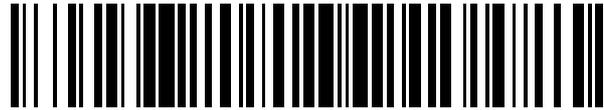


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 603**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2009 E 09730330 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2283043**

54 Título: **Procedimientos de producción recombinante de glucoproteínas**

30 Prioridad:

**07.04.2008 US 42975 P**

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

**03.11.2014**

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE, LLC (100.0%)  
100 Bayer Boulevard  
Whippany, New Jersey 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**WANG, FRANK, S. y  
WANG, JIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 517 603 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

Procedimientos de producción recombinante de glucoproteínas

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a procedimientos de producción recombinante de glucoproteínas en cultivo de células eucariotas. Se proporcionan procedimientos para mejorar el patrón de glucosilación en glucoproteínas producidas de forma recombinante mediante el aumento del porcentaje de oligosacáridos que terminan en ácido siálico.

**Antecedentes**

10 Las glucoproteínas se refieren, en general, a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos y al menos una cadena lateral de oligosacáridos. La composición de hidratos de carbono de un oligosacárido unido puede afectar a la solubilidad, la actividad biológica, la resistencia a la degradación por proteasas y la circulación *in vivo* de una glucoproteína. Los restos terminales de glucanos son particularmente importantes para las proteínas terapéuticas, pues el resto de azúcar final suele controlar su semivida en circulación *in vivo*. Por lo general, las glucoproteínas con oligosacáridos que terminan en ácido siálico permanecen en circulación más tiempo debido a la presencia de receptores en los macrófagos y los hepatocitos que se unen y degradan rápidamente las estructuras que terminan en otros azúcares/amino-azúcares del torrente sanguíneo.

15 Se ha encontrado que los iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pueden aumentar la protección de ácido siálico (véase la patente de EE.UU. Nº 6.528.286 concedida a Ryll). Sin embargo, también se sabe que las células eucariotas han demostrado ser sensibles a la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  en los medios de cultivo. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una alternativa más segura a los  $\text{Cu}^{2+}$  para aumentar la protección de ácido siálico de las glucoproteínas.

20 Por consiguiente, en el presente documento, se proporcionan procedimientos y procesos para aumentar el porcentaje de oligosacáridos que terminan en ácido siálico con el fin de prolongar la semivida de la glucoproteína.

**Descripción de las figuras**

25 La **Figura 1** muestra la metodología usada para el cálculo del porcentaje de protección de las glucoproteínas. La Figura 1(A) es un diagrama de una proteína que ha sido glucosilada, parte de la cual se ha protegido mediante ácido siálico. La Figura 1(B) muestra un diagrama de flujo del procedimiento usado para calcular la protección de ácido siálico. La Figura 1(C) muestra la fórmula usada para el porcentaje de protección.

La **Figura 2** representa un gráfico que muestra las tendencias de protección de la glucoproteína recombinante K en campañas de fabricación a escala comercial.

30 La **Figura 3** representa un gráfico que muestra la actividad de la sialidasa de lisado celular de campañas de fabricación a escala comercial.

La **Figura 4** representa gráficos que muestran la actividad de la sialidasa de una fuente de células de baja protección y una fuente de células de alta protección durante la fermentación en un biorreactor de 15 l. La Figura 4(A) muestra la actividad de la sialidasa libre en el sobrenadante. La Figura 4(B) muestra la actividad de la sialidasa en lisados celulares.

35 La **Figura 5** proporciona un diagrama de la vía de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y del receptor de la insulina.

40 La **Figura 6** representa que la regulación de la sialidasa es mediada por la vía del IGF-1/receptor de insulina. La Figura 6(A) es una inmunotransferencia de Akt fosforilada. La Figura 6(B) es una inmunotransferencia de Erk fosforilada. La Figura 6(C) es un gráfico que muestra actividad de la sialidasa intracelular con diferentes inhibidores.

La **Figura 7** muestra el efecto de la insulina y del IGF-1 en la expresión de la sialidasa. La Figura 7(A) es una inmunotransferencia de la sialidasa. La Figura 7(B) es un gráfico que muestra células BHK con actividad de la sialidasa intracelular cultivadas en medios con insulina, medios con nivel reducido de insulina (1/10 de la concentración) y medios con un nivel reducido de insulina + IGF-1.

45 La **Figura 8** muestra que la actividad de la sialidasa en células BHK depende del pH.

La **Figura 9** representa un gráfico que muestra la inhibición de la actividad de la sialidasa usando oligoelementos, incluyendo  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ .

**Sumario**

50 Se proporcionan procedimientos y procesos de producción de glucoproteínas mediante el cultivo de células eucariotas que proporcionan un producto glucoproteico que contiene oligosacáridos que terminan en uno o más

restos siálicos. Los procedimientos de cultivo celular descritos en el presente documento permiten la recuperación de un producto glucoproteico cuyos oligosacáridos no se ven comprometidos por las degradaciones asociadas con los procedimientos de cultivo celular convencionales. Los procedimientos descritos en el presente documento resuelven el problema de la desialilación de las cadenas laterales de oligosacáridos de una glucoproteína que están asociados con los procedimientos de producción de glucoproteínas convencionales. La invención proporciona beneficios económicos y comerciales a través de la recuperación de mayores cantidades útiles de producto glucoproteico.

Por consiguiente, se proporcionan procedimientos de producción de glucoproteínas mediante el cultivo de células eucariotas y, especialmente, de mamífero que comprenden cultivar una célula huésped que expresa una glucoproteína en presencia de iones de cinc o cobalto en un medio de cultivo celular a una concentración eficaz para reducir al mínimo la pérdida de ácido siálico de los oligosacáridos. Por tanto, la presente invención proporciona diversos procedimientos de cultivo celular para conservar determinadas glucoformas de glucoproteínas producidas en cultivo de células de mamíferos. En algunas realizaciones, los iones de cinc o cobalto se administran al medio de cultivo celular o al lisado celular a niveles suficientes para inhibir la actividad de la sialidasa.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos o procesos de producción de una glucoproteína en cultivo de células de mamífero mediante la adición de una cantidad eficaz de  $\text{Co}^{2+}$  a un medio de cultivo en el que se cultivan células que producen la glucoproteína. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es suficiente para inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  es de entre aproximadamente 0,005 mM y 50 mM. El parámetro anterior se controla para afectar al contenido de ácido siálico de la glucoproteína madura. En algunas realizaciones, el  $\text{Co}^{2+}$  se obtiene de una sal de cobalto. En algunas realizaciones, el  $\text{Co}^{2+}$  se obtiene de compuestos seleccionados del grupo que consiste en  $\text{CoCl}_2$  y  $\text{CoSO}_4$ .

La presente invención proporciona, en algunas realizaciones, procedimientos o procesos de producción de una glucoproteína en cultivo de células de mamífero mediante la adición de una cantidad eficaz de  $\text{Zn}^{2+}$  a un medio de cultivo en el que se cultivan células que producen la glucoproteína para inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es suficiente para inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  es de entre aproximadamente 0,005 mM y 50 mM. El parámetro anterior se controla para afectar el contenido de ácido siálico de la glucoproteína madura. En algunas realizaciones, el  $\text{Zn}^{2+}$  se obtiene de una sal de cinc. En algunas realizaciones, el  $\text{Zn}^{2+}$  se obtiene de compuestos seleccionados del grupo que consiste en  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{ZnSO}_4$ .

En algunas realizaciones, también se proporcionan procedimientos o procesos de producción de una glucoproteína en un cultivo de células de mamífero, tal como en un cultivo de células de riñón de cría de hámster (BHK) o un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO), mediante la adición de una cantidad eficaz de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) al medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, los niveles de IGF-1 útiles para reducir la expresión y/o la actividad de la sialidasa están seleccionados entre los siguientes intervalos: 1-90 ng/ml, 1-10 ng/ml, 1-5 ng/ml, 5-10 ng/ml, 10-20 ng/ml, 10-15 ng/ml, 15-20 ng/ml, 20-30 ng/ml, 20-25 ng/ml, 25-30 ng/ml, 30-40 ng/ml, 30-35 ng/ml, 35-40 ng/ml, 40-50 ng/ml, 40-45 ng/ml, 45-50 ng/ml, 50-60 ng/ml, 60-70 ng/ml, 70-80 ng/ml y 80-90 ng/ml.

En algunas realizaciones, los procedimientos se pueden optimizar todavía más mediante una combinación de técnicas usadas anteriormente para aumentar la protección de ácido siálico. En algunas realizaciones, se pueden añadir iones de cinc e IGF-1 al medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se pueden añadir iones de cobalto e IGF-1 al medio de cultivo celular. En otras realizaciones, se pueden añadir iones de cinc y de cobalto al medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se pueden añadir iones de cinc, iones cobalto o IGF-1 al medio de cultivo celular con otros potenciadores conocidos en la técnica.

Además, los procedimientos se pueden optimizar todavía más modificando el pH del medio de cultivo celular para reducir la actividad de la sialidasa. En algunas realizaciones, particularmente para las células BHK, el pH es de 6,0 o inferior, de 6,5 o inferior, de 7,0 o inferior, de 6,0 a 7,0 y de 6,5 a 7,0.

Se cree que los procedimientos y los procesos son útiles con cualquier glucoproteína producida de forma recombinante.

También se proporciona un procedimiento de producción de glucoproteína mediante el cultivo de células de mamífero, comprendiendo el procedimiento: cultivar una célula huésped de mamífero en un medio en una fase de producción que se caracteriza por la adición de una cantidad eficaz de iones de cinc al cultivo celular, estando dicha cantidad eficaz de iones de cinc a una concentración eficaz para reducir al mínimo la pérdida de ácido siálico en la glucoproteína.

