	50,4 %	45,5 %	38,2 %	36,4 %	41,3 %
iCE % de pico principal	40,6 %	44,7 %	54,6 %	54,9 %	48,7 %
iCE % de BPG	9,0 %	9,8 %	7,2 %	8,7 %	9,9 %

	Adición de Cys más alta (Ejecución n.º 1)	Adición de Cys más alta (Ejecución n.º 2)	Adición de Cys más baja (Ejecución n.º 3)	Adición de Cys más baja (Ejecución n.º 4)	Adición de Cys más baja (Ejecución n.º 5)
Cantidad total % en peso de Cys/mAb1 (g/g)	15,66	14,10	12,20	12,36	12,77
Cantidad total % en peso de Trp/mAb1 (g/g)	8,89	8,00	8,13	8,22	8,50

## 5 Ejemplo 9

Se desarrolló un modelo para predecir el nivel en el grupo de picos ácidos (APG) a partir de los datos (Tablas 3) de una línea celular CHO DG44 que expresa anticuerpos mAb1 (Figura 17). El APG se expresa en función de la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso durante los 14 días de producción sobre el peso total de mAb recombinante producido usando la cinética de Michealis-Menten.

- 10 Para aplicar el modelo a la producción de perfusión, cada día de producción de perfusión se definió como un nuevo lote de producción. Por lo tanto, las proporciones de las cantidades totales de cisteína o cisteína y/o triptófano utilizadas se calculan según el caudal de perfusión frente a la tasa de eliminación de proteína recombinante producida en el recipiente de producción. Se realizó una producción de perfusión en biorreactores de 2 L utilizando tecnología de flujo tangencial alterno (ATF). Como se muestra en la figura 18, la predicción de la variante de carga del APG
- 15 concuerda perfectamente con los datos experimentales. Los resultados confirman que la relación entre la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano añadidos en % en peso sobre el peso total del anticuerpo recombinante producido y la heterogeneidad de un anticuerpo se puede extender a otros modos de producción, tales como producciones en modo de perfusión, discontinuo o quimiostato.



## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una proteína recombinante que comprende:

a. cultivar células huésped capaces de producir una proteína recombinante en un medio sin productos de origen animal, en el que las células huésped son células CHO;

5 b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que la proteína recombinante es producida por las células, en el que, durante dicha fase de producción, el cultivo se complementa con

- cisteína o cistina hasta una cantidad total del 10 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida; y

10 • triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 35 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida,

c. y, opcionalmente, recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular, en el que se realizan uno o más experimentos iniciales para determinar la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

15 2. El proceso según la reivindicación 1, en el que el cultivo se complementa con cisteína o cistina hasta una cantidad total del 12 % en peso al 28 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 12 % en peso al 25 % en peso, p. ej., del 12 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

20 3. El proceso según la reivindicación 1 o 2, en el que el cultivo se complementa con triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida, tal como una cantidad total del 8 % en peso al 25 % en peso, p. ej., del 8 % en peso al 20 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.

4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad total de cisteína o cistina aportada durante el proceso es de 2,9 a 12 g/(10<sup>12</sup> células), tal como de 2,9 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), p. ej., de 5,6 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción.

25 5. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cantidad total de triptófano aportada durante el proceso es de 2,5 a 7 g/(10<sup>12</sup> células), tales como de 2,5 a 3,5 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción.

6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cantidad total de cisteína o cistina y triptófano en el cultivo se alcanza al añadir cisteína o cistina y triptófano al medio de cultivo celular:

a. al comienzo de la fase de producción,

30 b. una o múltiples veces en cualquier momento durante la fase de producción,

c. mediante adición continua durante la fase de producción, o

d. en cualquier combinación de a., b. y c.

7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el proceso es un proceso discontinuo, tal como un proceso de cultivo discontinuo.

35 8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cisteína o cistina y triptófano se aportan mediante la adición diaria durante la fase de producción.

9. El proceso según la reivindicación 8, en el que la cisteína o cistina se agota en el cultivo antes de añadir cisteína o cistina al día siguiente, p. ej., al reducir la adición de cisteína o cistina a un nivel entre 5,6 y 7 g/(10<sup>12</sup> células), en el que por células se refiere al recuento integral de células viables previsto al final de la fase de producción.

40 10. El proceso según la reivindicación 8 o 9, en el que durante la última etapa de producción, es decir, cuando las células ya han alcanzado la densidad celular viable máxima, el triptófano se agota en el cultivo antes de que se añada triptófano al día siguiente.

45 11. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,9 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente en el que la concentración de cisteína o cistina en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L en cualquier momento durante la fase de producción.

12. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de triptófano en el medio de cultivo celular no sobrepasa los 0,6 g/L en ningún momento durante la fase de producción, preferiblemente

en el que la concentración de triptófano en el cultivo celular no sobrepasa los 0,3 g/L del medio en cualquier momento durante la fase de producción.

13. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fase de producción se realiza durante por lo menos 7 días, preferiblemente por lo menos 14 días.

5 14. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en cualquier momento durante la segunda mitad de la fase de producción:

- la cantidad de cisteína o cistina en el cultivo es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
- la cantidad de triptófano en el cultivo es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.

10 15. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en cualquier momento durante la fase de producción:

- la cantidad de cisteína o cistina en el cultivo es del 10 % en peso al 30 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida; y
- la cantidad de triptófano en el cultivo es del 8 % en peso al 35 % de la cantidad prevista de proteína recombinante producida.

16. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína recombinante es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

17. El proceso según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es:

20 1) un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que

a. comprende el CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 1; el CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 2; el CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 3; el CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 4; el CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 5 y el CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 6; o

25 b. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8; o

c. comprende una región variable ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 8;

30 d. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 11; o

e. comprende una región variable ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido a la secuencia definida en SEQ ID NO: 11; o

2) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 10; o

40 3) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada que tiene por lo menos el 80 % de identidad o parecido, preferiblemente el 90 % de identidad o parecido con la secuencia definida en SEQ ID NO: 10.

45 18. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fase de producción se lleva a cabo en un biorreactor, preferiblemente con un volumen igual o superior a 50 L, igual o superior a 100 L, igual o superior a 500 L, igual o superior de 1.000 L, igual o superior a 2.000 L, igual o superior a 5.000 L, igual o superior a 10.000 L o igual o superior a 20.000 L.

19. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el proceso comprende la etapa de recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular y una etapa adicional de purificar la proteína recombinante.

20. El proceso según la reivindicación 19, en el que la purificación comprende cromatografía de proteína A.
21. El proceso según la reivindicación 19 o 20, que comprende además la etapa de formular la proteína recombinante purificada.
- 5 22. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el proceso reduce la heterogeneidad de las proteínas recombinantes producidas, en el que dicha reducción de la heterogeneidad comprende reducir:
- a. la heterogeneidad de carga, preferiblemente del grupo de picos ácidos (APG); y/o
  - b. oxidación, isomerización, fragmentación de aminoácidos, glicación, desamidación, cisteinilación de otros aductos covalentes; y/o
  - c. color o intensidad del color, p. ej., entre diferentes lotes de la proteína recombinante; y/o
  - 10 d. especies de alto peso molecular (HMWS); y/o
  - e. inestabilidad de la proteína recombinante.
23. Un método para reducir la heterogeneidad de la población de proteínas recombinantes en un lote producido en fase de producción por células huésped recombinantes, en el que las células huésped son células CHO, que comprende
- 15 a. cultivar células huésped capaces de producir una proteína recombinante en un medio sin productos de origen animal,
  - b. hacer progresar el cultivo a través de una fase de producción en la que la proteína recombinante es producida por las células, en el que, durante dicha fase de producción, el cultivo se complementa con
- 20 • cisteína o cistina hasta una cantidad total del 10 % en peso al 30 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida; y
  - triptófano hasta una cantidad total del 8 % en peso al 35 % en peso de la cantidad total prevista de proteína recombinante producida
- y, opcionalmente, recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo celular, en el que se realizan uno o más experimentos iniciales para determinar la cantidad total prevista de proteína recombinante producida.
- 25 24. El método según la reivindicación 23, en el que el proceso tiene una o más de las características adicionales enumeradas en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 22.