También se proporciona un procedimiento de producción de glucoproteína mediante el cultivo de células de mamífero, comprendiendo el procedimiento: cultivar una célula huésped de mamífero en un medio en una fase de producción que se caracteriza por la adición de una cantidad eficaz de iones de cobalto al cultivo celular, estando dicha cantidad eficaz de iones de cobalto a una concentración eficaz para reducir al mínimo la pérdida de ácido siálico en la glucoproteína.

También se proporciona un procedimiento de producción de glucoproteína mediante el cultivo de células de mamífero, comprendiendo el procedimiento: cultivar una célula huésped de mamífero en un medio en una fase de producción que se caracteriza por la adición de una cantidad eficaz de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) al cultivo celular, estando dicha cantidad eficaz de iones de cobalto a una concentración eficaz para reducir al mínimo la pérdida de ácido siálico en la glucoproteína.

### **Descripción detallada**

Se ha de entender que la presente invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, las especies o los géneros animales, las construcciones y los reactivos descritos en particular, y como tales pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en el presente documento solo tiene el fin de describir determinadas realizaciones, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que solo quedará limitada por las reivindicaciones adjuntas.

Cabe señalar que, como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de los artículos "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Así pues, por ejemplo, la referencia a "un oligosacárido" es una referencia a uno o más oligosacáridos e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque, en la práctica o el ensayo de la invención, se puede usar cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos.

#### I. Definiciones

Los restos de hidratos de carbono de la presente invención se describirán con referencia a la nomenclatura comúnmente usada para la descripción de oligosacáridos. En Hubbard e Ivatt (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50:555-583, se encuentra una revisión de la química de los hidratos de carbono que usa la presente nomenclatura. Dicha nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos (AS) se describen con referencia a la notación abreviada NeuNAc, para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para el ácido 5-glucolilneuramínico

Como se usa en el presente documento, "glucoproteína" se refiere, en general, a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos y al menos una cadena lateral de oligosacáridos. Las glucoproteínas pueden ser homólogas a la célula huésped o, preferentemente, heterólogas, es decir, foráneas, a la célula huésped que se esté utilizando, tal como una proteína humana producida por una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula de riñón de cría de hámster (BHK). En algunas realizaciones, se usan glucoproteínas de mamífero (glucoproteínas que se obtuvieron originariamente de un organismo mamífero), y en algunas realizaciones, aquellas que se secretan directamente en el medio. Los ejemplos de glucoproteínas de mamífero incluyen moléculas tales como citocinas y sus receptores, así como proteínas químicas que comprenden citocinas o sus receptores, incluyendo, por ejemplo, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ , sus receptores (TNFR-1; documento EP 417.563 publicado el 20 de marzo de 1991; y TNFR-2, documento EP 417.014 publicado el 20 de marzo de 1991) y sus derivados, por ejemplo, una inmunoglobulina química del receptor del factor de necrosis tumoral; renina; una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormonas de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas;  $\alpha$ -1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante de folículos; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como el factor VII, factor VIII, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes tales como la Proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno tal como uroquinasa o activador del plasminógeno de la orina o de tipo tisular humano (t-PA); bombesina; trombina, factor de crecimiento hematopoyético; encefalina; RANTES (expresada y secretada normalmente por la activación de los linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1- $\alpha$ ); una albúmina sérica tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina murina; una proteína microbiana tal como  $\beta$ -lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 o TGF- $\beta$ 5; factor de crecimiento insulínico I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón - $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (TL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de la membrana superficial; factor acelerador del decaimiento; antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la cubierta del SIDA; proteínas de transporte;

receptores autoguiados; proteínas reguladoras de la dirección; anticuerpos; proteínas quiméricas tales como inmunoadhesinas (las inmunoadhesinas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nº 5.116.964; 5.714.147 y 5.336.603, las inmunoadhesinas incluyen CD4 (Capon *et al.*, (1989) *Nature* 337:525-531; Traunecker *et al.*, (1989) *Nature* 339:68-70; 15 y Byrn *et al.*, (1990) *Nature* 344:667-670); L-selectina o receptor autoguiado (Watson *et al.*, (1990) *J. Cell. Biol.* 110:2221-2229; y Watson *et al.*, (1991) *Nature* 349:164-167); CD44 (Aruffo *et al.*, (1990) *Cell* 61:11303-1313; CD28 y B7 (Linsley *et al.*, (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730); CTLA-4 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:561-569); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66:1133-1144); receptor del TNF (Ashkenazi *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:10535-10539; Lesslauer *et al.*, (1991) *Eur J. Immunol.* 27:2883-2886; y Peppel *et al.*, (1991) *J. Exp Med.* 174:1483-1489); receptores NP (Bennett *et al.*, (1991) *J. Biol. Chem.* 266:23060-23067; receptor del interferón  $\gamma$  (Kurschner *et al.*, (1992) *J. Biol. Chem.* 267:9354-9360; 4-1BB (Chalupny *et al.*, (1992) PNAS, EE.UU., 89:10360-10364) y receptor  $\alpha$  de IgE (Ridg-way y Gorman, (1991) *J. Cell. Biol.* 115, Nº de sumario1448)) y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y engloba, en concreto, a anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) y composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica. El término "anticuerpo" abarca, en concreto, anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos.

Las expresiones "medio de cultivo celular", "medio de cultivo" y "medio de fermentación" se refieren a una solución nutritiva usada para el cultivo de células de mamífero que normalmente proporciona al menos un componente de una o más de las siguientes categorías:

- 1) una fuente de energía, habitualmente en forma de un hidrato de carbono tal como glucosa;
- 2) todos los aminoácidos esenciales, y generalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cisteína;
- 3) vitaminas y/o otros compuestos orgánicos requeridos a bajas concentraciones;
- 4) ácidos grasos libres; y
- 5) oligoelementos, definiéndose oligoelementos como compuestos inorgánicos o elementos naturales que, por lo general, se requieren a muy bajas concentraciones, normalmente en el intervalo micromolar.

La solución nutritiva, opcionalmente, puede estar suplementada con uno o más componentes de cualquiera de las siguientes categorías:

- 1) hormonas y otros factores de crecimiento como, por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico;
- 2) sales y tampones como, por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato;
- 3) nucleósidos y bases tales como, por ejemplo, adenosina, timidina e hipoxantina; e
- 4) hidrolizados proteicos y tisulares.

En general, el medio de cultivo celular está "exento de suero" cuando el medio está esencialmente exento de suero procedente de cualquier fuente de mamífero (por ejemplo, suero bovino fetal [SBF]). "Esencialmente exento" pretende significar que el medio de cultivo celular comprende entre aproximadamente el 0 y 5 % de suero, preferentemente entre aproximadamente el 0 y 1 % de suero, y lo más preferentemente entre aproximadamente el 0 y 0,1 % de suero.

Las expresiones "célula huésped de mamífero", "célula huésped", "célula de mamífero" y similares se refieren a líneas celulares derivadas de mamíferos que son capaces de crecer y sobrevivir cuando se disponen en cualquier cultivo de monocapa o en cultivo en suspensión en un medio que contiene los nutrientes y factores de crecimiento apropiados. Los factores de crecimiento necesarios para una determinada línea celular se determinan empíricamente con facilidad, sin la necesidad de experimentación, como se describe, por ejemplo, en "Mammalian Cell Culture", Mather, J. P. ed., Plenum Press, N.Y. (1984), y Bames y Sato, (1980) *Cell*, 22:649. Por lo general, las células son capaces de expresar y secretar grandes cantidades de una determinada glucoproteína de interés en el medio de cultivo. Los ejemplos de células huésped de mamífero adecuadas en el contexto de la presente invención pueden incluir células de riñón de cría de hámster (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO), células huésped híbridas humanas tales como células HKB (véase la patente de EE.UU. Nº 6.136.599, células creadas mediante la fusión de células de riñón embrionario humano (293S) y células de linfoma de Burkitt modificadas (2B8)). CHO-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77:4216 (1980)); células dp12.CHO (documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989); células de Sertoli murinas (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); células mamarias murinas (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4.

La expresión "fase de crecimiento" del cultivo celular se refiere al período de crecimiento celular exponencial (la fase logarítmica) donde las células, en general, se dividen rápidamente. Durante esta fase, las células se cultivan durante un período de tiempo, generalmente de entre 1 y 5 días, y en tales condiciones, se aumenta al máximo ese crecimiento celular. Se puede determinar el ciclo de crecimiento de una determinada célula huésped prevista sin necesidad de experimentación. La expresión "período de tiempo y, en tales condiciones, se aumenta al máximo ese crecimiento celular" y similares, se refiere a aquellas condiciones de cultivo que, para una determinada línea celular, se determinan como óptimas para el crecimiento y las divisiones celulares. Durante la fase de crecimiento, las células se cultivan en medio nutritivo que contiene los aditivos necesarios, generalmente a una temperatura de aproximadamente 30 a 40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C, en una atmósfera humidificada, controlada, de manera que se alcanza un crecimiento celular óptimo para una determinada línea celular. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un período de entre aproximadamente uno y cinco días, generalmente de entre dos y tres días.

La expresión "fase de transición" del cultivo celular se refiere al período de tiempo durante el cual se entablan las condiciones de cultivo para la fase de producción. Durante la fase de transición, factores ambientales, tales como la concentración de iones de cinc o de cobalto y la temperatura, se cambian de las condiciones de crecimiento a las condiciones de producción.

La expresión "fase de producción" del cultivo celular se refiere al período de tiempo durante el cual el crecimiento celular se ha estabilizado o se mantiene a un nivel casi constante. Durante la fase de producción, el crecimiento celular logarítmico ha finalizado y la producción de proteínas es fundamental. Durante este período de tiempo, el medio generalmente se complementa para mantener la producción continua de proteínas y obtener el producto glucoproteico deseado.

Los términos "expresión" o "expresa" se usan en el presente documento para referirse a la transcripción y traducción que tienen lugar dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de un producto génico en una célula huésped se puede determinar basándose bien en la cantidad del ARNm correspondiente que está presente en la célula o en la cantidad de proteína codificada por el producto génico que es producida por la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de un producto génico se cuantifica deseablemente mediante hibridación Northern. Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", pág. 7.37.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La proteína codificada por un producto génico se puede cuantificar bien mediante el ensayo de la actividad biológica de la proteína o mediante el empleo de ensayos que sean independientes de dicha actividad, tales como transferencia Western o radioinmunoensayo usando anticuerpos que sean capaces de reaccionar con la proteína. Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", pág. 18.1-18.88 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Como se usan en el presente documento, los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente para denotar un polímero de aminoácidos o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácidos que interactúan o están unidos entre sí.

## II. Procedimientos de cultivo celular

Se ha determinado que proporcionar ciertos oligoelementos, tales como cinc y cobalto, o factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), a un medio de cultivo de células huésped eucariotas productoras de glucoproteína genera un producto glucoproteico con un mayor contenido de ácido siálico en la cadena lateral de oligosacáridos. Dado que las proteínas que expresan uno o más restos de ácido siálico por estructura de oligosacárido compleja pueden tener tasas de aclaramiento *in vivo* más prolongadas, es posible manipular la tasa de aclaramiento de la glucoproteína producida dentro de amplios límites mediante el grado global de sialilación de la preparación. La presente invención proporciona procedimientos para aumentar la sialilación de una glucoproteína que se puede extraer de un cultivo de células eucariotas y, especialmente, de mamífero.

En algunas realizaciones, las células eucarióticas, especialmente las células de mamífero, se cultivan para generar un producto glucoproteico deseado. Al seleccionar una célula huésped para la producción de la glucoproteína en el contexto de la presente invención, es importante reconocer que las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento traduccional y postraduccional, y la modificación (por ejemplo, glucosilación, escisión) de las proteínas expresadas. Se deben seleccionar las líneas celulares apropiadas para garantizar que sean posibles las modificaciones posteriores a la traducción deseadas. Como alternativa, es posible modificar las células huésped para expresar un producto génico deseado requerido para una determinada modificación posterior a la traducción.

En particular, las células de mamífero que expresan la proteína deseada deberían expresar o ser manipuladas para que expresaran determinadas enzimas, de manera que, en las condiciones apropiadas que se describen en el presente documento, se produjera la modificación posterior a la traducción apropiada *in vivo*. Las enzimas incluyen aquellas enzimas necesarias para la adición y la terminación de hidratos de carbono ligados a N y a O, tales como las descritas en Hubbard e Ivan Saira para los oligosacáridos ligados a N. Las enzimas incluyen opcionalmente oligosacariltransferasa,  $\alpha$ -glucosidasa I,  $\alpha$ -glucosidasa II,  $\alpha(1,2)$ manosidasa del RE,  $\alpha$ -mannosasa I de Golgi, N-acetilglucosaminiltransferasa I,  $\alpha$ -mannosasa II de Golgi, N-acetilglucosaminiltransferasa II,  $\alpha(1,6)$ fucosiltransferasa y  $\beta(1,4)$ galactosiltransferasa. Además, la célula huésped expresa la sialil transferasa apropiada que se puede esperar

que se una al ácido siálico terminal en la posición y el enlace específicos como parte del genoma de la célula huésped. Opcionalmente, se puede crear la célula huésped para que exprese las sialil transferasas adecuadas mediante, por ejemplo, transfección de la célula huésped con el ADN que codifica la sialil transferasa.

5 Cabría esperar que las sialil transferasas descritas anteriormente añadan el resto de ácido siálico terminal a la estructura nuclear del oligosacárido apropiada tal como Galβ-4GlcNAc. Las sialil transferasas adecuadas en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellas sialil transferasas que catalizan la sialilación del complejo y la ramificación de los oligosacáridos ligados a N y a O.

10 El contenido global de ácido siálico en la glucoproteína puede verse afectado por el control de los parámetros del cultivo celular que afectan a la productividad específica de las células (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.705.364). Los factores que afectan a la productividad específica de las células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, factores que afectan al número de copias de ADN/ARN, factores que afectan al ARN tales como factores que estabilizan el ARN, nutrientes y otros suplementos de medios, la concentración de los potenciadores de la transcripción, la osmolalidad del medio de cultivo, la temperatura y el pH del cultivo celular, y similares.

15 Para el cultivo de las células de mamífero que expresan la proteína deseada y que son capaces de añadir los hidratos de carbono deseados en una posición y un enlace específicos, se pueden usar numerosas condiciones de cultivo prestando especial atención a la célula huésped que se esté cultivando. Las condiciones de cultivo adecuadas para las células de mamífero son bien conocidas en la técnica (*J. Immunol. Methods* (1983) 56:221 -234) o pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la materia (véase, por ejemplo, "Animal Cell Culture: A Practical Approach", II Ed., Rickwood, D. y Hames, B. D., eds. Oxford University Press, Nueva York (1992)), y varían según la célula huésped seleccionada en particular.

20 El cultivo de células de mamífero se prepara en un medio adecuado para la célula que se esté cultivando en particular. Los medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son soluciones nutritivas a modo de ejemplo. Además, como medios de cultivo, se puede usar cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, (1979) *Meth. Enz.*, 58:44; Bames y Sato, (1980) *Anal. Biochem.*, 102:255; patentes de EE.UU. N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 5.122.469 o 4.560.655; publicaciones internacionales N° WO 90/03430; y WO 87/00195. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin®), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), lípidos (tales como ácido linoleico u otros ácidos grasos) y sus vehículos adecuados, y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia.

25 Las glucoproteínas se pueden producir mediante el crecimiento de células que expresan la proteína deseada en una variedad de condiciones de cultivo celular. Por ejemplo, los procedimientos de cultivo celular para la producción de proteínas a gran o pequeña escala son potencialmente útiles en el contexto de la presente invención. Se pueden usar procedimientos que incluyen, pero sin limitación, un sistema de biorreactor de lecho fluidizado, de biorreactor de fibra hueca, de cultivo en frasco de rodillo o de biorreactor de tanque agitado, en los dos últimos sistemas, con o sin microvehículos, y realizados, como alternativa, en modo discontinuo, alimentado por lotes o continuo.

30 En algunas realizaciones, el cultivo celular de la presente invención se realiza en un sistema de biorreactor de tanque agitado, y se emplea un procedimiento de cultivo de lote alimentado. En el cultivo de lote alimentado preferido, inicialmente, se suministran las células huésped de mamífero y el medio de cultivo a un recipiente de cultivo, y se suministran, al cultivo, más nutrientes de cultivo, de manera continua o en distintos incrementos, durante el procedimiento, con o sin recogida periódica de células y/o productos antes de finalizar el cultivo. El cultivo de lote alimentado puede incluir, por ejemplo, un cultivo de lote alimentado semicontinuo, en el que todo el cultivo se retira periódicamente (incluyendo células y medio) y se reemplaza por medio recién preparado. El cultivo de lote alimentado se distingue del cultivo discontinuo simple en que todos los componentes para el cultivo celular (incluyendo las células y todos los nutrientes de cultivo) se suministran en el recipiente de cultivo al iniciarse el procedimiento de cultivo. El cultivo de lote alimentado se puede distinguir además del cultivo de perfusión en la medida en que el sobrenadante no se retira del recipiente de cultivo durante el procedimiento (en el cultivo de perfusión, las células se contienen en el cultivo mediante, por ejemplo, filtración, encapsulación, anclaje a microvehículos, sedimentación, etc., y el medio de cultivo se introduce y se retira del recipiente de cultivo de manera continua o intermitente).

35 Además, las células del cultivo se pueden propagar de acuerdo con cualquier esquema o patrón que pueda ser adecuado para la célula huésped en particular y el plan de producción contemplado en particular. Por lo tanto, la presente invención contempla un procedimiento de cultivo de una sola etapa o de múltiples etapas. En un cultivo de una sola etapa, se inoculan las células huésped en un ambiente de cultivo y se emplean los procedimientos de la presente invención durante una sola fase de producción del cultivo celular. Como alternativa, se prevé un cultivo de

múltiples etapas. En el cultivo de múltiples etapas, las células se pueden cultivar en una serie de etapas o fases. Por ejemplo, las células se pueden desarrollar en un cultivo de primera etapa o fase de crecimiento, en el que las células, posiblemente extraídas tras un almacenamiento, se inoculan en un medio adecuado para promover el crecimiento y una alta viabilidad. Las células se pueden mantener en la fase de crecimiento durante un período de tiempo adecuado mediante la adición de medio recién preparado al cultivo de células huésped.

De acuerdo con algunas realizaciones, las condiciones de cultivo celular de lote alimentado o continuo se prevén para mejorar el crecimiento de las células de mamífero en la fase de crecimiento del cultivo celular. En la fase de crecimiento, las células se desarrollan en condiciones y durante un período de tiempo que se aumenta al máximo para el crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto ( $O_2$  disuelto) y similares, son las usadas con un determinado huésped, y serán evidentes para el experto habitual en la materia. En general, el pH se ajusta hasta un nivel de entre aproximadamente 6,5 y 7,5 usando bien un ácido (por ejemplo,  $CO_2$ ) o una base (por ejemplo,  $Na_2CO_3$  o  $NaOH$ ). Un intervalo de temperaturas adecuado para el cultivo de células de mamífero tales como células CHO es de entre aproximadamente 30 y 38 °C, y preferentemente de aproximadamente 37 °C, y un  $O_2$  disuelto adecuado es entre el 5 y el 90 % de saturación de aire.