Fig. 1

**A**

$$\text{Cantidad de Cys añadida} = C_{\text{cys}} * F + C_{\text{cys2}} * V$$

F = volumen de sustrato añadido [L]

$C_{\text{cys}}$  = concentración de sustrato (Cys) [g/L]

V = volumen del bioreactor [L]

$C_{\text{cys2}}$  = concentración del medio (Cys) [g/L]

**B**

$$\text{Cantidad de RC producida} = C_{\text{RC}} * V_F$$

RC = polipéptido recombinante

$V_F$  = volumen final del bioreactor [L]

$C_{\text{RC}}$  = título final de RC [g/L]

**C**

$$\text{Relación \% Cys/RC} = \text{Cantidad de Cys añadida} * 100 / \text{Cantidad de RC producida}$$

Fig. 2

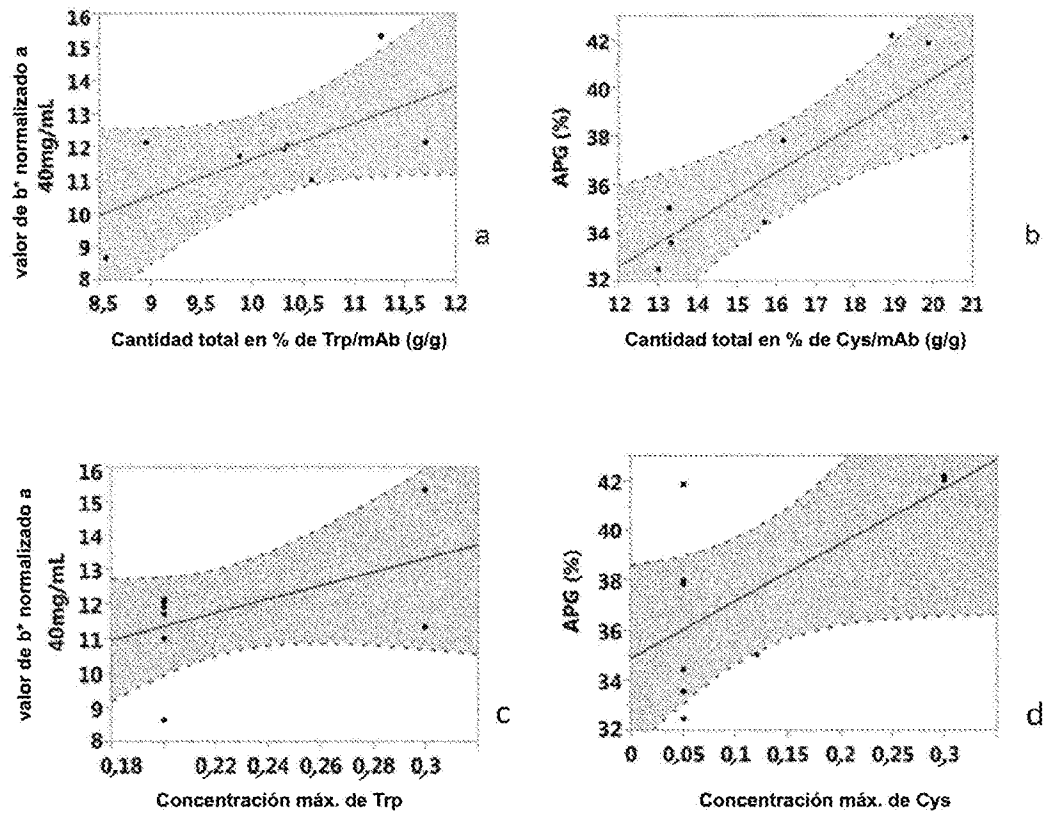