En una etapa particular, se pueden usar las células para inocular una fase o etapa de producción del cultivo celular. Como alternativa, como se ha descrito anteriormente, la fase o etapa de producción puede ser continua con la inoculación o la fase o etapa de crecimiento.

De acuerdo con la presente invención, se controla el ambiente de cultivo celular durante la fase de producción del cultivo celular. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se manipula la concentración de ion de cinc, ion de cobalto o IGF-1 en el medio de cultivo de manera que se alcanza el contenido de ácido siálico deseado y se mantiene en la glucoproteína resultante. En algunos aspectos, la fase de producción del procedimiento de cultivo celular está precedida de una fase de transición del cultivo celular en la que se establecen los parámetros (tales como la adición de ion de cinc, ion de cobalto o IGF-1) para la fase de producción del cultivo celular.

De acuerdo con la presente invención, se controla la concentración de ion de cinc, ion de cobalto o IGF-1 para controlar la desialilación que genera el aumento de ácido siálico en la glucoproteína obtenida del procedimiento de la invención. Las concentraciones de iones de cinc y cobalto, así como de IGF-1, están seleccionadas teniendo en cuenta otros parámetros del procedimiento tales como la osmolaridad de la fase de producción, que puede afectar a la productividad específica de la célula y al contenido de ácido siálico de la glucoproteína producida.

La presente invención proporciona, en una realización particular, la producción de una glucoproteína en cultivo de células de mamífero mediante la adición de una cantidad eficaz de  $Zn^{2+}$  o  $Co^{2+}$  a un medio de cultivo en el que se mantienen las células que producen la glucoproteína.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos o procesos de producción de una glucoproteína en cultivo de células de mamífero mediante la adición de una cantidad eficaz de  $Co^{2+}$  a un medio de cultivo en el que se cultivan células que producen la glucoproteína. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es suficiente para inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la concentración de  $Co^{2+}$  es de entre aproximadamente 0,005 mM y 50 mM. El parámetro anterior se controla para afectar al contenido de ácido siálico de la glucoproteína madura. En algunas realizaciones, el  $Co^{2+}$  se añade en forma de una sal de cobalto. En algunas realizaciones, el  $Co^{2+}$  se obtiene de compuestos seleccionados del grupo que consiste en  $CoCl_2$  y  $CoSO_4$ .

Del mismo modo, en algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos o procesos de producción de una glucoproteína en cultivo de células de mamífero mediante la adición de una cantidad eficaz de  $Zn^{2+}$  a un medio de cultivo en el que se cultivan células que producen la glucoproteína para inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz es suficiente para inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la concentración de  $Zn^{2+}$  es de entre aproximadamente 0,005 mM y 50 mM. El parámetro anterior se controla para afectar al contenido de ácido siálico de la glucoproteína madura. En algunas realizaciones, el  $Zn^{2+}$  se añade en forma de una sal de cobalto. En algunas realizaciones, el  $Zn^{2+}$  se obtiene de compuestos seleccionados del grupo que consiste en  $ZnCl_2$  y  $ZnSO_4$ .

En algunas realizaciones, la concentración de  $Zn^{2+}$  o  $Co^{2+}$  puede ser, por ejemplo, superior a uno o más de los siguientes valores: 0,005 mM, 0,006 mM, 0,007 mM, 0,008 mM, 0,009 mM, 0,01 mM, 0,02 mM, 0,03 mM, 0,04 mM, 0,05 mM, 0,06 mM, 0,07 mM, 0,08 mM, 0,09 mM, 0,10 mM, 0,11 mM, 0,12 mM, 0,13 mM, 0,14 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,30 mM, 0,35 mM, 0,40 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM, 10,0 mM, 15,0 mM, 20,0 mM, 25,0 mM, 30,0 mM, 35,0 mM, 40,0 mM, 45,0 mM, 50,0 mM.

El ion de cinc se añade mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como mediante la adición de  $ZnCl_2$ . En una realización preferida, el cinc se añade en un lote al sistema de cultivo de lote alimentado con o sin otros nutrientes apropiados, como se describe en el presente documento o es conocido por los expertos en la materia del cultivo de células de mamífero.

El ion de cobalto se añade mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como mediante la adición de  $CoCl_2$ . En una realización preferida, el cobalto se añade en un lote al sistema de cultivo de lote alimentado con o sin otros

nutrientes apropiados, como se describe en el presente documento o es conocido por los expertos en la materia del cultivo de células de mamífero.

5 También se proporcionan, en algunas realizaciones, procedimientos o procesos de producción de una glucoproteína en un cultivo de células de mamífero, tal como en un cultivo de células de riñón de cría de hámster (BHK), mediante la adición de una cantidad eficaz de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) a un medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, los niveles de IGF-1 útiles para reducir la expresión y/o la actividad de la sialidasa están seleccionados de los siguientes intervalos: 1-10 ng/ml, 1-5 ng/ml, 5-10 ng/ml, 10-20 ng/ml, 10-15 ng/ml, 15-20 ng/ml, 20-30 ng/ml, 20-25 ng/ml, 25-30 ng/ml, 30-40 ng/ml, 30-35 ng/ml, 35-40 ng/ml, 40-50 ng/ml, 40-45 ng/ml, 45-50 ng/ml, 50-60 ng/ml, 60-70 ng/ml, 70-80 ng/ml y 80-90 ng/ml.

10 Como alternativa, para otras células huésped de mamífero y otras glucoproteínas, se pueden preparar cultivos de ensayo pequeños, pudiéndose determinar el contenido de ácido siálico de la glucoproteína a varias concentraciones de iones de cinc o cobalto, o concentraciones de IGF-1 apropiadas para la célula huésped que se esté cultivando en particular y la fase concreta del cultivo. En algunas realizaciones, el ion de cinc, ion de cobalto o IGF-1 se añade al cultivo de células huésped en o aproximadamente el momento en que se inicia la fase de producción del cultivo celular. Convenientemente, durante el procedimiento de cultivo celular, se emplea una fase de transición que precede a la fase de producción, en la que se establecen las condiciones de cultivo celular descritas en el presente documento para el aumento deseado del contenido de ácido siálico y, por lo tanto, el perfil deseado de la glucoforma. En este momento, también se puede cambiar la temperatura del cultivo, que en algunas realizaciones es de entre aproximadamente 30 °C y 36 °C, o de aproximadamente 33 °C.

20 En algunas realizaciones, los procedimientos se pueden optimizar todavía más mediante una combinación de las técnicas usadas anteriormente para aumentar la protección de ácido siálico. En algunas realizaciones, se pueden añadir iones de cinc e IGF-1 al medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, se pueden añadir iones de cobalto e IGF-1 al medio de cultivo celular. En otras realizaciones, se pueden añadir iones de cinc y de cobalto al medio de cultivo celular.

25 Además, los procedimientos se pueden optimizar todavía más modificando el pH del medio de cultivo celular para reducir la actividad de la sialidasa. En algunas realizaciones, particularmente para las células BHK, el pH es de 6,0 o inferior, de 6,5 o inferior, de 7,0 o inferior, de 6,0 a 7,0 y/o de 6,5 a 7,0.

30 Se cree que los procedimientos y procesos son útiles con cualquier glucoproteína producida de forma recombinante. Los ejemplos son hormonas tales como insulina, hormonas del crecimiento (incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina), activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA), renina, factores de coagulación tales como factor VII, factor VIII y factor IX, bombesina, trombina, factor de crecimiento hemopoyético, albúmina sérica, receptores de hormonas o factores de crecimiento, interleucinas, factores estimulantes de colonias, receptores de linfocitos T, polipéptidos MHC, antígenos virales, glucosiltransferasas y similares. Otras glucoproteínas útiles en los procedimientos de la invención incluyen  $\alpha$ -1-antitripsina, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, anti-trombina III, interleucina 6, interferón  $\beta$ , proteína C, fibrinógeno, entre muchos otros. Esta lista de glucoproteínas es ilustrativa, no excluyente, así como las incluidas en el apartado de definiciones citadas anteriormente.

40 El experto en la materia entenderá que los procedimientos de cultivo celular de la presente invención están seleccionados para lograr el nivel deseado de sialilación de la proteína producida. Los parámetros del procedimiento, además de los descritos en el presente documento que influyen en el grado de sialilación, incluyen el nivel de oxígeno, el nivel de amonio, el pH y el nivel de hexosa. Las condiciones de densidad de cultivo, tiempo y almacenamiento tales como la temperatura también influyen en la sialilación. La presente invención pretende incluir aquellos parámetros de procedimiento que son además los más adecuados para mejorar la sialilación. Además, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.705.364 proporciona procedimientos para modificar el contenido de ácido siálico de una glucoproteína controlando los factores que afectan a la productividad, tales como la adición de un ácido alcanico al medio de cultivo, controlando la osmolaridad del medio de cultivo y controlando la temperatura de crecimiento.

### III. Recuperación de la glucoproteína

50 Tras la fase de producción del polipéptido, el polipéptido de interés se recupera del medio de cultivo usando técnicas que están bien establecidas en la materia.

55 Preferentemente, el polipéptido de interés se recupera del medio de cultivo en forma de un polipéptido secretado. Por ejemplo, como una primera etapa, se centrifuga el medio de cultivo o lisado para eliminar los restos celulares en partículas. Tras ello, se purifica el polipéptido de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siendo los siguientes procedimientos ilustrativos de los procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; enfoque cromatográfico; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG.