Fig. 3

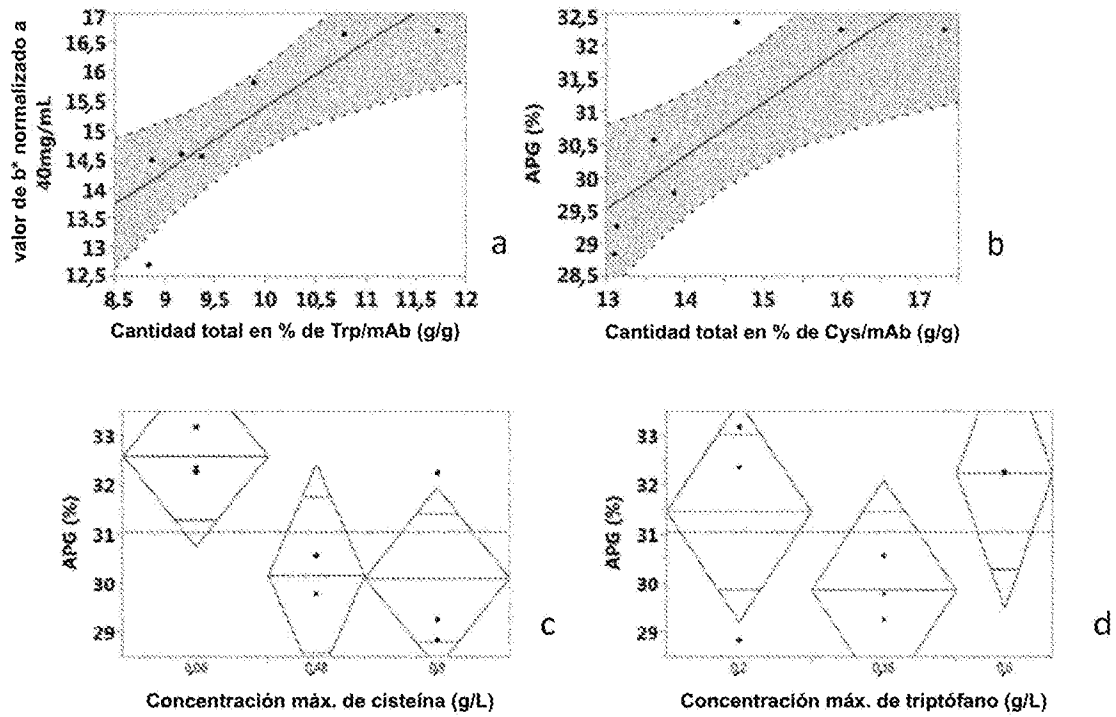


Fig. 4

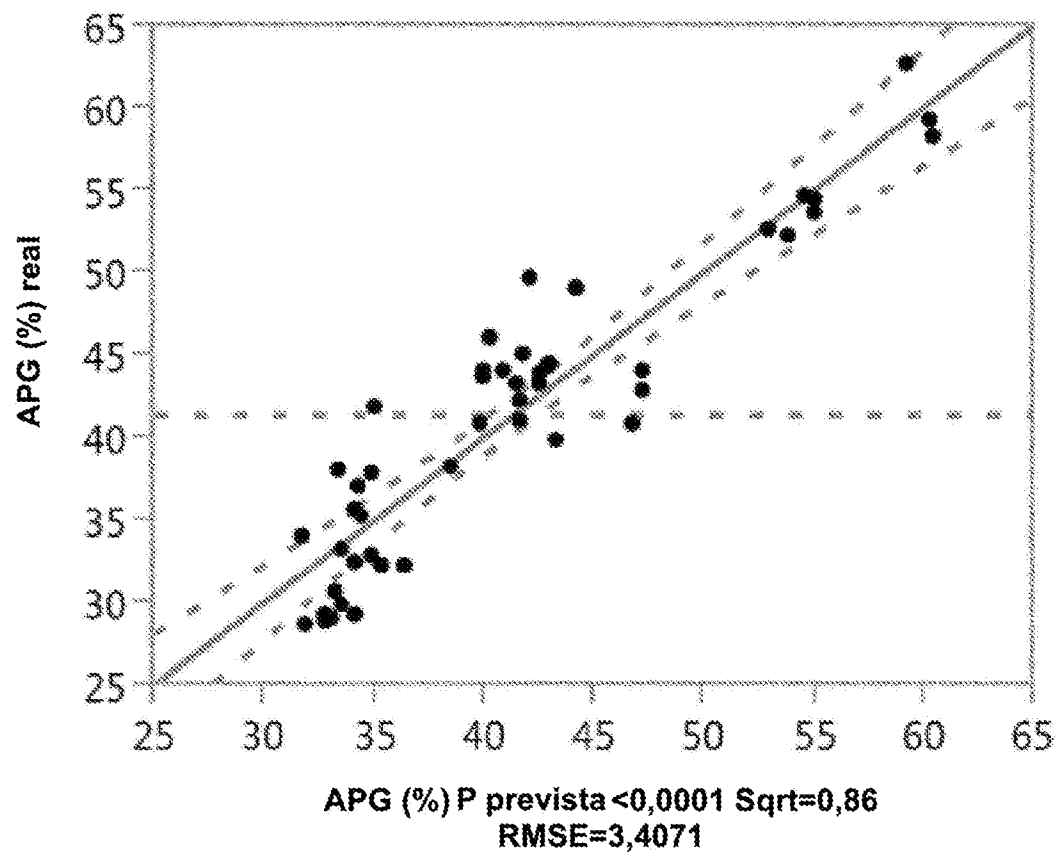


Fig. 5

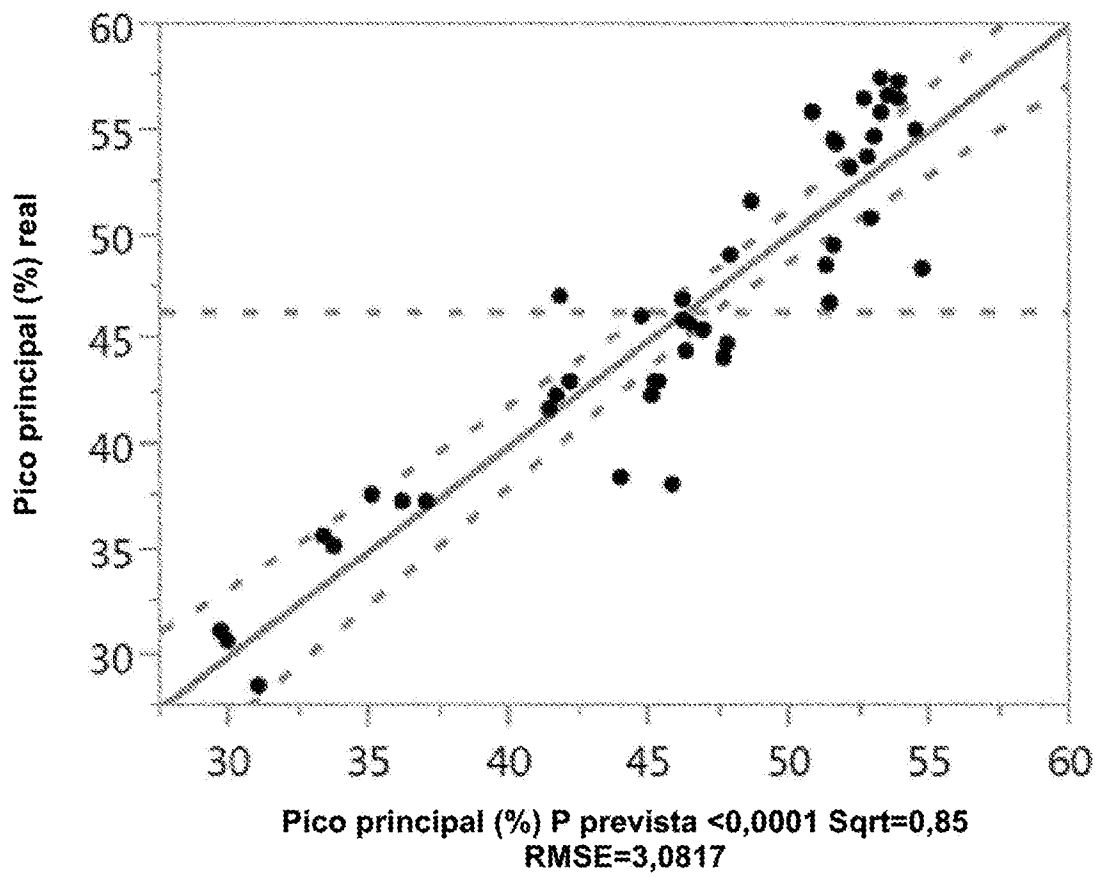




Fig. 6

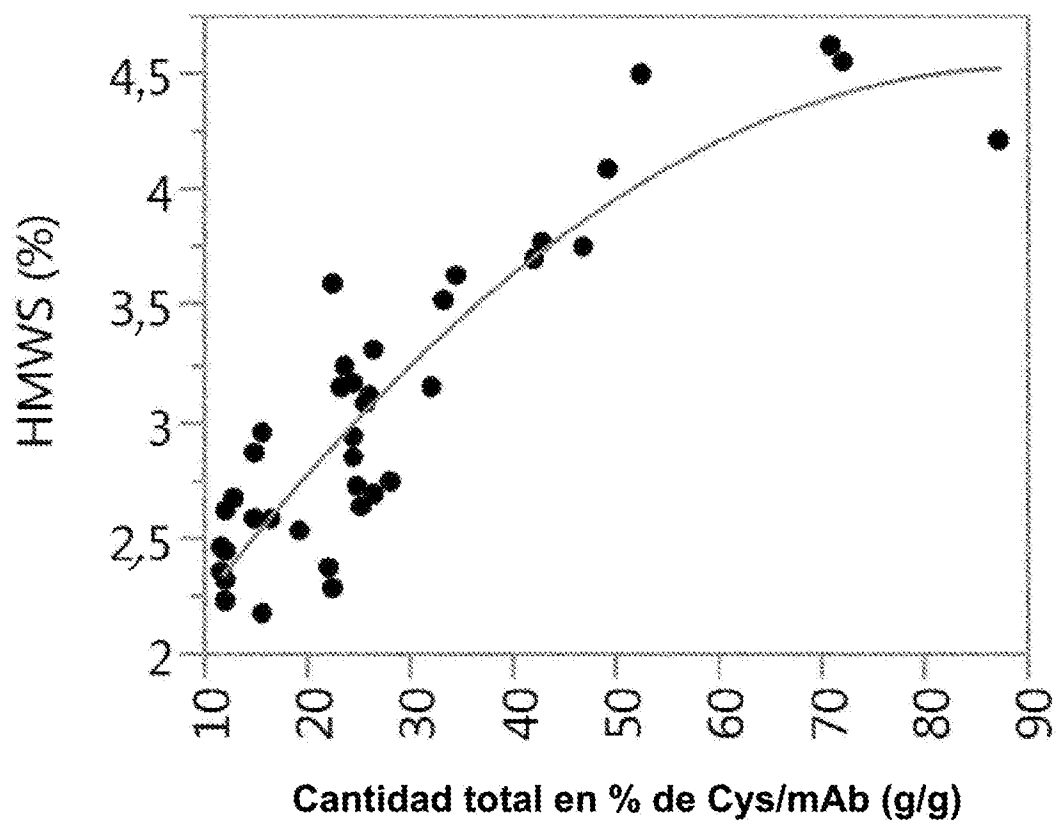


Fig. 7

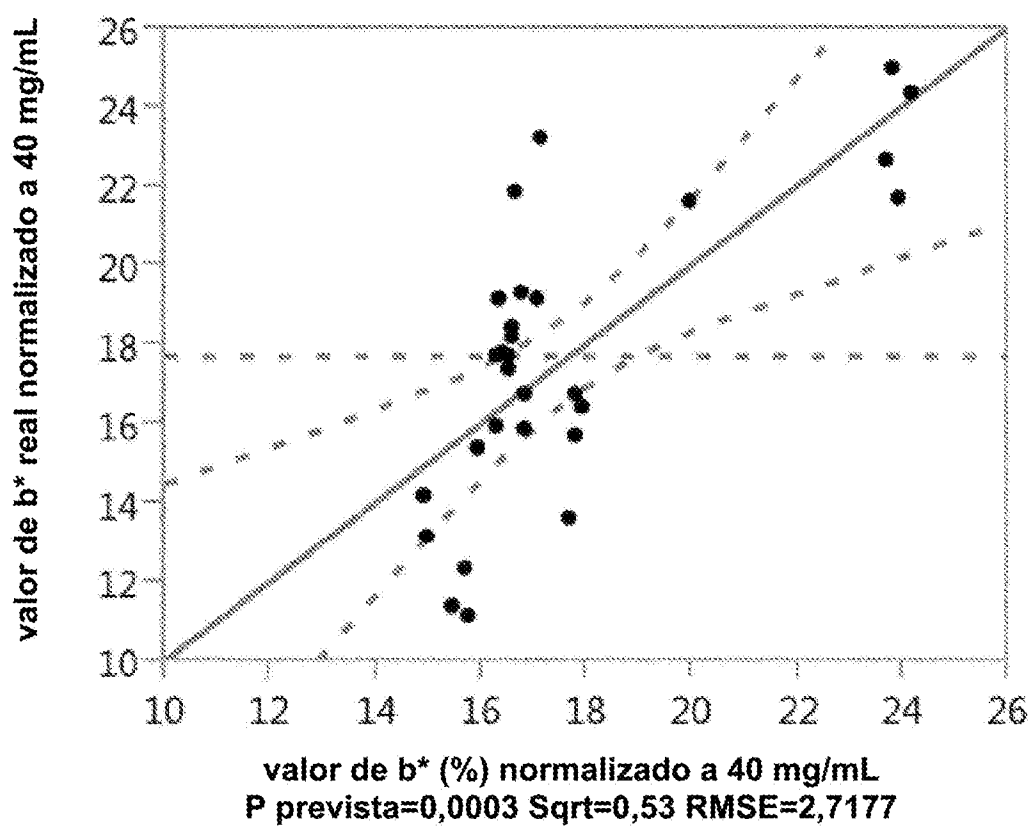
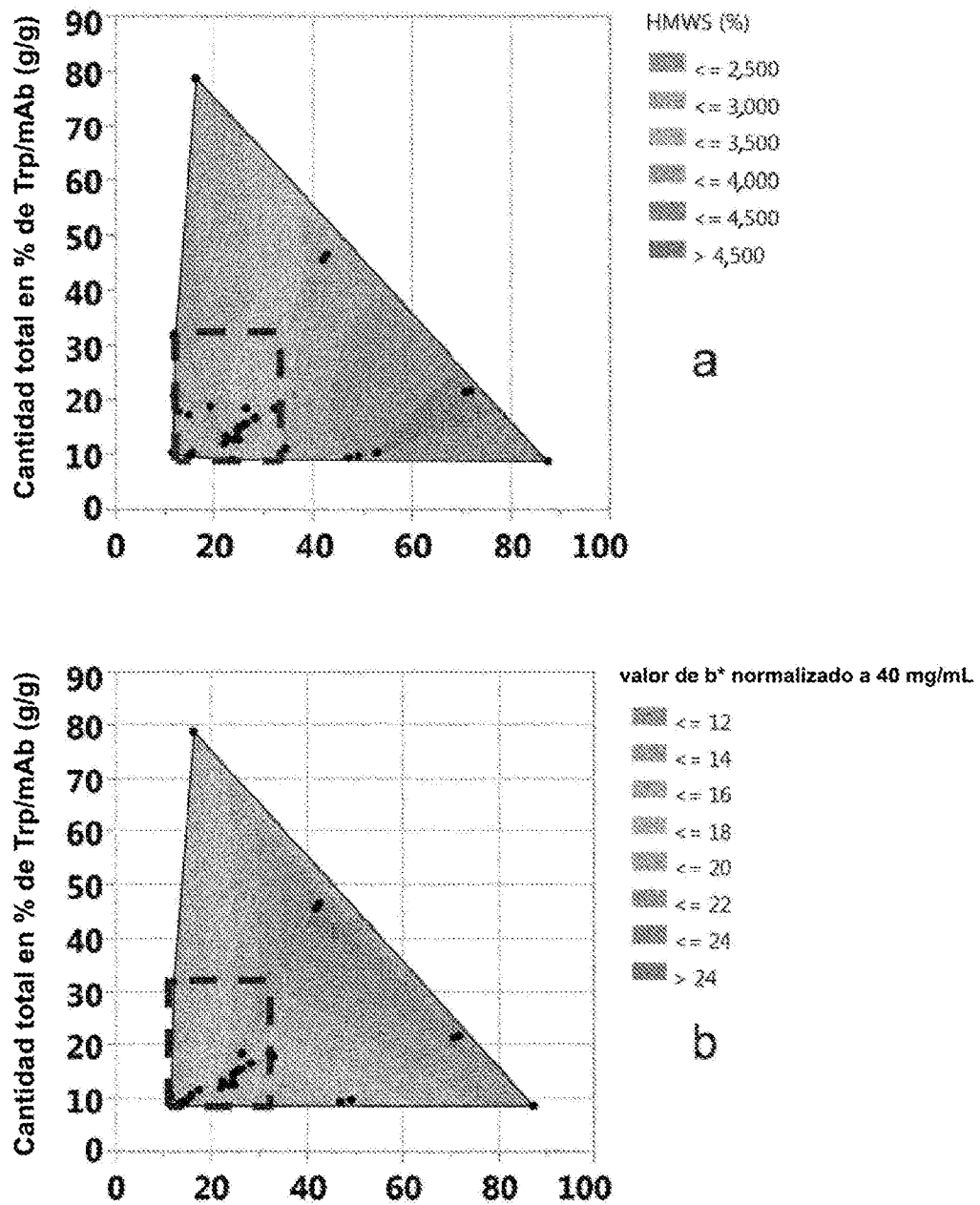


Fig. 8



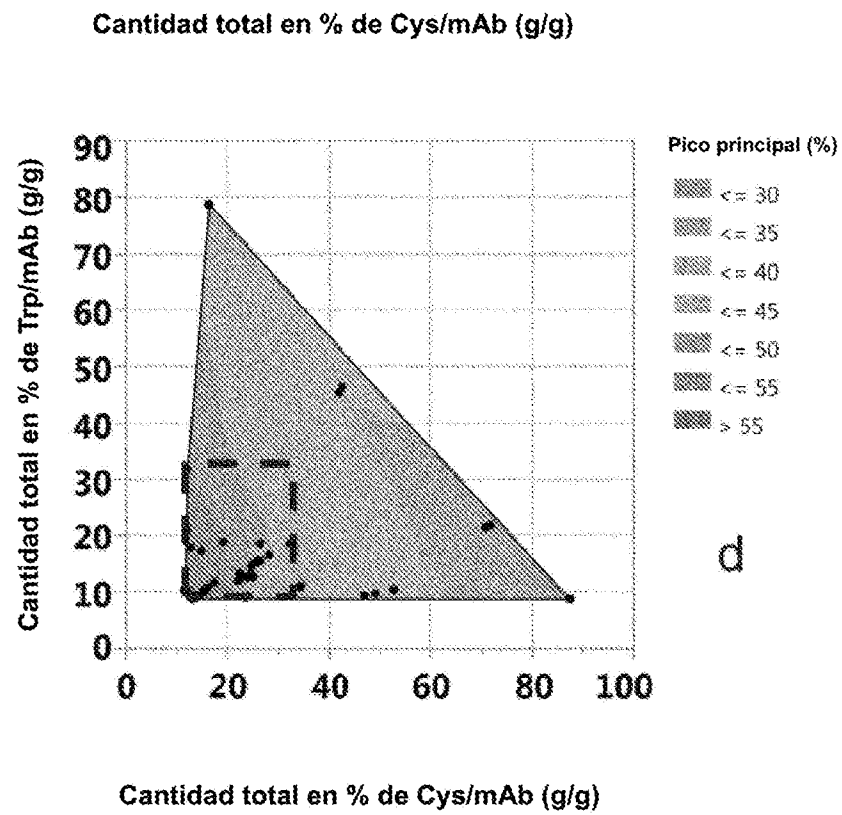
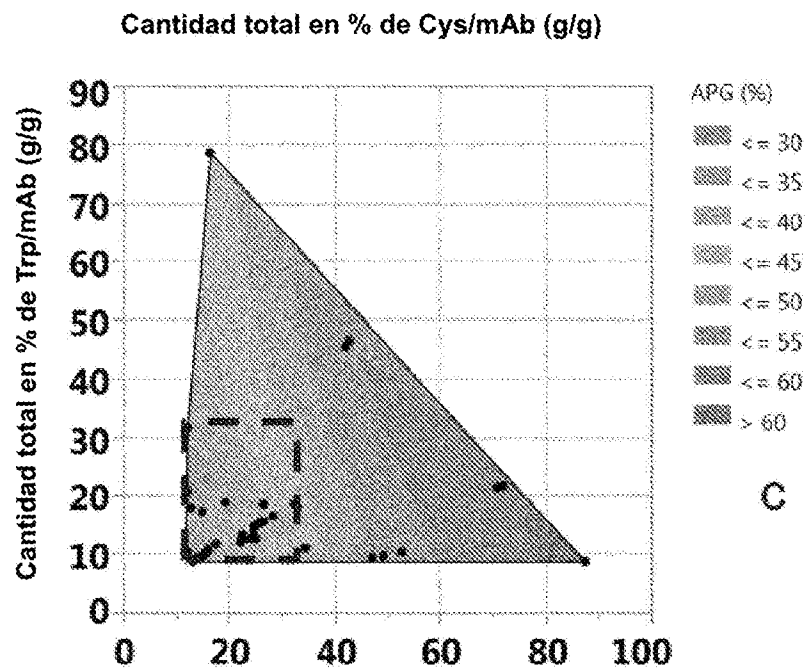


Fig 9

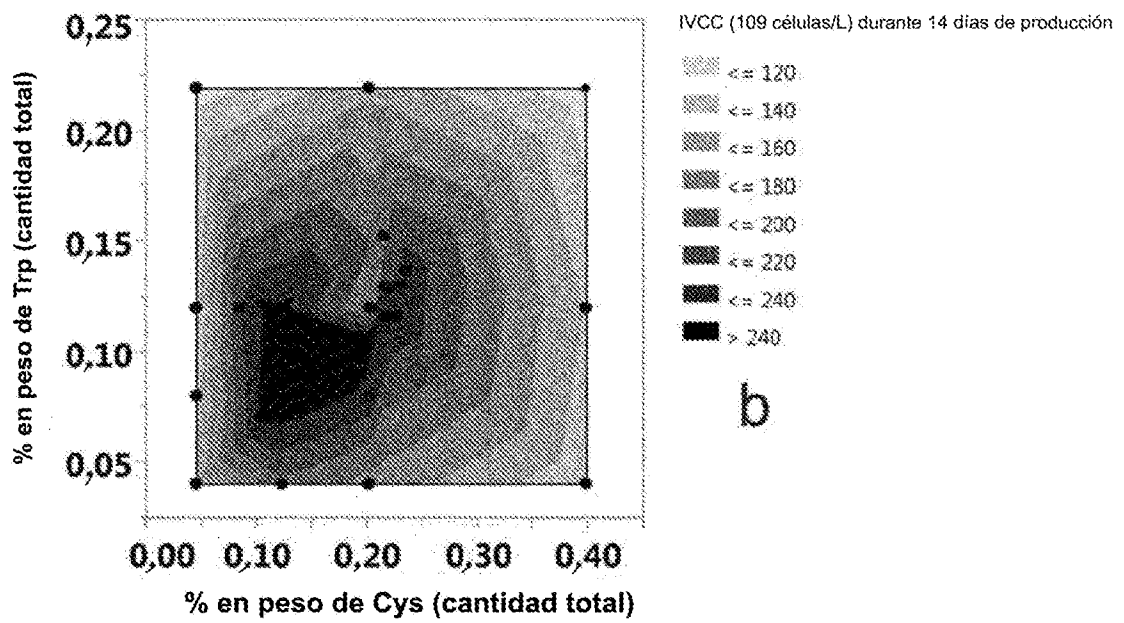
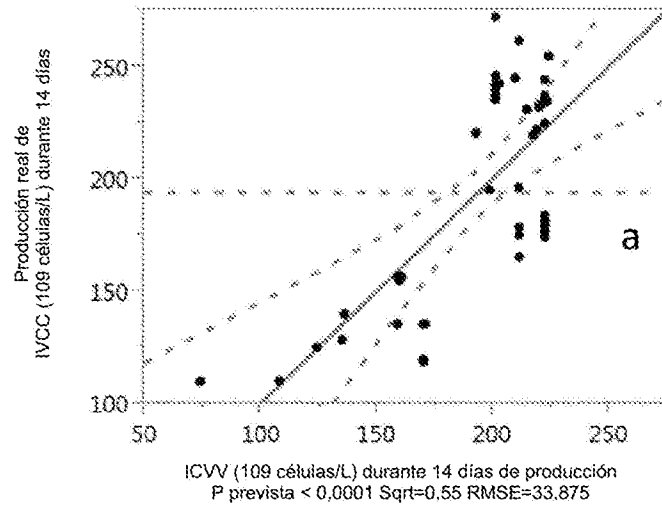