#### IV. Análisis de la glucoproteína

La parte de hidrato de carbono complejo de la glucoproteína producida mediante los procedimientos descritos en el presente documento se puede analizar fácilmente, si se desea, mediante técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono. Así pues, por ejemplo, las técnicas como la transferencia de lectina, bien conocida en la materia, revelan las proporciones de manosa terminal o de otros azúcares tales como galactosa. La terminación de oligosacárido mono-, bi-, tri-, o tetra-antenario mediante ácidos siálicos se puede confirmar mediante la liberación de azúcares de la proteína usando hidracina anhidra o procedimientos enzimáticos y fraccionamiento de oligosacáridos mediante cromatografía de intercambio iónico o de exclusión por tamaño u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. También se puede medir el punto isoeléctrico (pI) de la glucoproteína, antes y después del tratamiento con neuraminidasa, para eliminar los ácidos siálicos. Un aumento del pI tras el tratamiento con neuraminidasa indica la presencia de ácidos siálicos en la glucoproteína.

Los hidratos de carbono resultantes se pueden analizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo aquellos procedimientos descritos en el presente documento. Se conocen varios procedimientos en la técnica para el análisis de la glucosilación, y son útiles en el contexto de la presente invención. Dichos procedimientos proporcionan información sobre la identidad y la composición del oligosacárido unido al péptido. Los procedimientos para el análisis de los hidratos de carbono útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, cromatografía de lectina; HPAEC-PAD, que usa la cromatografía de intercambio de aniones a pH elevado para separar los oligosacáridos en base a la carga; RMN; espectrometría de masas; HPLC; GPC; análisis de la composición de los monosacáridos; digestión enzimática secuencial.

El ácido siálico se puede determinar por separado mediante el procedimiento calorimétrico directo de Yao *et al.* (*Anal Biochem.* 179: 332-335 (1989)) en muestras por triplicado. En una realización preferida, se usan el ácido tiobarbátúrico (TBA) de Warren, L. J. *Biol Chem* 238: (8) (1959) o el procedimiento de Anumula, K. R., (1995) *Anal. Biochem.* 230: 24-30.

Habiéndose descrito la invención en términos generales, la misma se entenderá con mayor facilidad en referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo ilustrativo y no pretenden ser limitantes de la presente invención, salvo que se especifique lo contrario.

#### Ejemplos

Será evidente para los expertos en la materia que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son a modo ilustrativo y no limitante, y que se pueden usar otros ejemplos sin apartarse del espíritu ni del alcance de la presente invención, como se expone en las reivindicaciones.

##### **Ejemplo 1. Materiales y procedimientos**

Los experimentos se realizaron en fermentadores de 15 l con un volumen de trabajo de 12 l usando un medio patentado ("medio X"). Sin embargo, se contempla el uso de otros medios, incluyendo aquellos disponibles en el mercado. Se tomaron muestras de los fermentadores en diversos puntos temporales y se centrifugaron las muestras de fermentación a 1000 x gravedad durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante transparente a nuevos tubos y se lisaron los sedimentos celulares en M-PER (Pierce, Rockford, IL) o tampón de lisis Phosphosafe (Novagen, Madison, WI) según las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Se cuantificó la actividad de la sialidasa usando un kit NA-Star modificado (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un lector de microplacas Modulus (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA). El LY294002, PD98059, la rapamicina y el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) se adquirieron en SAFC (Saint Louis, MO). Para la detección de la sialidasa en inmunotransferencias, se usó un anticuerpo policlonal (Abnova Inc., Taiwan). Se usaron un anticuerpo monoclonal murino (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un anticuerpo policlonal (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) para detectar la ERK fosforilada y la Akt fosforilada, respectivamente.

Se sometió la glucoproteína K purificada a la digestión por sialidasa y/o  $\beta$ -galactosidasa, y se midieron la galactosa total y expuesta usando HPAEC-PAID Dionex. La fórmula que se muestra en la Figura 1 se usa para el cálculo del porcentaje de protección.

##### **Ejemplo 2. Fuentes de células de baja protección frente a las de alta protección**

Las diferentes fuentes de células, incluso procediendo de la misma colonia precursora, pueden diferir en la tendencia de protección de ácido siálico de los oligosacáridos. Las disparidades en dichas fuentes de células pueden afectar en gran medida a la producción de una glucoproteína. Haciendo referencia ahora a la Figura 2, la fuente de células con valores bajos de protección generó una tendencia a la baja de la protección hacia la mitad de la campaña, mientras que la clasificada como fuente de células de alta protección mantuvo los valores de protección por encima del límite durante toda la campaña.

Por lo tanto, las fuentes de células desempeñan un papel importante en la protección de ácido siálico de los oligosacáridos, que se puede atribuir a la actividad de la sialidasa. En la Figura 3, se muestra un diagrama que representa que la fuente de células con valores bajos de protección mostró de manera constante una actividad

elevada de la sialidasa en el lisado celular en diferentes campañas de fabricación a escala comercial.

5 Se observó una alta actividad de la sialidasa en el líquido de cultivo celular recogido, así como en el lisado celular en la fermentación en biorreactor de 15 l usando la fuente de células con valores de protección históricamente bajos, como se muestra en las Figuras 4(A) y 4(B). Es interesante destacar la detección de la respuesta aguda de la actividad de la sialidasa en el lisado celular y el líquido de cultivo celular a la suplementación con galactosa (3 g/l) en el medio el día 29 en ambas fuentes de células.

**Ejemplo 3. El factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) inhibe la actividad de la sialidasa**

10 La autofosforilación de los receptores del factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) y de la insulina activa, mediante el reclutamiento del sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS-1), diferentes señales corriente abajo y desencadena tanto la proliferación como la diferenciación celular. En la Figura 5, se muestra la vía del receptor del IGF-1/de la insulina. La activación de la vía de Ras-Raf-Ker-Mek estimula la proliferación, que contribuye a la regulación negativa de la sialidasa. Por el contrario, la activación de la vía de PI3K-Akt-mTOR-P70S6K conduce a la expresión de la sialidasa. Es importante destacar que solo el receptor de IGF-1 es capaz de mediar la activación independiente de IRS-1 de la vía Erk.

15 Se cultivaron células BHK en medio suplementado con diferentes inhibidores en botes de rodillo durante 6 días. Se preparó el lisado celular usando tampón de lisis Phosphosafe (Novagen, Madison, WI) y se sometió a inmunotransferencia usando los anticuerpos apropiados. Los resultados, mostrados en la Figura 6, indicaron que la fosforilación de Erk se evitó en presencia de PD98059 15  $\mu$ M, y la fosforilación de Akt, en presencia de LY294002 20  $\mu$ M o de 5 ng/ml de rapamicina. La supresión de la activación de Akt por LY294002 o rapamicina produjo luego la fosforilación de Erk y la regulación negativa de la expresión de la sialidasa en las células BHK. También se observó que las células BHK cultivadas en otro medio patentado ("medio Y") inactivó la fosforilación de Erk. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la actividad de la sialidasa en comparación con el control. Esto coincide con la observación de que la inhibición de la activación de Erk por PD98059 no produjo ningún cambio en expresión de la sialidasa.

25 Se observó que la reducción de la insulina (10 veces) en el medio no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la sialidasa en las células BHK cultivadas en botes de rodillo, como se muestra en la Figura 7. La adición de IGF-1 (20 ng/ml) en el medio con reducción de insulina reguló negativamente la expresión de la sialidasa en comparación con el control.

**Ejemplo 4. La actividad de la sialidasa depende del pH**

30 También se ha demostrado que la actividad de la sialidasa en células BHK depende del pH, como se muestra en la Figura 8. Se preparó lisado celular usando tampón de lisis M-PER (Pierce) y se midió la actividad de la sialidasa usando el kit de NA-Star modificado (Applied Biosystems) en diferentes condiciones de pH. Se encontró que la actividad de la sialidasa en células BHK tiene una mayor actividad a pH ácido.

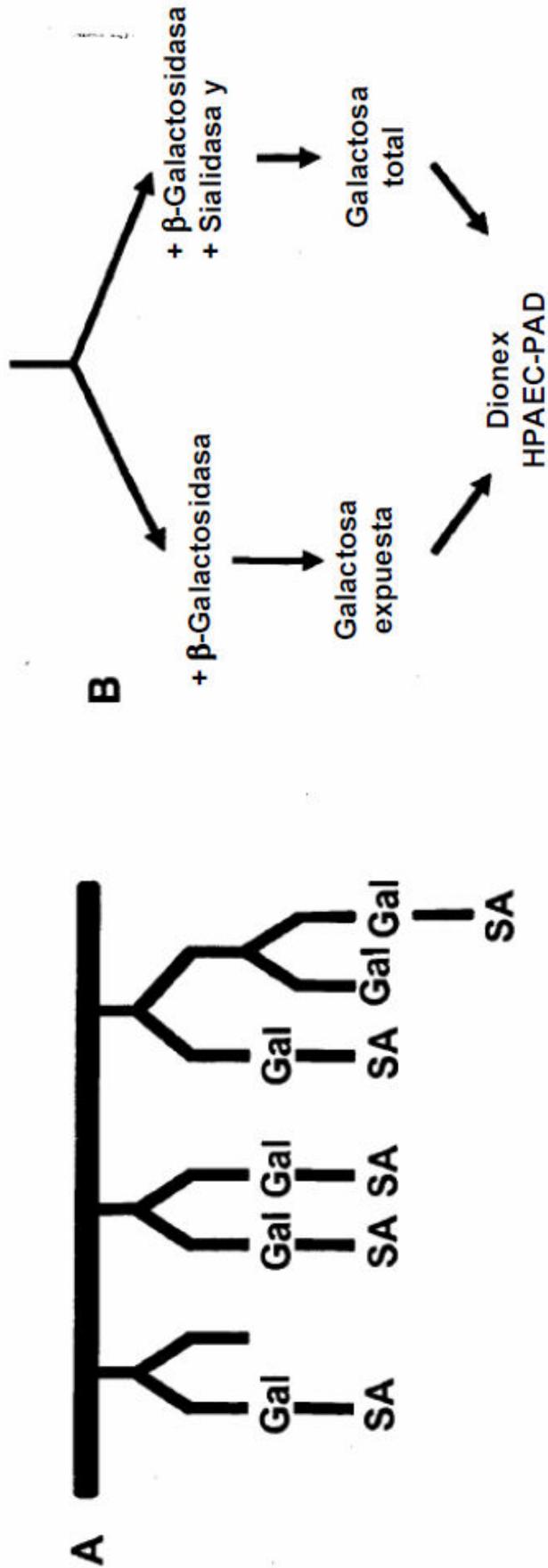
**Ejemplo 5. Inhibición de la actividad de la sialidasa usando oligoelementos**