Fig. 10

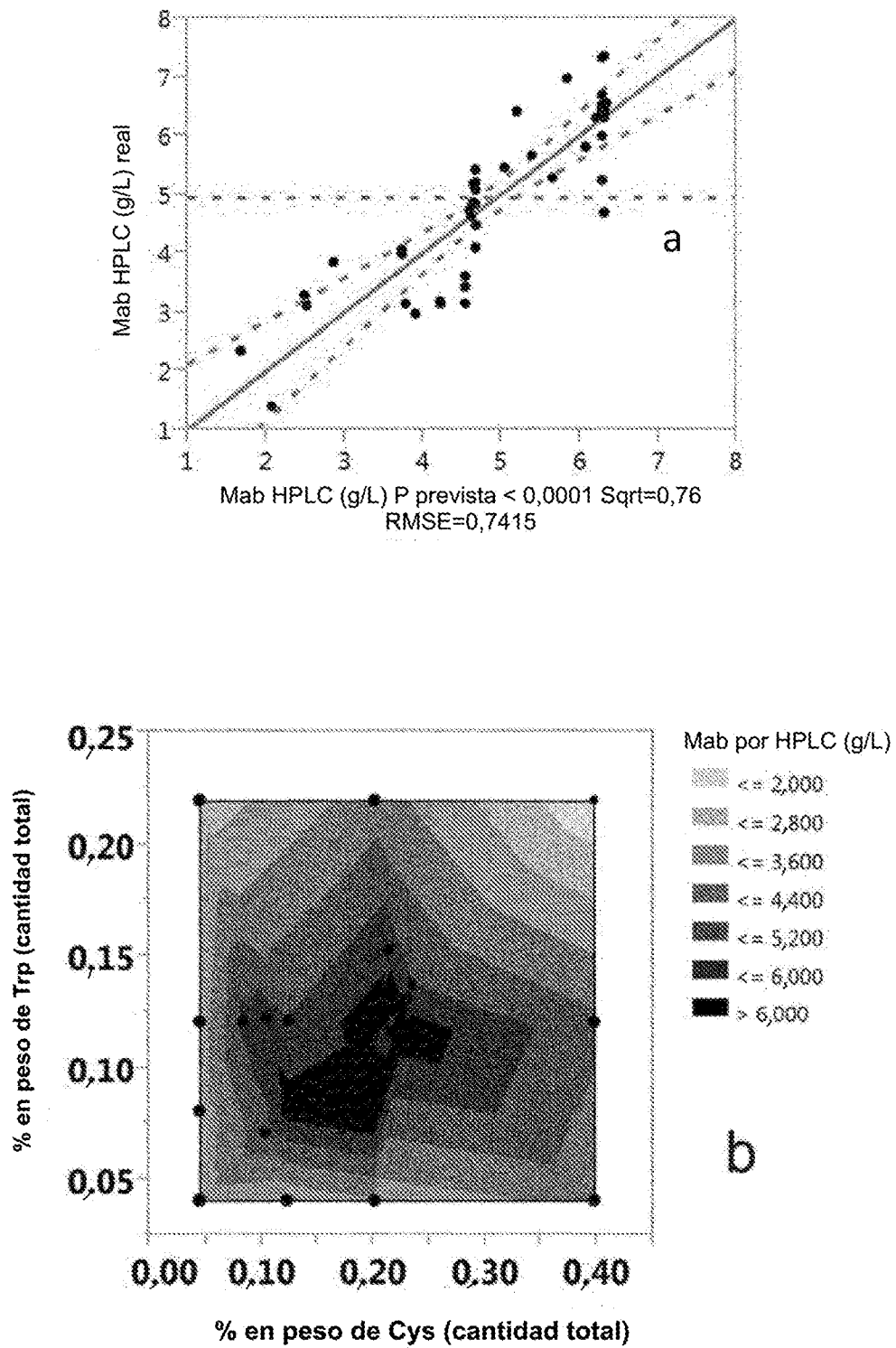
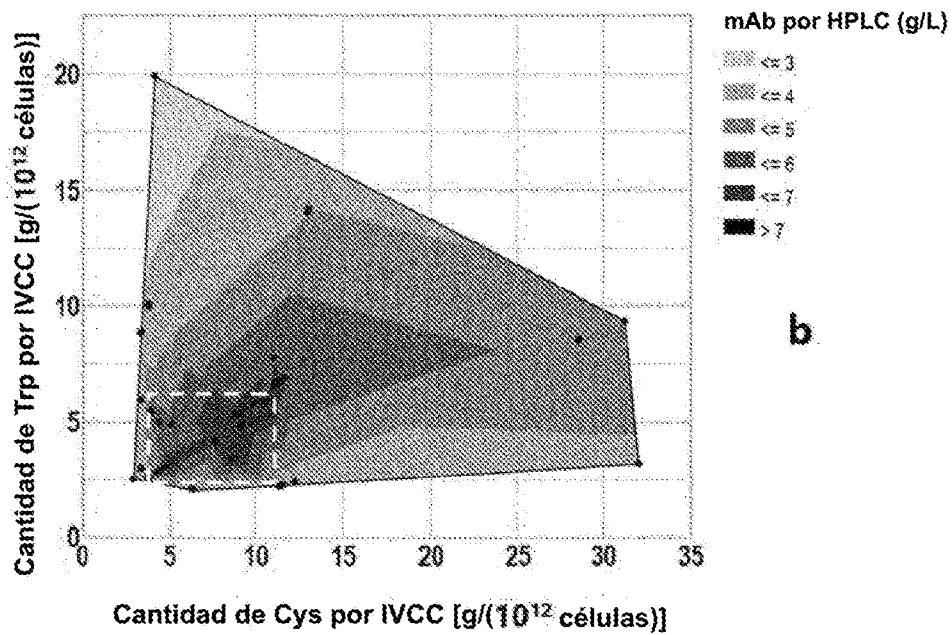
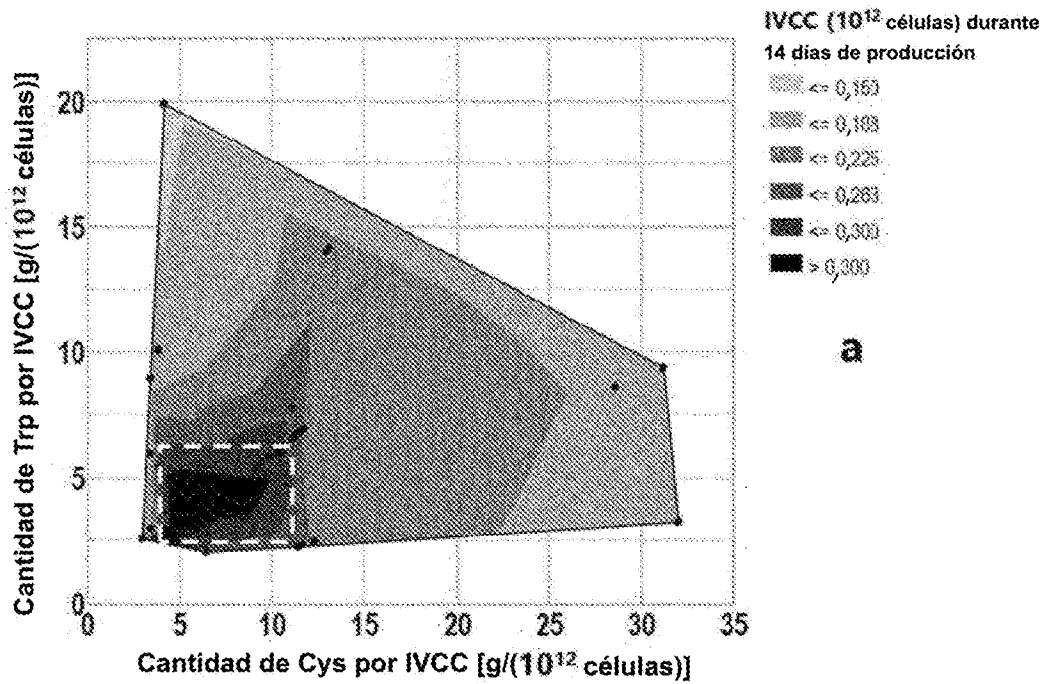