35 Haciendo referencia ahora a la Figura 9, se muestra la inhibición de la actividad de la sialidasa usando oligoelementos, incluyendo  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ . Se trató lisado celular de células BHK preparado usando tampón de lisis M-PER (Pierce) con diferentes oligoelementos a diversas concentraciones. Los datos indicaron que  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{CoCl}_2$  inhiben la actividad de la sialidasa eficazmente *in vitro*.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de aumento del porcentaje de oligosacáridos que terminan en ácido siálico en glucoproteínas producidas de manera recombinante que comprende inhibir la expresión y/o la actividad de la sialidasa en un cultivo de células recombinantes, en el que la inhibición de la expresión y/o la actividad de la sialidasa comprende la adición de una cantidad eficaz de factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) al cultivo de células recombinantes.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la inhibición de la expresión y/o la actividad de la sialidasa comprende además la adición de una cantidad eficaz de ion de cinc, ion de cobalto o ambos al cultivo de células recombinantes.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ion de cinc o el ion de cobalto tiene una concentración de entre 0,005 mM y 50 mM.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ion de cinc se añade en forma de una sal de cinc.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la sal de cinc está seleccionada del grupo que consiste en ZnCl<sub>2</sub> y ZnSO<sub>4</sub>.
6. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ion de cobalto se añade en forma de una sal de cobalto.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la sal de cobalto está seleccionada del grupo que consiste en CoCl<sub>2</sub> y CoSO<sub>4</sub>.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, que comprende además modificar el pH del cultivo celular.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el pH es de 7,0 o inferior.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el pH es de 6,5 a 7,0.
11. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el IGF-1 tiene una concentración de entre 1 y 90 ng/ml.

Figura 1



$$\% \text{ de desprotección} = \frac{\text{Galactosa expuesta}}{\text{Galactosa total}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ de protección} = 100 \% - \% \text{ de desprotección}$$

Figura 2

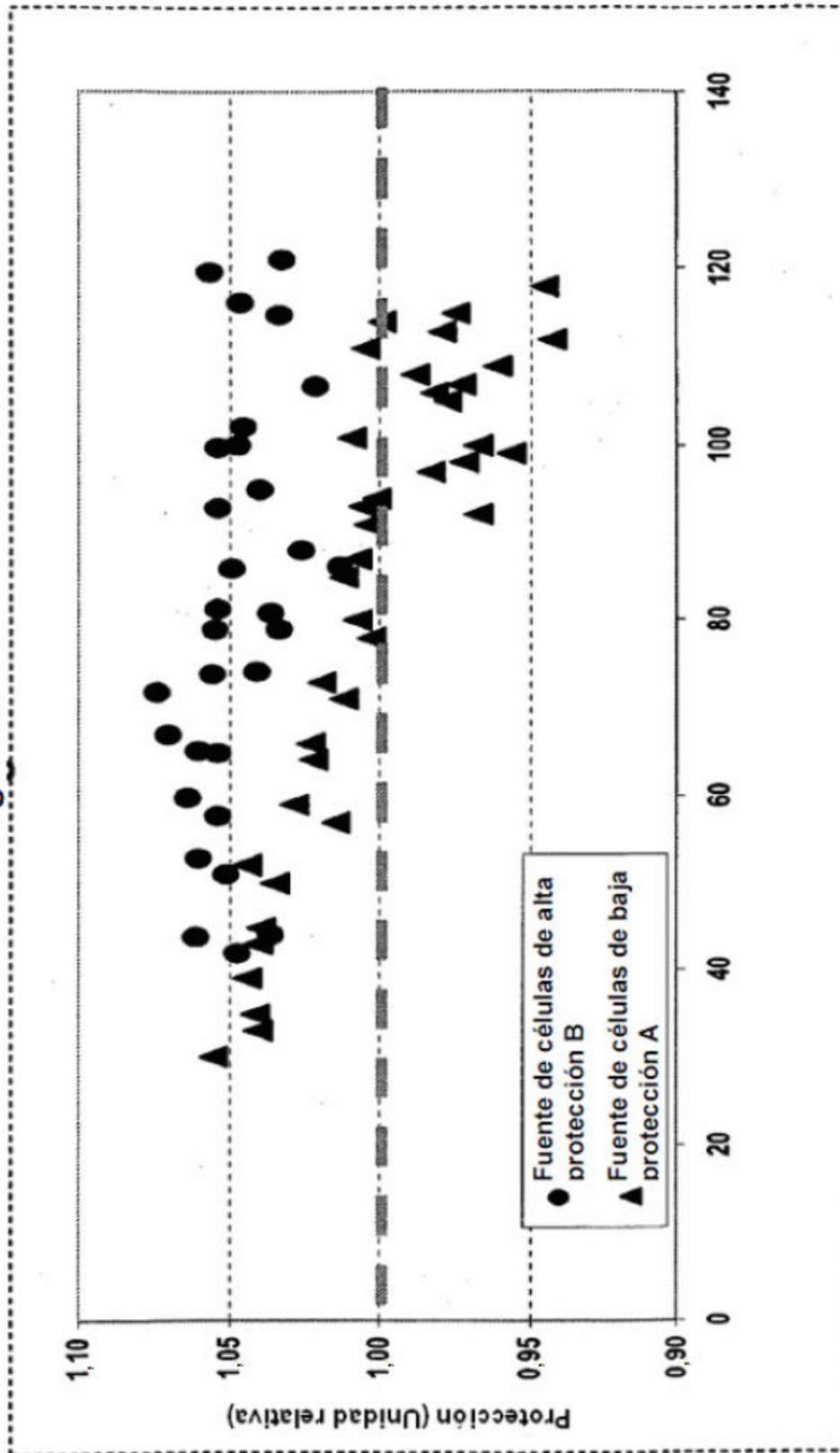


Figura 3

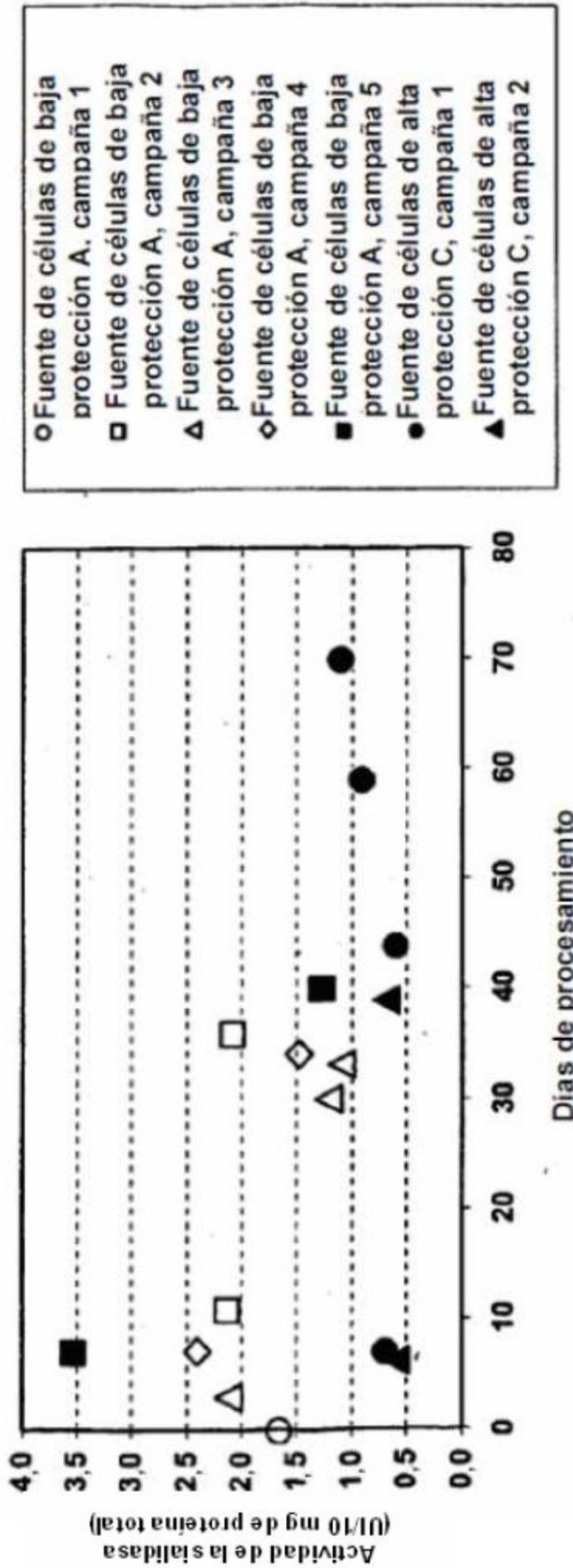


Figura 4

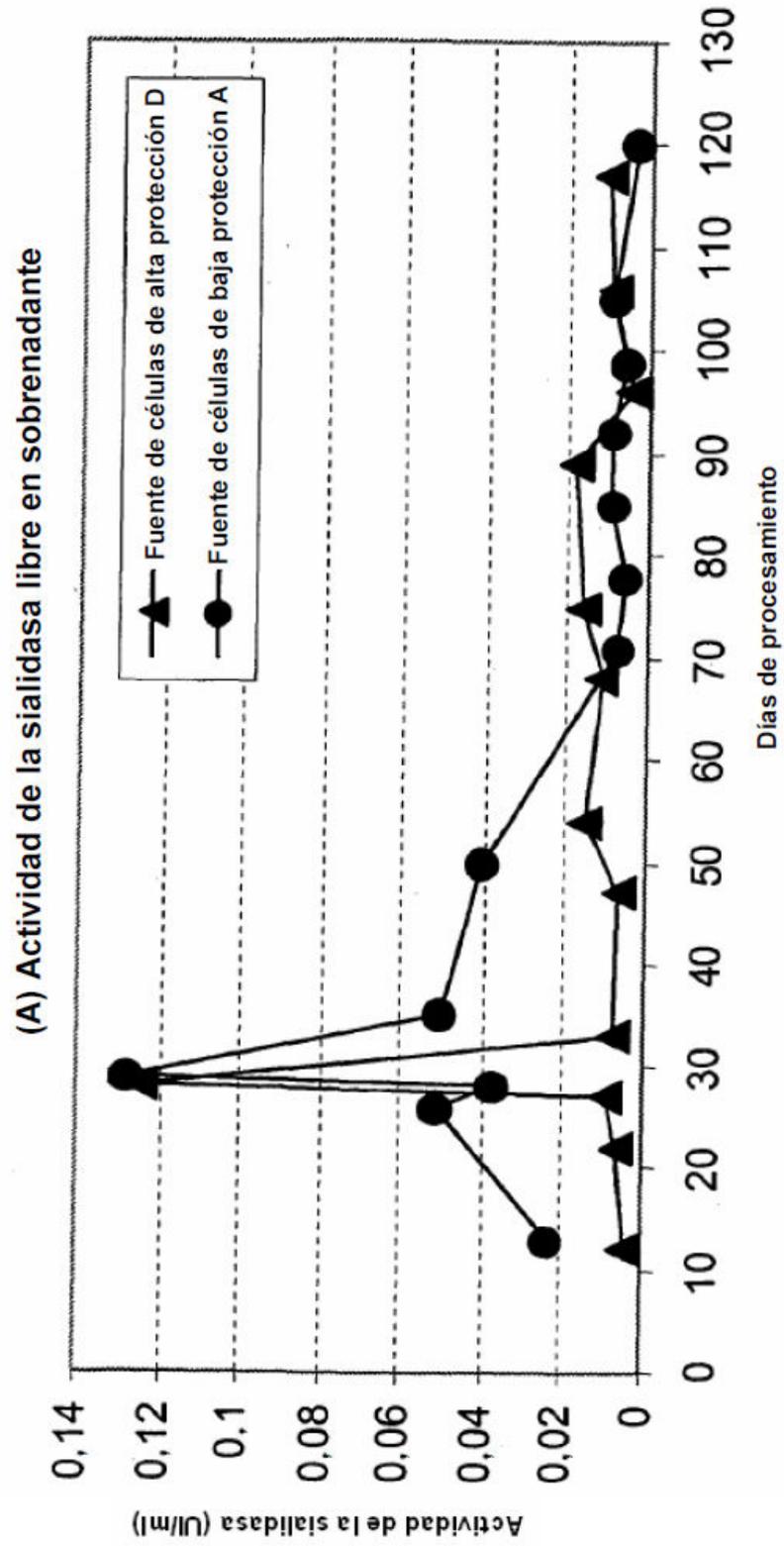


Figura 4

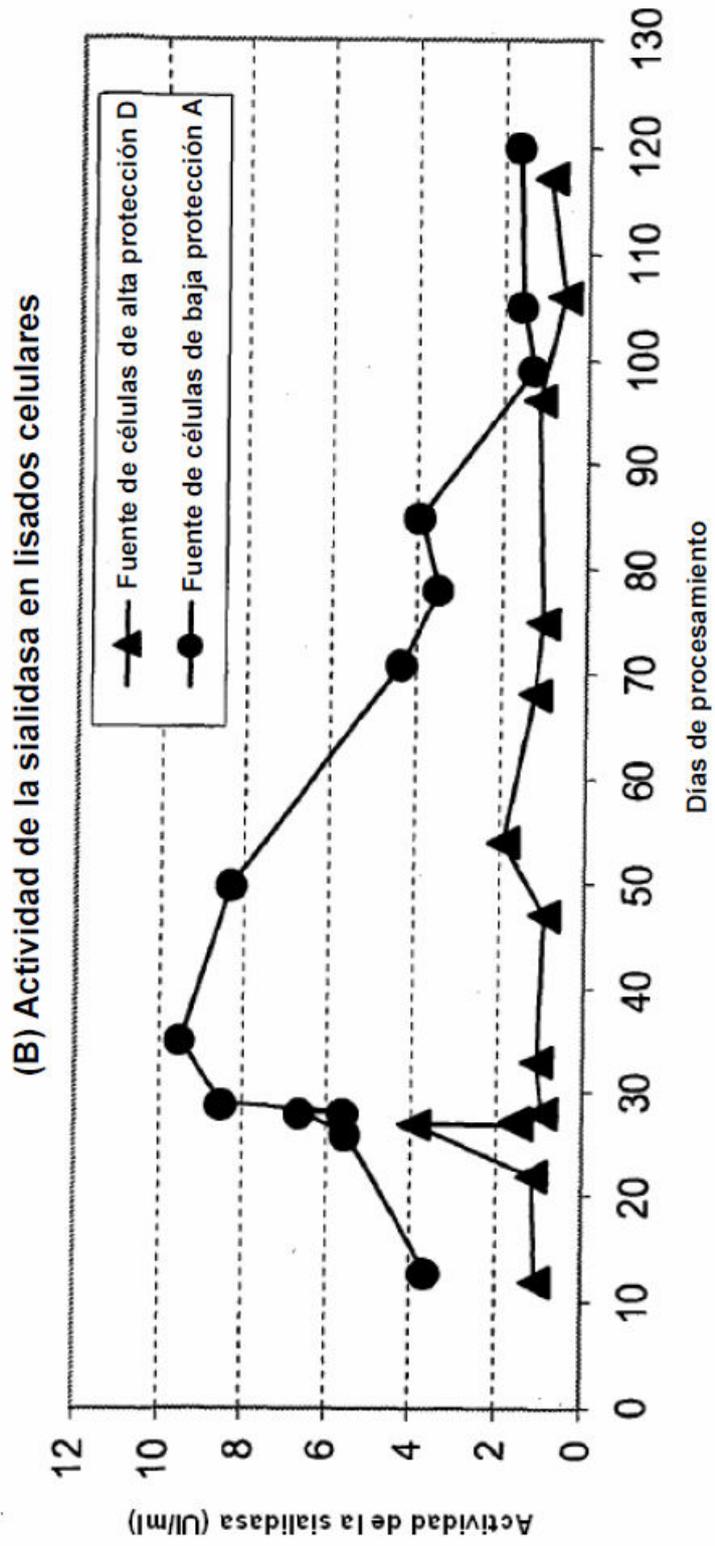