Fig. 11



$$\text{Cantidad de Cys por IVCC} = \frac{\text{Cantidad de Cys añadida}}{\text{IVCC} \times 10^{-12}}$$

$$\text{Cantidad de Trp por IVCC} = \frac{\text{Cantidad de Trp añadida}}{\text{IVCC} \times 10^{-12}}$$

**c**

Fig. 12

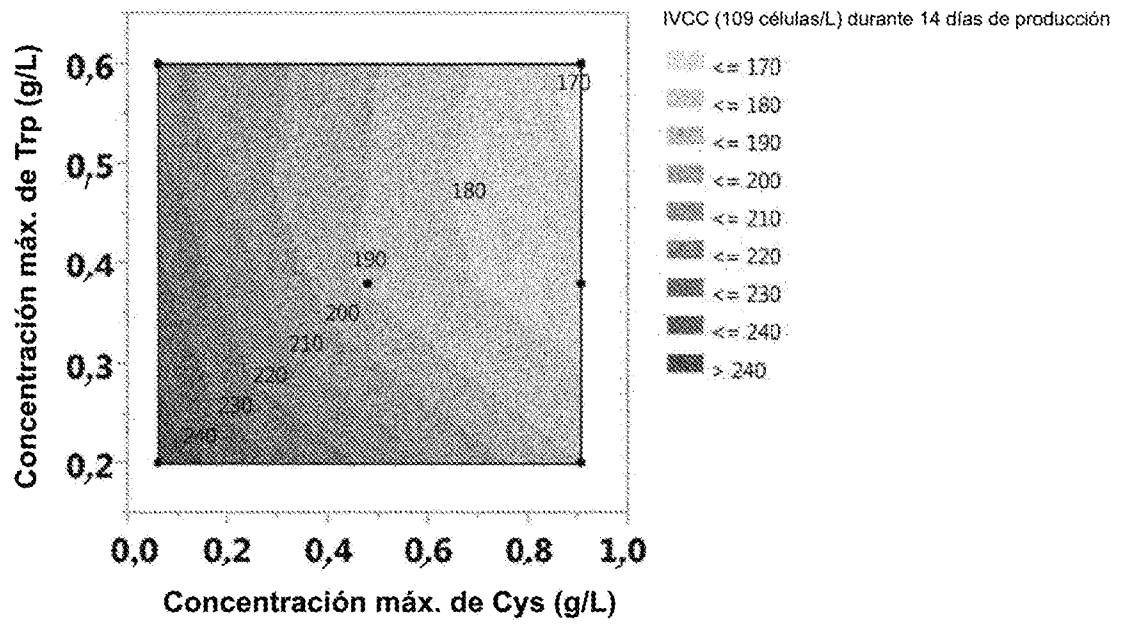




Fig. 13

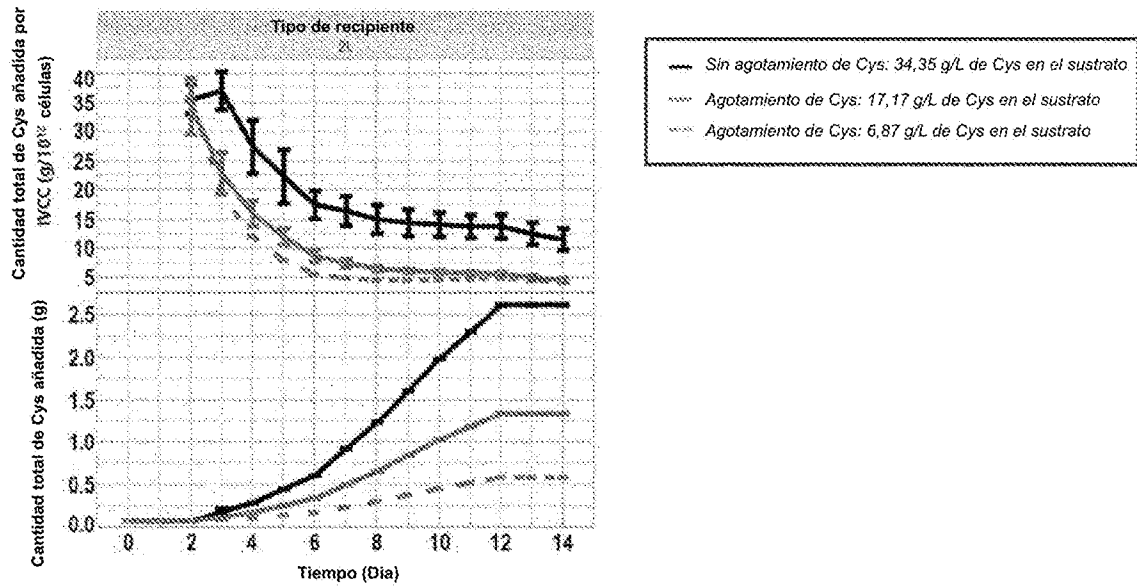


Fig. 14