Figura 5

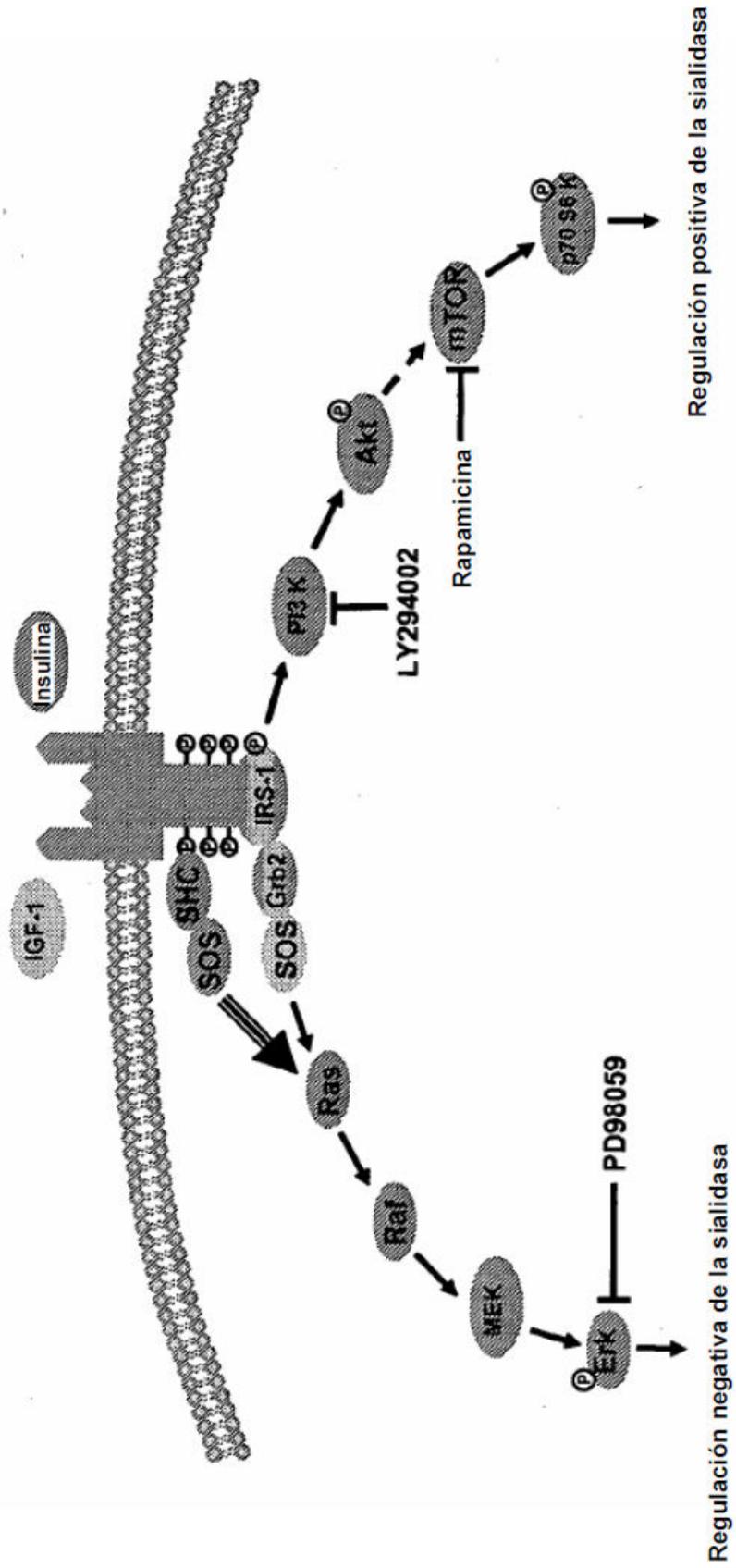


Figura 6

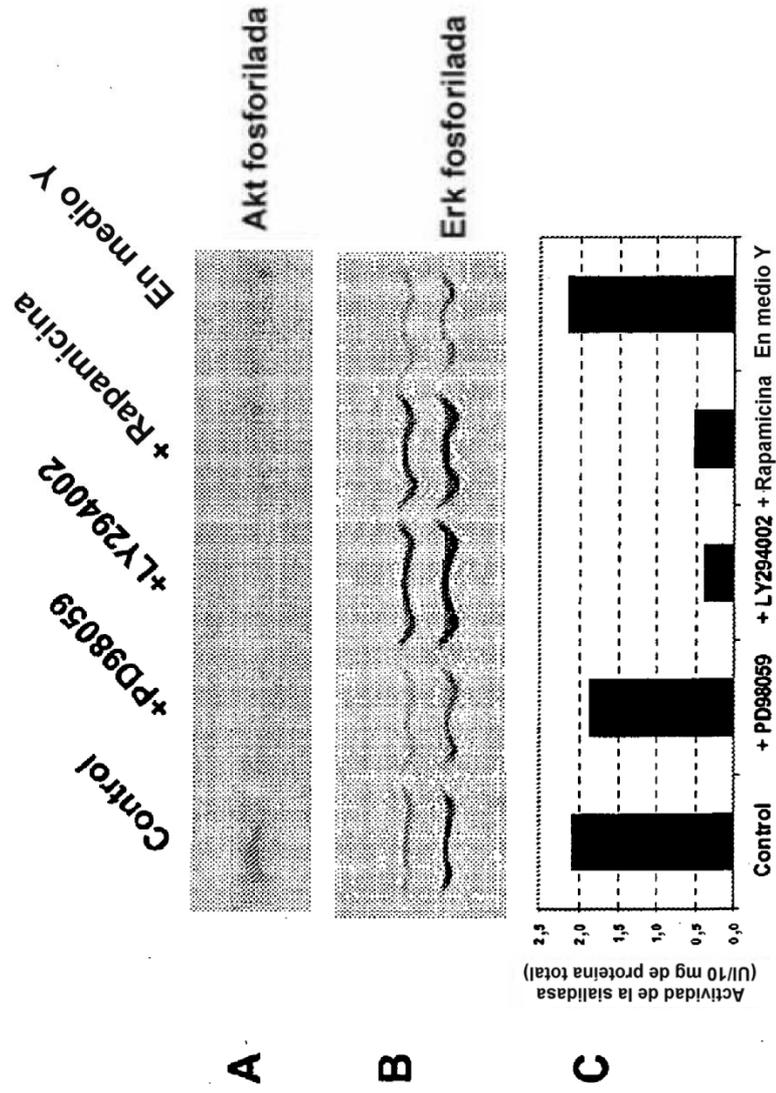


Figura 7

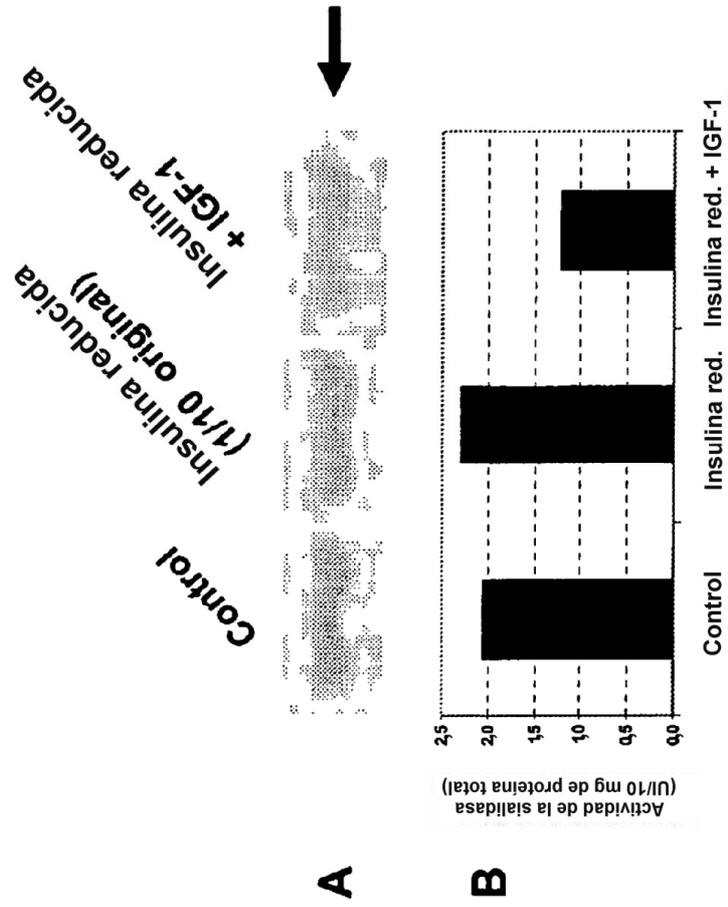


Figura 8

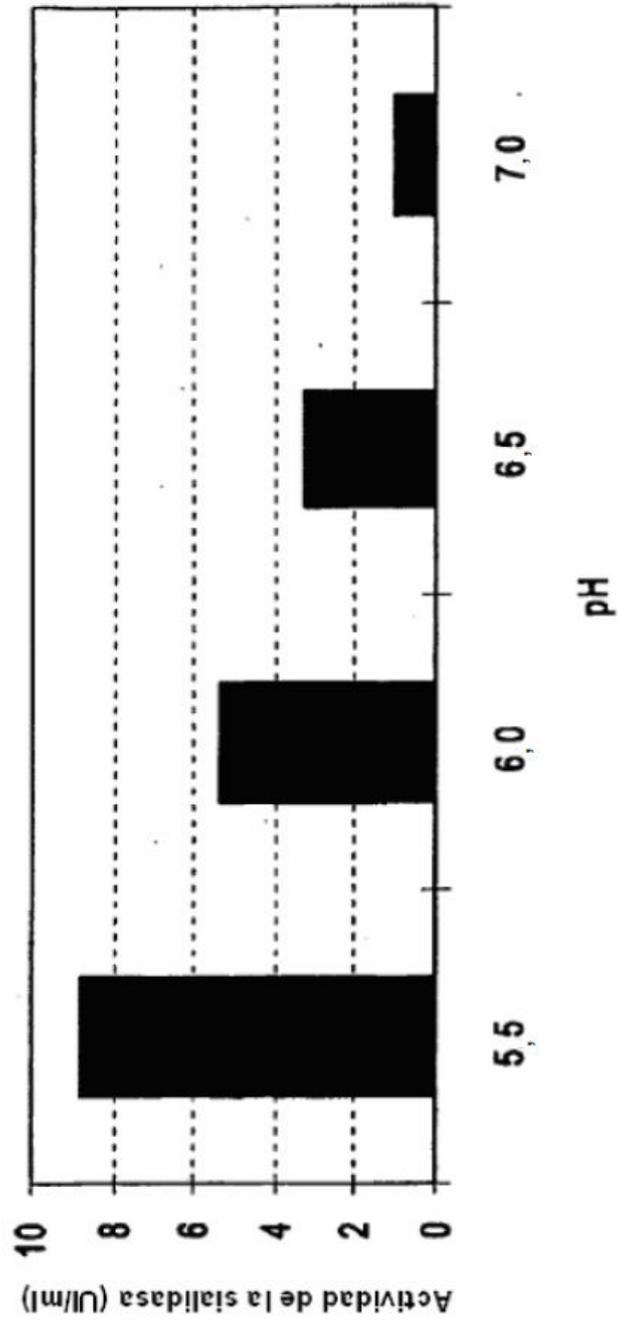


Figura 9