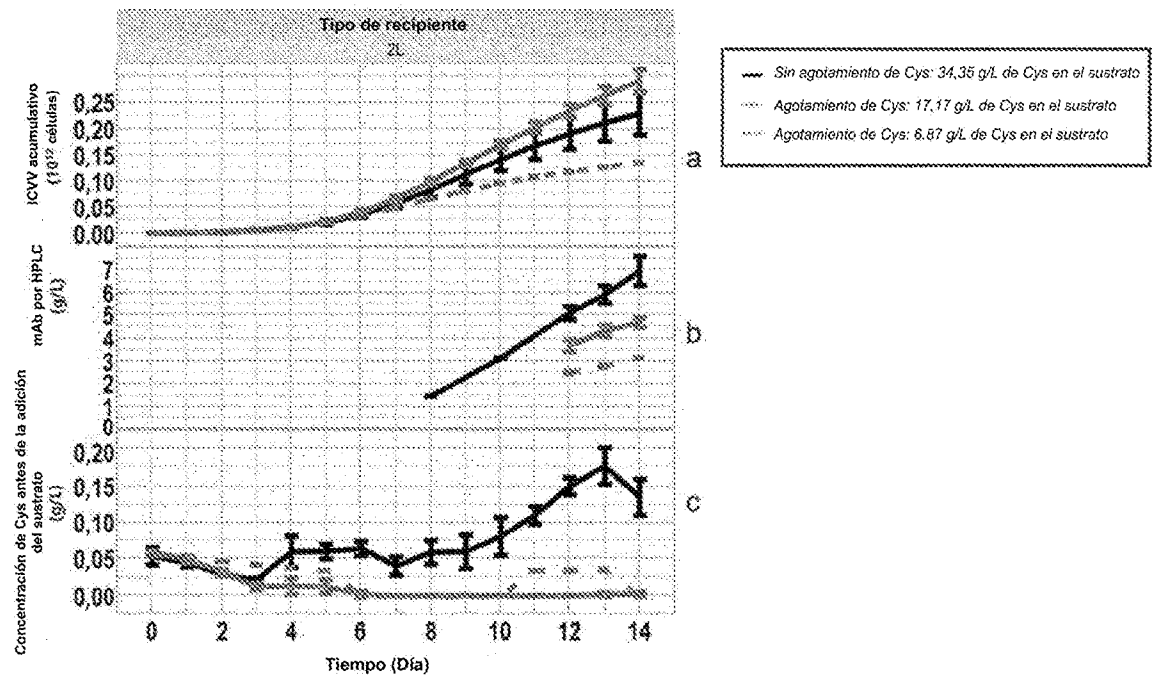


Fig. 15

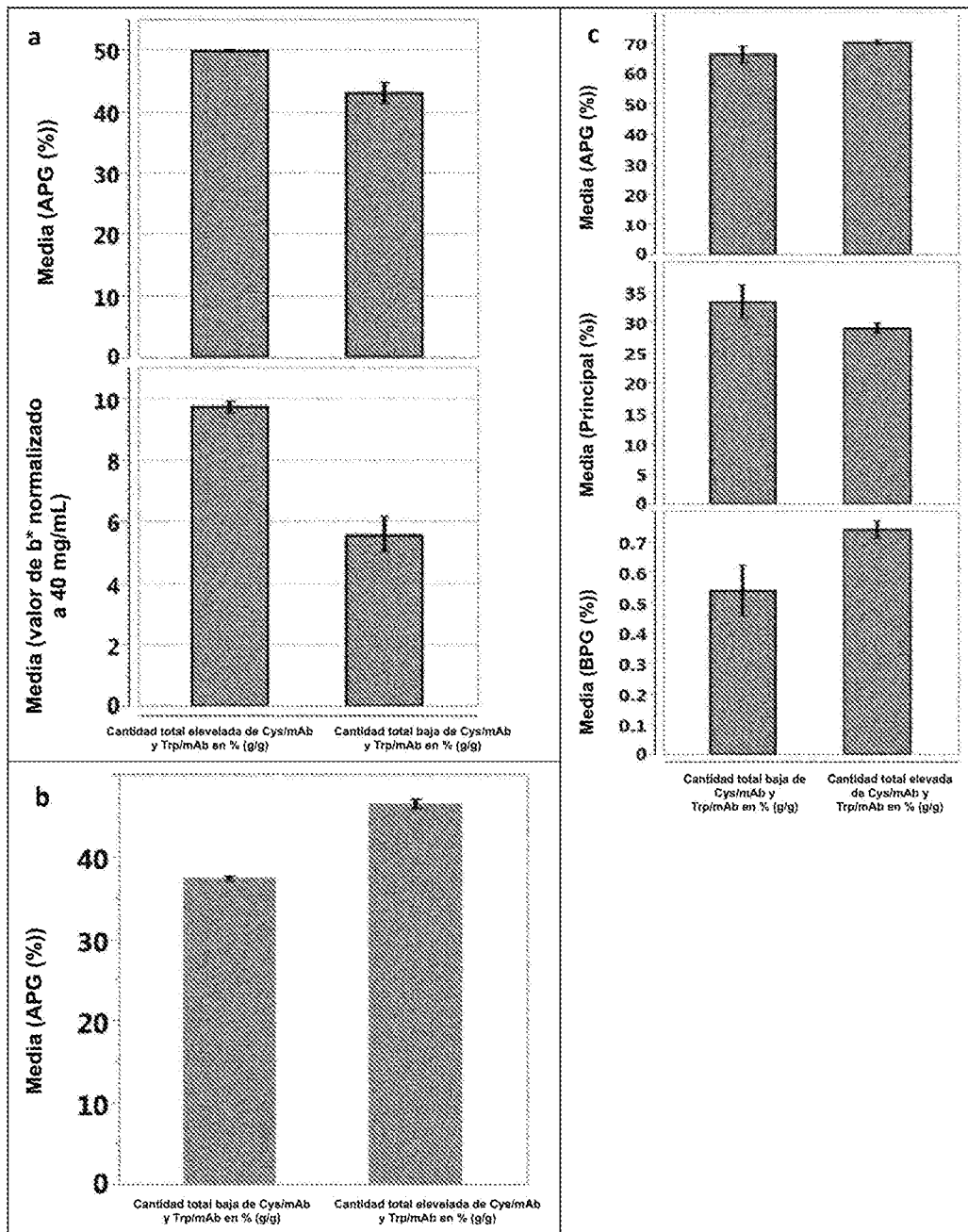
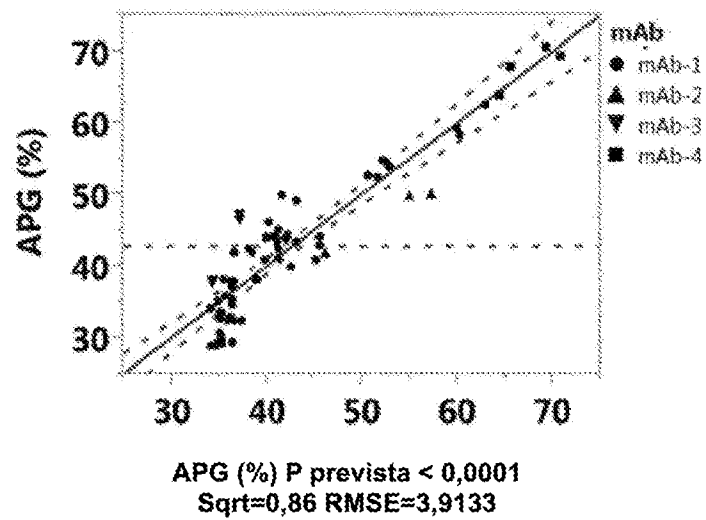
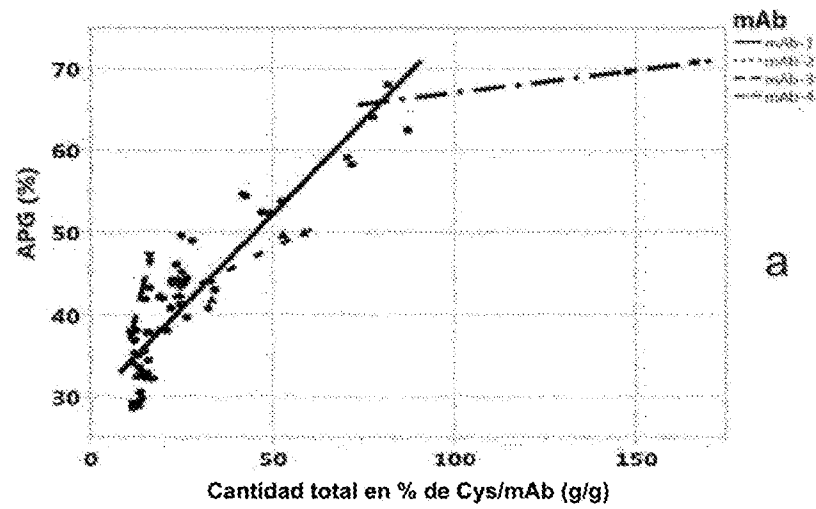


Fig. 16



**Fig 17**

$$APG (\%) = \frac{\text{RELACIÓN DE \% Cys/RC} * 70,76}{\text{RELACIÓN DE \% Cys/RC} + 47,53} + \frac{\text{RELACIÓN DE \% Trp/RC} * 3}{\text{RELACIÓN DE \% Trp/RC} + 1} + 17$$

Fig 18

